

36. OTDK Biológia szekció

A retina eltévedt idegsejtjei: a displaced dúcsejtek eloszlása az emlős retinában

Balogh Boglárka

Biológia MSc II. évfolyam

Pécsi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Kovács-Öller Tamás

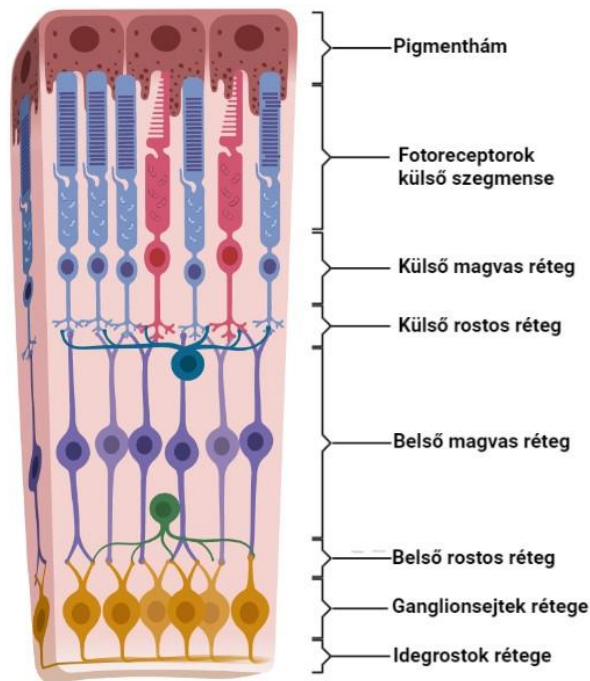
Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	3
2.	Célkitűzések.....	10
3.	Anyag és módszer.....	10
3.1.	Állatok és preparáció.....	10
3.2.	Immunhisztokémia.....	11
3.3.	Konfokális mikroszkópia.....	12
3.4.	Ca ²⁺ -képzőképzés 2-foton mikroszkópiával.....	12
4.	Eredmények és értékelésük.....	13
4.1.	Displaced ganglionsejtek egér retinában.....	13
4.2.	A displaced ganglionsejtek jelenlétének kimutatása más emlősökben.....	13
4.3.	A displaced ganglionsejtek regionális eloszlása egérben.....	15
4.4.	Displaced ganglionsejtek morfológiai csoportosításának felvázolása.....	19
4.5.	Displaced ganglionsejtek funkcionális csoportosítása.....	21
5.	Összefoglalás.....	22
6.	Köszönetnyilvánítás.....	26
7.	Irodalomjegyzék.....	26

1. Bevezetés

A látás az ember számára az egyik legfontosabb érzékszerv, mivel a külvilágból érkező információ több, mint 80%-át ezen érzékszervünk közvetíti az agyban. A feldolgozásban és jeltovábbításban fontos szerepet végez a szem ideghártyája, a retina. A retina egy komplex, rendezett, fényérzékeny és információ feldolgozásra képes szövet, amelyben a működőképes hálózat kialakításához mind neuronális, mind gliális sejtes elemek vesznek részt.

A retina idegsejt típusai közé sorolhatók a fotoreceptorok, a horizontális sejtek, bipoláris és amakrin sejtek, valamint a dúcsejtek. Ezek minden gerinces élőlényben az 6 réteget alkotva helyezkednek el (1. ábra). A legbelsőbb réteget, amely az üvegtest felé esik, az idegrostok rétegének nevezzük (NFL - Neurofilament Layer), amelyet a dúc- vagy másnéven ganglionsejtek rétege követ (GCL - Ganglion Cell Layer), majd a dúcsejtek, bipoláris és amakrin sejtek nyúlványait és szinapszisait tartalmazó belső rostos réteg következik (IPL - Inner Plexiform Layer). Az amakrin, bipoláris és horizontális sejtek szómáit tartalmazó réteg következik ezek után, a belső magvas réteg (INL - Inner Nuclear Layer), majd ettől disztálisan helyezkedik el a bipoláris, horizontális sejtek és fotoreceptorok által létrehozott kapcsolatokat tartalmazó réteget, a külső rostos réteget (OPL - Outer Plexiform Layer). Végül pedig a fotoreceptorok sejttestjei a külső magvas rétegben (ONL - Outer Nuclear Layer) helyezkednek el. Az érhártya felé eső oldalon a fény befogását a fotoreceptorok külső szegmense végzi, amely aktívan beágyazódik a pigmenthártyába (Webvision, 2021)



1. ábra: A retina felépítése. A gerinces retina rétegeinek felsorolása jobbról (Biorender)

A retinális ganglionsejtek (RGC-k) összeköttetést hoznak létre a retinális bemenet és a központi idegrendszer látásfeldolgozó központjai között. Az RGC-knek számos közös jellemzője van. Ritka kivételektől eltekintve a GCL-ben találhatóak meg sejttestjeik, dendritjeik a belső rostos rétegben arborizálnak, és axonjaik a látóidegen keresztül projektálnak az agyi központokba, amelyek közül a corpus geniculatum laterale, mint az elsődleges reléállomás a legfontosabb, de ezen kívül számos jelfeldolgozó központba történik az információ továbbítása. Az RGC-k dendritjeiken szinapszisokat alkotnak más sejtekkel, melyek közül a legfontosabbak a bipoláris sejtek, de fontos partnereik, a nagyrészt inhibitoros interneuronok, az amakrin sejtek is., Molekulárisan a pán-RGC markerek közé tartozik a Thy1 (THYmocyte differentiation antigen 1, Barnstable & Dräger, 1984; Blandford és mtsai, 2019) sejtfelszíni fehérje, a Brn3 család transzkripció faktorai (Xiang és mtsai, 1995; Badea és mtsai, 2009) és az RBPMS RNS-kötő fehérje (Rodriguez és mtsai, 2014).

Az RGC-k sok szempontból heterogének. Korai tanulmányok a sejteket ON, OFF vagy ON-OFF, illetve tranziens vagy sustained típusokba sorolták a fénystimulusra adott válaszuk alapján. Ezek a vizsgálatok a helyi mozgásra, a mozgás irányára vagy az egyenletes megvilágításra szelektív RGC-kat is azonosították (Lettvin és mtsai, 1959;

Cleland és mtsai, 1974; Barlow és mtsai, 1964; Devries & Baylor, 1997). Az egyik legteljesebb fiziológiai felmérésben Farrow és Masland (2011) az RGC-ket fényválaszaik alapján 12 funkcionális csoportba tudták sorolni multielektroda array (MEA) felvételek segítségével. Ezzel szemben az anatómiai osztályozás során a dendritikus morfológia alapján 15-20 típusba sorolhatóak ezen sejtek. Általánosságban elmondható, hogy az azonos típusba tartozó RGC-k azonos fiziológiával, morfológiával, retinán belüli összeköttetésekkel, retina mozaikkal, immunhisztokémiai profillal és genetikai markerekkel rendelkeznek (Rowe & Stone, 1977; Seung & Sümbül, 2014; Sanes & Masland, 2015; Rodieck & Brening, 1983).

A továbbiakban pedig néhány főbb RGC csoportot jellemeznék, melyeket vizsgáltunk. Az alfa RGC-ket (aRGC-k) macska retinán végzett kísérletek során kerültek először leírásra (Wassle és mtsai, 1975, Cleland & Levick, 1974a,b; Cleland és mtsai, 1975). Ezek a sejtek felismerhetők nagy sejttestükről, robusztus dendritjeikről és axonjaikról, a belső rostos réteg (IPL) különböző rétegeibe érkező nagy monosztratifikált dendritikus ágaikról és a nagy receptív mezőikről (Dreher és mtsai, 1985; Peichl, 1989). Morfológiai jellemzőiken kívül ezek az aRGC-k közös fiziológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint például a rövid válaszlatencia és a gyors axonvezetés, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy elsőként reagáljanak egy új ingerre (Cleland és mtsai, 1975). A legtöbb emlősben a többi ganglionsejtnél intenzívebben festődnek neurofilamentumokra. Egérben az alfa RGC kifejezést számos nagyméretű, SMI-32 pozitív RGC-re alkalmazzák, tekintet nélkül fiziológiai tulajdonságaikra vagy részletes morfológiájukra. Amellett, hogy nagyok és neurofilamentumokban gazdagok, nagy mennyiségben expresszálják az *sppl*-et, amely a szekretált foszfoproteint, az oszteopontint kódolja, és a *kcng4*-et, amely egy feszültségkapcsolt kálumcsatorna alegységet kódol (Duan és mtsai, 2015). Az aRGC-k funkcionálisan ON és OFF központokra oszthatók, amelyek a fényintenzitás növekedésére (ON) és csökkenésére (OFF) reagálnak receptív mezőjük középpontjában, ami megfeleltethető a dendritek anatómiai rétegződésének is az IPL-en belül (Nelson és mtsai., 1978). Ezen túlmenően ezeket a válaszokat tovább osztották sustained (fenntartott) vagy tranziens (rövidtávú) típusokra is, a dendritjeik IPL-régiókon belüli megfelelő eloszlásával (Euler és mtsai., 2014). Eddig az aRGC-k négy különböző típusát írták le egerekben receptív mezőik és jelmintáik szerint, és az IPL-en belüli sztratifikációjuk alapján, ezek a következők: Az ON-sustained, ON-tranziens, OFF-sustained és OFF-tranziens (Krieger és mtsai., 2017;

Wang és mtsai., 2021). Az aRGC-k válaszainak részletes elektrofiziológiai jellemzését felnőtt egerekben Pang és munkatársai (2003) végezték, és ez a tanulmány három fő típust eredményezett. A szerzők szerint azonban mind a 28 vizsgált ON-aRGC sejt hasonló választ adott, ami a jelek szerint a sustained típusba tartozik. Hong és munkatársai (2011) morfológiai tanulmánya több aRGC-típust írt le a szóma, a belső plexiform rétegen belüli dendritikus mező eloszlása és axonális projekciójuk alapján: X3 (OFF-sustained), X5 (OFF-tranziens) és X7 (ON). Ez a munka részletesen bemutatta a dendritikus mezőjük és a szóma méretének eloszlását, és összefüggésbe hozta ezeket az értékeket a felső colliculus superioron belüli axonális arborizációjukkal, de nem elemezte topográfiai eloszlásukat a retinában (Hong és mtsai., 2011). Schmidt és munkatársai (2014) tanulmánya dokumentálta, hogy az ON-aRGC-k a melanopszint expresszáló, belsőleg fényérzékeny RGC-k egyik típusának, az M4 típusnak (Ecker és mtsai., 2010; Estevez és mtsai., 2012) felelnek meg, és azt javasolta, hogy ez a típus (ON-aRGCs/M4), amelyet az alfa RGC marker (SMI32) és a melanopszin (OPN4) expressziója határoz meg, amelyek az összes retina kvadránsban eloszlának. Az aRGC-k negyedik típusának, az ON tranziens-aRGC-knek a felfedezése Krieger és munkatársai (2017) munkája révén történt molekuláris, in vitro elektrofiziológiai felvételek, valamint részletes morfológiai és immunhisztokémiai elemzés kombinációjával. E technikák alkalmazásával Krieger és munkatársai (2017) jellemezték az ONt-aRGC-ket, leírták a négy aRGC-típus mindegyikének eltérő immunhisztokémiai szignatúráját, ami arra utal, hogy ezek különböző típusok, amelyek a retinán belül egyedi mozaikban oszlanak el. Az SMI32 marker mellett az aRGC-k minden altípusa a Brn3 géncsalád expressziójának megfelelő antitestek kombinációjával immunodetektálható. Az ON-sus-aRGC-k Brn3a- Brn3b+ Brn3c-Calbindin+, az ONtran-aRGC-k Brn3a- Brn3b+ Brn3c- Calbindin-, az OFFsus-aRGC-k Brn3a+ Brn3b+ Brn3c- és az OFFtran-aRGC-k Brn3a+Brn3b+Brn3c+ (Krieger és mtsai., 2017). Dokumentálták, hogy az ONsus-aRGC-k a belső fényérzékeny ganglionsejtek egy típusa, az M4-ipRGC-k (Ecker és mtsai., 2010; Schmidt és mtsai., 2014; Sonoda és mtsai., 2020). Ezeket a sejteket azonban nem könnyű azonosítani a melanopszin elleni klasszikus OPN4 antitesttel, amely az M1, M2 és M3 ipRGC-ket azonosítja, mivel nem expresszálnak elegendő melanopszin fotopigmentet (Vidal-Villegas és mtsai., 2019, 2021a,b), bár a pigmenttől való funkcionális függőségüket jellemezték (Estevez és mtsai., 2012), ami ahhoz vezetett, hogy nincs globális konszenzus a teljes M4-ipRGC-populáció általános azonosítását és a sejtek retinánkenti

számát illetően rágcásalókban. A közelmúltban jelentették, hogy a fotopigmentet expresszáló sejtek a T brain 2 (Tbr2) transzkripciós faktort is expresszálják, amely kulcsfontosságú e sejtek fenntartásához (Berg és mtsai., 2019; Tran és mtsai., 2019; Chen és mtsai., 2021). Ezért más szerzők az OPN (oszteopontin), mint az aRGC-k egyik markere, és a Tbr2, mint az M4-ipRGC-k megbízható markere kolokalizációját használták (Gallego-Ortega és mtsai., 2021).

A melanopszint expresszáló, más néven intrinzik fényérzékeny retinális ganglionsejtekről (ipRGC-k) csak az elmúlt két évtizedben kaptunk elég információt, azonban a kutatások középpontjába kerültek ebben az időszakban, hiszen több látással kapcsolatos dogmát is át kellett értékelni miattuk. Ezek a sejtek önálló fototranszdukcióra képesek, azonban emellett ugyanúgy kapnak bementi információt a csapok és pálcikák felől is a bipoláris és amakrin sejteken keresztül, mint a többi RGC (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002; Do és mtsai., 2021). Részt vesznek a cirkadián, pupilláris és hormonális fényre adott válaszokban (Schmidt és mtsai., 2011b, 2014; Allen és mtsai., 2014). A Berson és munkatársai által 2002-ben eredetileg leírt ipRGC-ket morfológiailag homogén osztálynak gondolták. Az évek során végzett későbbi kutatások azonban bizonyítékot mutattak arra, hogy az ipRGC-k legalább 6 morfológiailag és fiziológiailag elkülönülő altípusa (M1-M6) különböző morfológiát mutat, és hozzájárul mind a nem képalkotó és a képalkotó funkcióhoz is. Az ipRGC-k melanopszin-specifikus antitestekkel történő immunjelölése kimutatta, hogy ezek az ipRGC-k az IPL ON és OFF szublamínáiban egyaránt rétegződnek (Provencio és mtsai., 2002). A Berson által 2002-ben eredetileg leírt ipRGC-k az M1 altípusba tartoznak. Az M1 sejtek az IPL OFF szublamínájában rétegződnek, míg az M2, M4 és M5 sejtek az ON szublamínában, az M3 (Schmidt & Kofuji, 2011) és M6 (Quattrochi et al., 2019) sejtek pedig az ON és OFF szublamínában is rétegződnek (Viney és mtsai., 2007; Baver és mtsai., 2008; Schmidt és mtsai., 2008; Schmidt & Kofuji, 2009; Berson és mtsai., 2010; Ecker és mtsai., 2010; Quattrochi és mtsai., 2019). Az M1 altípusoknak kicsi a sejttestje és a dendriteik vannak, és az összes típus közül a legerősebb a melanopszin expressziójuk. Az OFF szublamínában való rétegződésük ellenére többnyire ON bipoláris sejtektől kapnak szinaptikus bemenetet (Dumitrescu és mtsai., 2009; Hoshi és mtsai., 2009; Grünert és mtsai., 2011). Az M1 ipRGC-k a Brn3b transzkripciós faktor expressziója alapján két típusra oszthatók tovább. A Brn3b pozitív M1 ipRGC-kről kimutatták, hogy innervációt biztosítanak a pretectum nucleus olivaris

magnak (OPN), amely a pupilla fényreflexét irányítja, míg a Brn3b-negatív ipRGC-k fényinformációt szolgáltatnak az SCN-nek a fotoentrainmenthez (Chen és mtsai., 2011). Az M1-ek mind a ganglionsejt-rétegben (GCL), mind a belső magvas rétegben (INL) megtalálhatók, ahol "displaced" M1 ipRGC-knek nevezik őket. Az M2 sejtek nagyobb számával és erősebben elágazó dendritfával rendelkeznek, mint az M1-ek (Schmidt & Kofuji, 2009; Berson és mtsai., 2010; Ecker és mtsai., 2010), de lényegesen kisebb amplitúdójú saját fényválaszokat mutatnak, és kevésbé érzékenyek, mint az M1-ek (Schmidt & Kofuji, 2009). Kimutatták, hogy néhány rostot az SCN-be, de túlnyomórészt az OPN-be vetítenek, ami arra utal, hogy nagyobb szerepet játszanak a pupilla fényreflexében, mint a többi típus (Baver és mtsai., 2008). Az M3 sejtek az M2 sejtekhez hasonló méretű és összetettségű szómát és dendriteket mutatnak (Schmidt & Kofuji, 2011). Az M4 sejtek sustained ON-típusú alfa ganglionsejtek, amelyek elsődleges szerepet játszanak a kontrasztérzékelésben a képalkotó látásban. A melanopszin jelenléte ezekben a sejtekben formálja és optimalizálja a pálcika és csap vezérelt válaszokat (Sonoda és mtsai., 2018). A leírt ipRGC-k közül ezeknek a sejteknek van a legnagyobb számjuk és nagy, erősen elágazó dendritikus fájuk. Az M5 sejtek kicsi, erősen elágazó dendritikus ágakkal rendelkeznek, amelyek egyenletesen oszlanak el a szóma körül, és kimutatták, hogy szín opponenciát mutatnak (Stabio és mtsai., 2018). Az M6 sejtek rendelkeznek a legkisebb dendritikus mezőkkel, tüskés, bőségesen elágazó dendritikus arborral. Az M6 sejtek bisztratifikáltak, és rekurrens dendritekkel rendelkeznek, amelyek az OFF sublamina-ban megtett rövid távolság megtétele után visszatérnek az ON sublamina rétegződéséhez. Axonjaik a dLGN-be vetülnek, ami arra utal, hogy hozzájárulhatnak a látás mintázat-felismerő funkcióhoz (Quattrochi és mtsai., 2019).

Az RGC-k általában a retina legbelső magrétegében, a GCL-ben helyezkednek el (ortotóp RGC-k, oRGC-k). Vannak azonban olyan RGC-k, amelyek elmozdultak, és a belső rostos rétegben vagy a belső magvas rétegben helyezkednek el. Ezeket az RGC-ket Dogiel (1895) írta le először a madarak retináján, és elmozdult RGC-knek (dRGC-k) nevezte őket. Funkciójukat, projekcióikat és retina topográfiájukat alaposan tanulmányozták madarakban (Karten és mtsai., 1977; Fite és mtsai., 1981; Mey & Johann, 2001) és hüllőkben (Bellintani-Guardia & Ott, 2002). A galambban, a csirkében és a kaméleonban a dRGC-k csak az nBOR-ra (nucleus bazális gyökér, a járulékos látómagok része), és az optokinetikus nistagmust irányítják (Simpson, 1984; Cook &

Podugolnikova, 2001). Az emlősökben azonban az járulékos látó-magokba csak az oRGC-k vetülnek (Dann & Buhl, 1987; Cook & Podugolnikova, 2001), míg az egerekben és a nyulakban a dRGC-k főleg a colliculi superiorra vetülnek (Dräger & Olsen, 1980, 1981; Vaney és mtsai.,1981; Balkema & Dräger, 1990). A dRGC-k funkciója emlősökben ismeretlen. Azt feltételezik, hogy inkább egy ontogenetikai rendellenesség következtében helyeződtek el, minthogy az RGC-k egy független funkcionális osztályát képviselnék (Buhl és Dann, 1988; Doi és mtsai.,1994). Eloszlásukat tekintve nyulakban és patkányokban a dRGC-k az egész retinában megfigyelhetők, de előfordulásuk a perifériára irányul (Robson & Hollander, 1984; Liu & Jen, 1986). Egérben és kínai hörcsögben a perifériás és temporális retinában gyakoribbak (Dräger & Olsen, 1980; Doi és mtsai., 1994), míg majomban a peripapilláris régió körül a legsűrűbbek (Bunt & Minckler, 1977). Dolgozatomban ezen kérdést is körbejárom.

2. Célkitűzések

Célunk annak meghatározása, hogy...

1. Az egér (*Mus musculus*) retinában a displaced dúcsejtek regionálisan milyen eloszlásbeli különbséget mutatnak
2. Kimutatni más emlősök (hőrcsög, makákó, humán) retinájában a displaced dúcsejtek jelenlétét
3. A displaced dúcsejtek morfológiai és funkcionális csoportosításának felvázolása

3. Anyag és módszer

3.1. Állatok és preparáció

Az egereket Forane (isofluran 4%, 100 μ L/ 1L) inhalációjával helyeztük mélyaltatásba, majd nyaki diszlokációval termináltuk őket. Az egerek (*Mus musculus*, GCaMP3Thy1, JAX #017893, n=4) szemei ezt követően egyből eltávolításra kerültek. A szemgolyókon az ora serrata mentén készült bemetszés, majd eltávolításra kerültek a szemlencsék. Az így elkészült szemserlegeket 4%-os paraformaldehidben (0,1M; pH 7,4) fixáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. A fixálás után háromszor 10 perc PBS-es (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄*7H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4) mosás következett, majd ezután került sor a retinák eltávolítására a szemserlegekből, az eltávolítás során az érhártya mintázatának figyelembevételével a dorzális oldal és topografikus területek jelölésre kerültek (a részletekért lásd Kovács-Öller 2020). Kísérleteink a Pécsi Tudományegyetem Állatetikai Bizottsága (BA02/2000-6/2006) által kerültek jóváhagyásra. Az állatok kezelése megfelelt az “ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research” feltételeinek.

A hőrcsög (*Mesocricetus auratus*) szemeket a PTE-SZKK Virologiai Kutatócsoport (Dr. Madai Mónika) adományozta. Ezek nem kezelt kontroll állatokból származtak, ahol a szemserlegeket az egerekével megegyező módon preparáltuk. A rézuszmajom (*Macaca mulata*) retina szintén szövetdonációból származott, amelyet a PTE, Grastyán Endre Transzlációs Kutatóközpontban euthanizált majomból származik, amelyet 4% PFA-val perfundáltak, majd a bal szemserleget kaptuk meg, ahol a teljes (whole-mount) retinán

végeztük az IHC-t SMI32, Mel, és S-opszinn markerekkel (lásd 1. táblázat). A Humán retina csíkokat Dr. Kántor Orsolya a (SOTE, Anatómiai Intézet) adományozta. Az etikai engedély száma: TUKEB58/2014. (Kántor és mtsai, 2018).

3.2. Immunhisztokémia

Az eltávolított retinákat 2-3 µL CTA-val (5% Chemiblocker, 0,5% TritonX-100, 0,05% Na-azid) blokkoltuk. A blokkolás után került sor az elsődleges antitestekkel való kezelésre (1. táblázat), az antitesteket CTA-val hígítottuk, majd 48 órán át inkubáltuk a retinákat. Az inkubáció után háromszor 10 perces mosás következett, majd ezután kerülhetett sor a másodlagos antitestekkel történő jelölésre (1.táblázat) CTA-val hígítva, majd 24 órán át inkubáltuk őket. Ezután háromszor 10 perces PBS-es mosást követően Vectashield beágyazó médiummal (Vector Laboratories, Peterborough, Nagy-Britannia) lefedtük őket.

1.táblázat. Antitestek.

Elsődleges antitestek				Másodlagos antitestek			
Név	Hígítás	Gyártó	Kód	Név	Hígítás	Gyártó	Kód
gp NeuN	1000x	SySy	266 004	DL405	500x	Jackson	706-475-148
ms SMI32	1000x	Calbiochem	NE1023				
rb Mel	500x	AbCam	AB-N39-ATS	Cy3	500x	Jackson	715-165-150
rb S-opszin	1500x	Merck	ABN1660				
ck BIII-Tub	1000x	Novus	NB100-1612				
rb RBPMS	2000x	Abcam	ab152101	A647	500x	Invitrogen	A21245
gt ChAT	1000x	ThermoFischer	PA1-4710				

3.3. Konfokális mikroszkópia

Az immunhisztokémiai jelek detektálását LSM 710 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal végeztük. A méréseket 405, 488, 543 és 633 nm-es lézereket használva végeztük Zeiss Plan Apochromat 10x, 20x levegős és 63x olaj-immersiós objektívet használva, mintáinkról a detektálás során 1.5 (20x) és 0,5 (63x) μm vékony optikai metszeteket készítettünk. Az utómunkálatok során a képek kontrasztjának és fényerejének beállítására az ImageJ (FIJI-ImageJ 1.53 disztribúció, NIH, USA) programot alkalmaztuk és csak globálisan állítottunk a fenti tényezőkön.

3.4. Ca^{2+} -képalkotás 2-foton mikroszkópiával

A Ca^{2+} -képalkotási kísérletek GCamp3Thy1 transzgenikus egérvonalból származó állatokon végeztük. Carbogénnel (95% O_2 , 5% CO_2) telített Retina Ringerrel perfundált (~ 2 ml/p) ex vivo, teljes, whole-mount retinán történtek a Ca^{2+} képalkotó kísérleteket, FemtoSmart kétfoton mikroszkóppal (Femtonics, Budapest) és Olympus PlanApo 20x/0.8 NA vízimmersziós objektívvel.

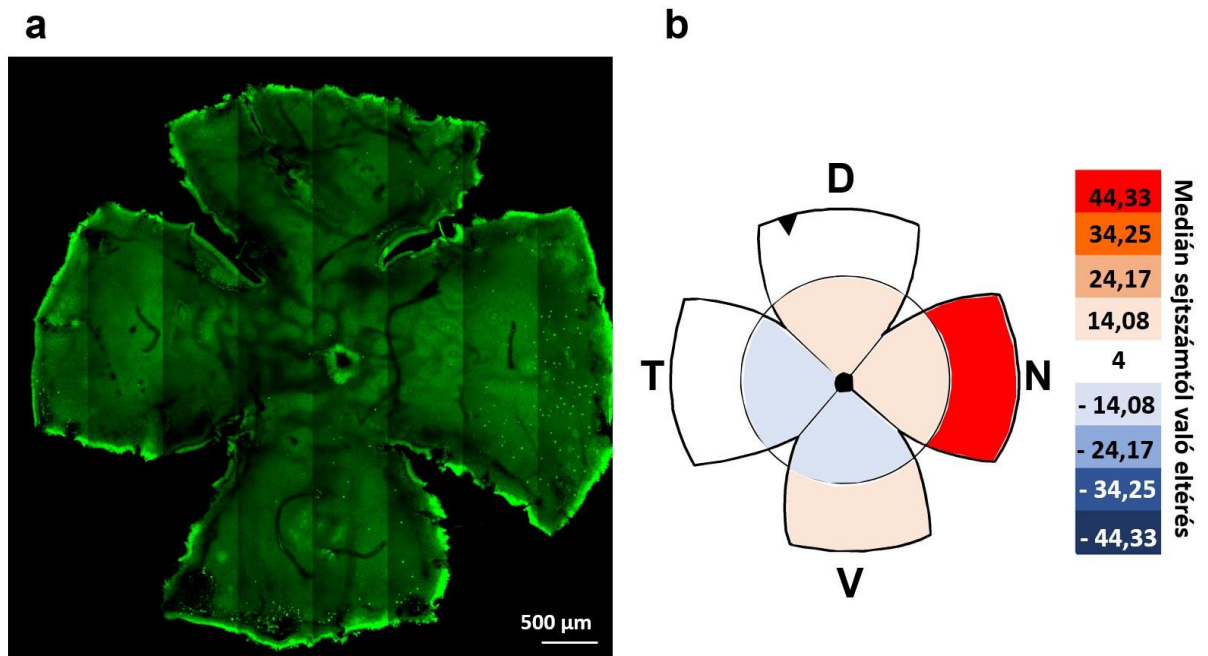
A midcentrális régióból (a vakfolt és retinaszél közötti felezőn) választott dpGC-k sejtestjein végeztünk 90-130 Hz-es mintavételezéssel Ca^{2+} szignál mérést, amelynek az átlagát vetítettük hisztogramra.

Az excitációs protokollt úgy állítottuk be, hogy 0,5 s-ig a lézer kikapcsol és a teljes spektrumos LED ezt követően bekapcsol, majd LED kikapcsolásával szinkronizáltan a lézer és a Photomultiplier (PMT, detektor) bekapcsolnak 2,5 s-ig, ezzel lehetővé téve az OFF-válasz felvételét, majd ezt megismételjük egy sötét állapotból lézer bekapcsolással, ahol az ON-jelet detektálhatjuk.

4. Eredmények és kiértékelésük

4.1. Displaced ganglionsejtek egér retinában

A displaced ganglionsejtek jelenlétének kimutatását először a Thy1 pán-RGC marker jelenlétének vizsgálatával kezdtük. Az INL-ben megtalálható displaced RGC-k száma elenyészőnek bizonyult.



2. ábra A displaced ganglionsejtek GCamp3Thy1 transzgenikus egérben. Az (a) panelen Thy1 pozitív dpGC-k láthatóak az IPL-ben 10x-es objektívvel szkennelve konfokális mikroszkópban. A (b) panelen a Thy1 pozitív sejtek regionális eloszlása látható a medián régióként talált sejtszámtól (med=4) való eltéréssel szemlélítve.

4.2. A displaced ganglionsejtek jelenlétének kimutatása más emlősökben

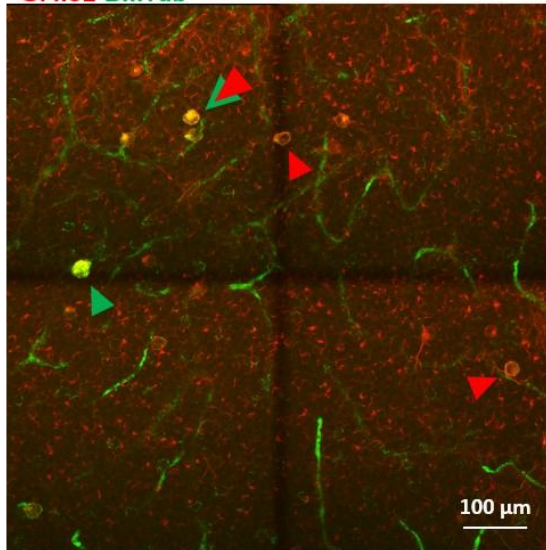
Az egerekben történt megfigyeléseink után más emlősök esetében is vizsgálatra kerültek ezen sejtípusok. Először az egérhez hasonló taxonómiai besorolásba tartozó, szintén rágszáló aranyhörcsög (*Mesocricetus auratus*) esetében fedeztünk fel displaced ganglionsejteket az INL-ben (3. ábra (a)). Melyek SMI32 és B-III tubulin pozitivitást mutattak, ezzel is megerősítve.

Ezek után rézuszmajom (*Macaca mulatta*) és humán minták esetén vizsgáltuk ezen sejtek előfordulását. A rézuszmajom esetében talált displaced sejt (3. ábra b.) SMI32 pozitív, emellett azonban a melanopszinra is pozitív jelölődést mutatott. Humán minták

(3. ábra c) esetében szintén felfedeztünk displaced ganglionsejt jelenlétét, mely az RBPMS pán-RGC markerre és SMI32 markerre mutatott pozitivitást.

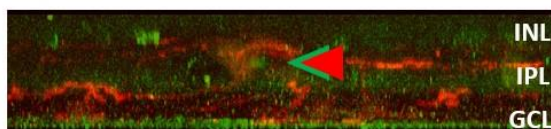
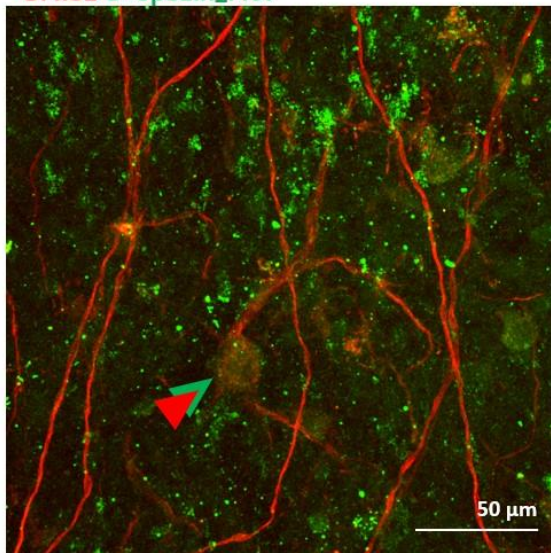
a Aranyhőrcsög (*Mesocricetus auratus*)

SMI32 BIIIITub



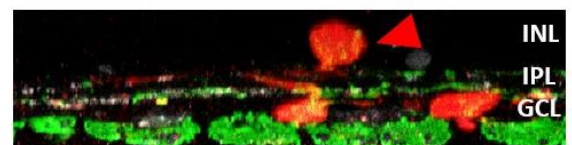
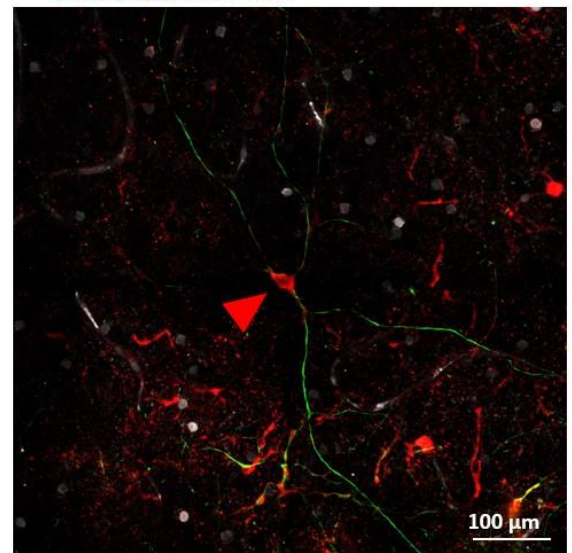
b Rézuszmajom (*Macaca mulatta*)

SMI32 S-opszin_Mel



c Humán (*Homo sapiens*)

SMI32 RBPMS ChAT

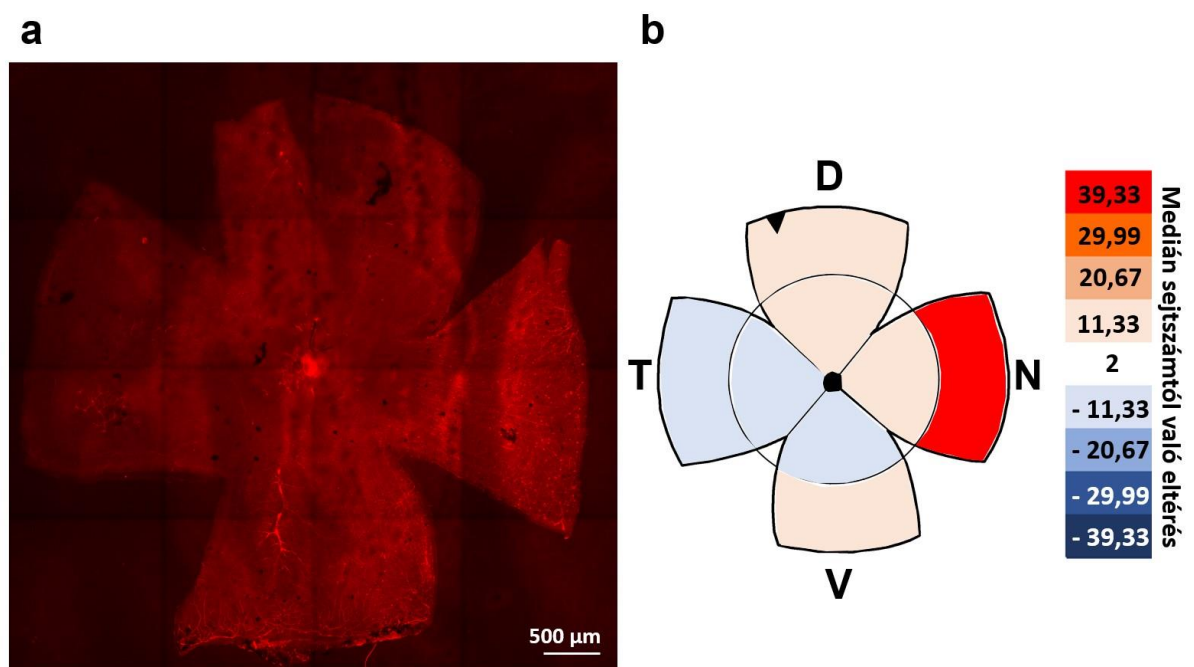


3. ábra A displaced ganglionsejtek jelenléte emlősökben. Az ábra (a) paneljén aranyhőrcsög (*Mesocricetus aureatus*) retina INL rétegéből készült 20x-os objektívvel készült konfokális mikroszkóp szkennelhető dpGC-kről (a képen látható színek megegyeznek a kép fölötti jelölés színeivel). Az ábra (b) paneljén rézuszmajom (*Macaca mulatta*) retinából származó 63x-os objektívvel készült konfokális mikroszkóp szkennelhető, alatta pedig ugyanezen régió

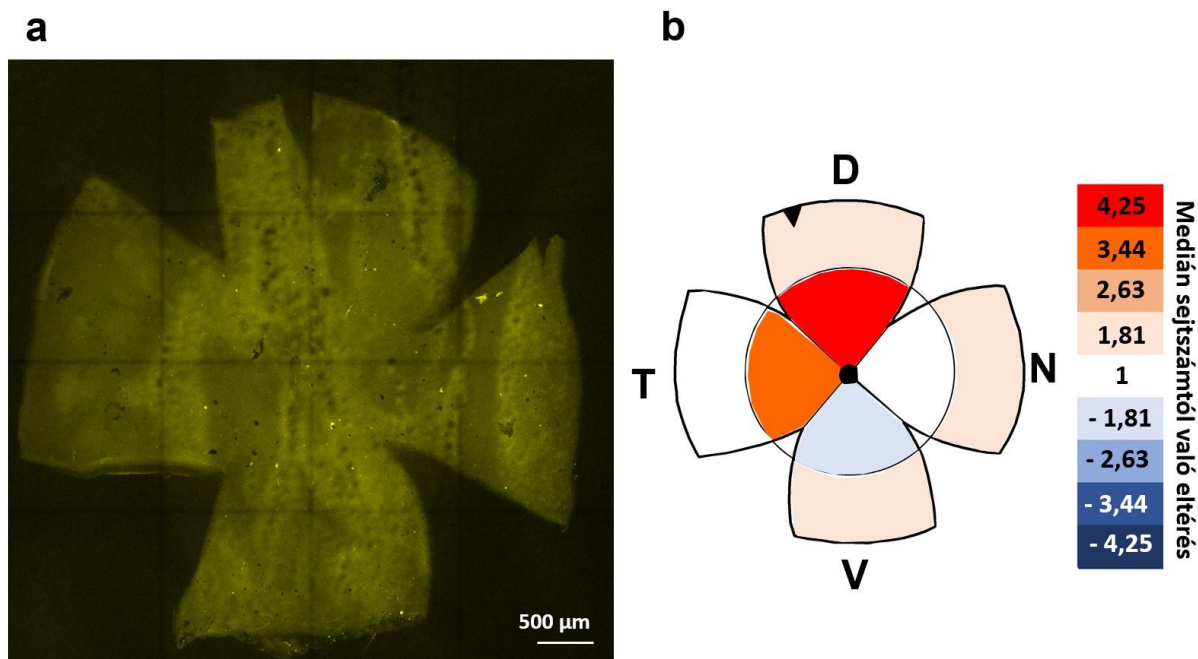
hosszmetszeti elforgatása, melyen látható, hogy a dpGC az IPL-ben helyezkedik el (a képen látható színek megegyeznek a kép fölötti jelölés színeivel). A (c) panelen humán mintából származó 63x-os objektívvel készült konfokális mikroszkóp szkennelhető egy dpGC-ről, mely az alatta látható hosszsmetszeti elforgatáson is láthatóan a GCL-en kívül helyezkedik el (a képen látható színek megegyeznek a kép fölötti jelölés színeivel).

4.3. A displaced ganglionsejtek regionális eloszlása egérben

A displaced ganglionsejtek jelenlétének kimutatása után regionális eloszlásuknak vizsgálata volt a következő fő célunk. Thy-1 és SMI32 markerek esetében azt tapasztaltuk, hogy a displaced sejtek a nazális periférián fordulnak elő nagyobb gyakoriságban (2. ábra, 4. ábra, 6. ábra). Azonban a melanopszin pozitív displaced sejtek esetében nem ez a tendencia volt jellemző (5. ábra), ezen displaced sejtek a dorzális centrális régióban fordultak elő legnagyobb számban az egér retinában.



4. ábra SMI32 pozitív displaced ganglion sejtek regionális eloszlása egér retinában. Az (a) panelen SMI32 pozitív dpGC-k láthatóak az IPL-ben 10x-es objektívvel szkennelve konfokális mikroszkópban. A (b) panelen a SMI32 pozitív sejtek regionális eloszlása látható a medián régióként talált sejtszámtól (med=2) való eltéréssel szemlélítve.



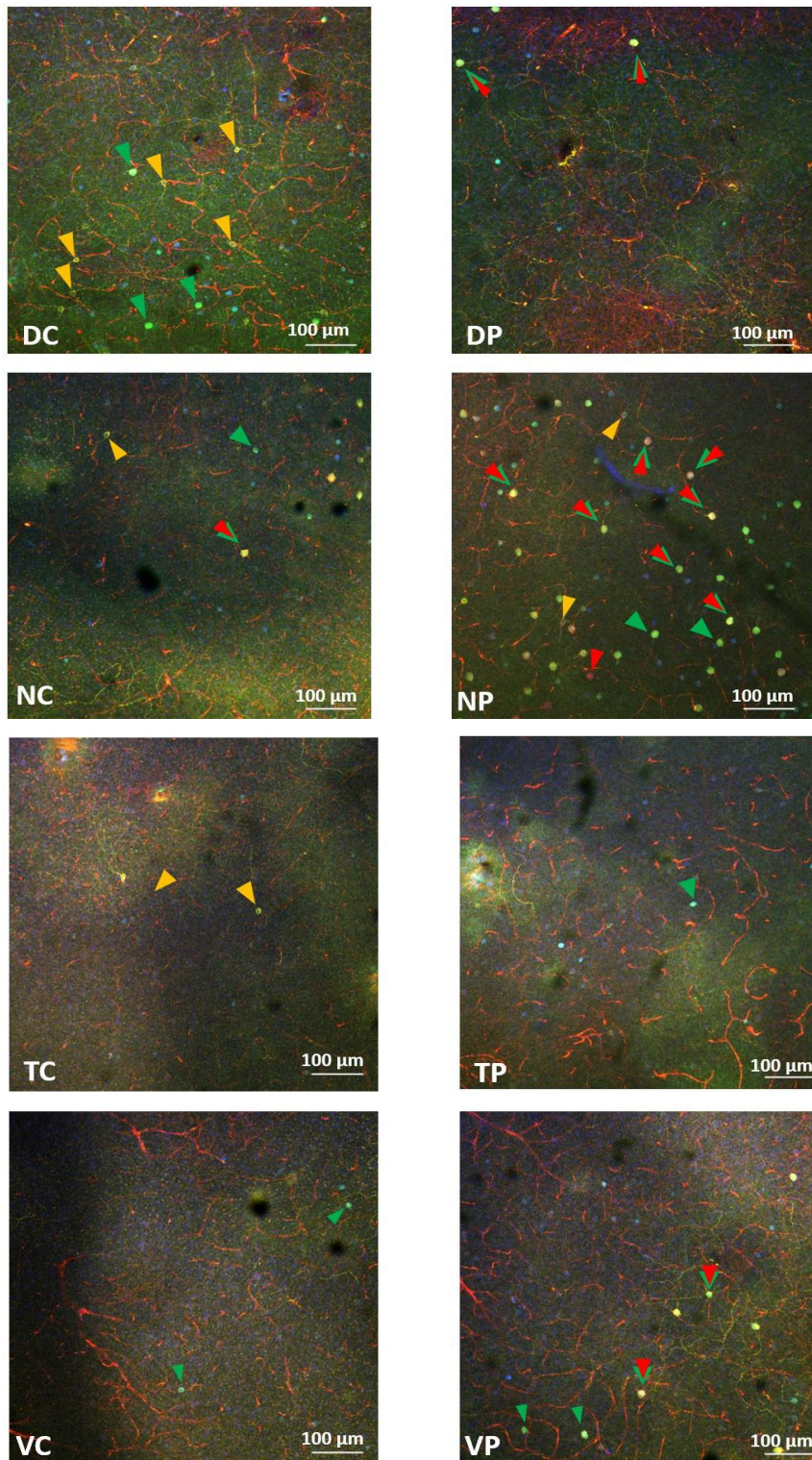
5. ábra Melanopszin pozitív displaced ganglionsejtek regionális eloszlása egér retinában.

Az (a) panelen melanopszin pozitív dpGC-k láthatóak az IPL-ben 10x-es objektívvel szkennelve konfokális mikroszkópban. A (b) panelen a melanopszin pozitív sejtek regionális eloszlása látható a medián régióként talált sejtszámtól ($\text{med}=1$) való eltéréssel szemlélítve.

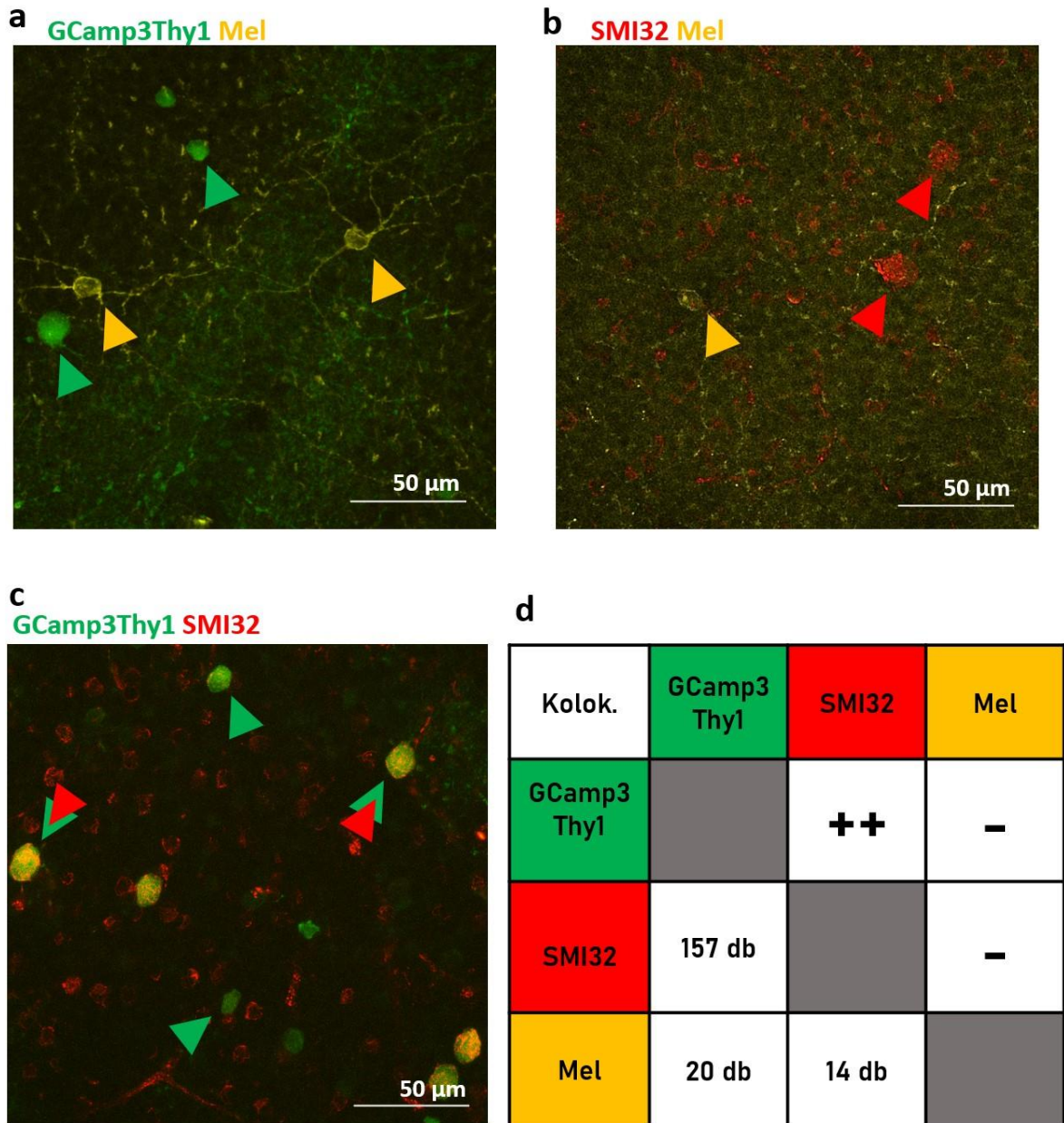
Látható tehát, hogy a Mel+ és SMI+ dpGC-k előfordulása jól elkülönül. a Thy1+ dpGC-k hasonlóan helyezkednek el, mint az SMI32+, azonban azt elmondhatjuk, hogy a Mel-nal nem kollokalizál (6, 7. ábra). NeuN pán-neuronális markert használva nem láttunk más hasonlóan nagy (9-14 μm) GC-szómaméretel rendelkező displaced sejtet (nem mutatva itt), ami azért fontos, mert sikerült így ezzel a 3 markerrel lefednünk a teljes dpGC populációt.

Az egyéni kollokalizációkat megvizsgálva azt láthatjuk, hogy az SMI32, valamint a Thy1 és Mel markerek között nincs kolokalizáció. A (7a,b ábra), míg az SMI32 és Thy1GCaMP3 között nagymértékű kolokalizációt figyelhetünk meg (7c ábra).

GCaMP3Thy1 SMI32 MeI NeuN



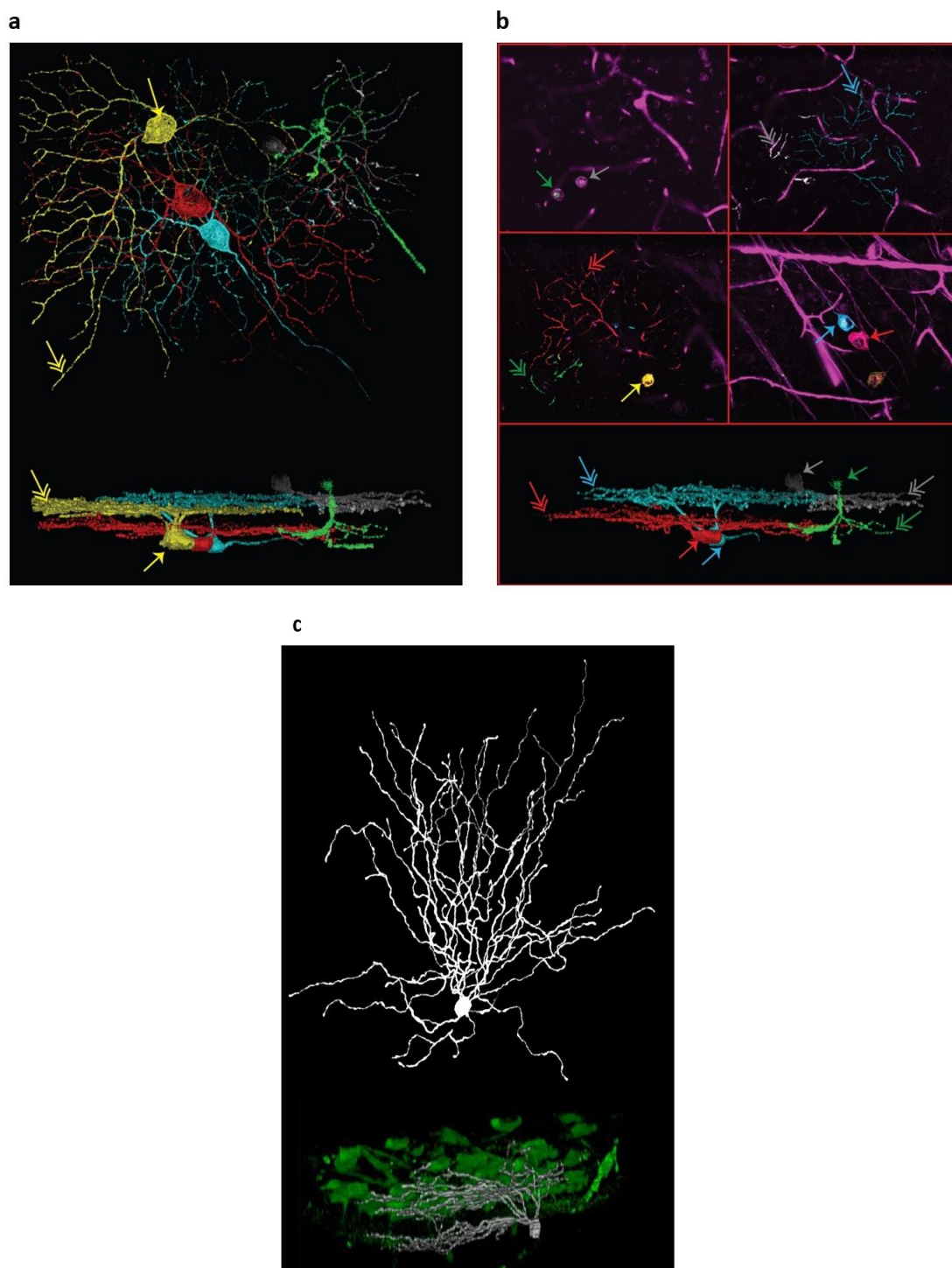
6. ábra A belső rostos rétegben található displaced ganglionsejtek régióként. Az ábrán 20x-os objektívvel konfokális mikroszkóppal szkennelt dpGC-k láthatóak régióként. Az adott régió rövidítése a szkennet jobb alsó sarkában vannak feltüntetve: DC - dorsális centrális, DP- dorsális perifériális, NC- nazális centrális, NP-nazális perifériális, TC- temporális centrális, TP- temporális perifériális, VC- ventrális centrális, VP- ventrális perifériális (a képen látható színek megegyeznek a kép fölötti jelölés színeivel).



7. ábra Thy1, SMI32 és Mel markerek kolokalizációja displaced ganglionsejteken. Az ábra (a) paneljén 63x-os objektívvel készült konfokális mikroszkóp szkennelésről, ahol a Thy1 és Mel markerek között nincs kolokalizáció. A (b) panelen 63x-os objektívvel készült konfokális mikroszkóp szkennelésről, ahol SMI32 és Mel markerek között nincs kolokalizáció. A (c) panelen 63x-os objektívvel készült konfokális mikroszkóp szkennelésről, ahol a Thy1 és SMI32 markerek együttes expressziója látható. (a képen látható színek megegyeznek a kép feletti jelölés színeivel). A (d) panelen látható az összes megszámlált dpGC (n= 305) közül milyen mértékű volt a kolokalizáció használt markereink között (+++: magas kolokalizáció (>80%), ++: közepes kolok. (40-79%), +: alacsony (10-39%), -: nincs (<10%))

4.4. Displaced ganglionsejtek morfológiai csoportosításának felvázolása

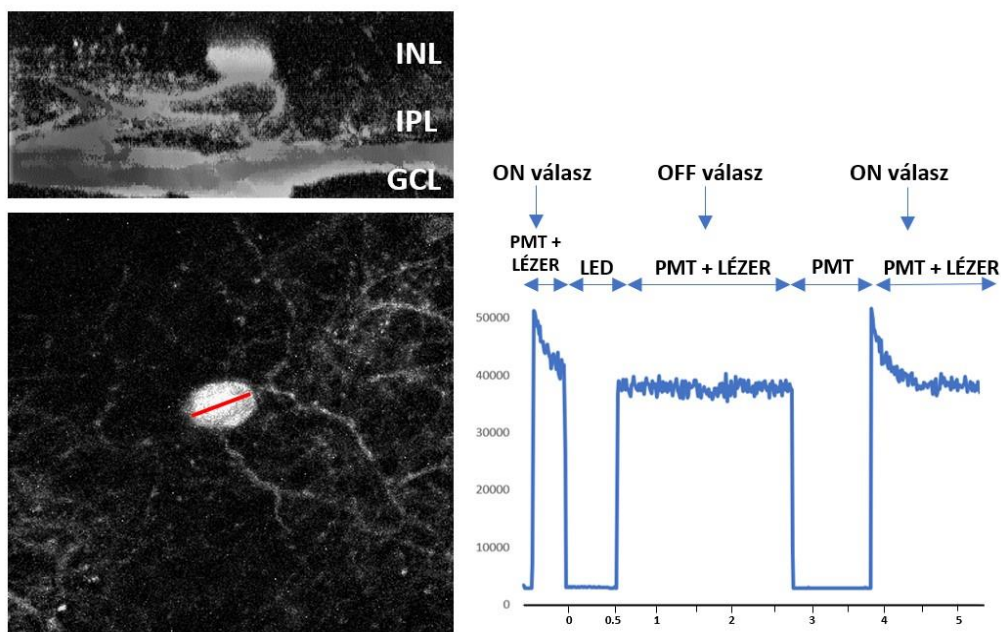
A 8. ábra (a) paneljén displaced dúcsejtek rekonstrukciója látható konfokális mikroszkóp szkenn alapján, melyen a sárgával és sárga nyíllal jelölt sejt dendritjei az IPL OFF szublamínájába nyúlnak át, vagyis morfológiai szempontból szintén OFF-típusba sorolható. A 8. ábra (b) paneljén ON típusú dpGC-k és GC-k láthatóak, melyek dendrit arborizációjuk alapján látható, hogy egy típusba tartoznak, mivel ugyanazon ON alrétegbe nyúlnak dendritjeik. A 8. ábra (c) paneljén, pedig morfológiai szempontból ON-OFF típusba sorolható dpGC fedezhető fel.



8. ábra Displaced dúcsejtek morfológiai rekonstrukciója. Az ábra (a) paneljén rekonstruált displaced dúcsejt csoport látható. Sárga nyíllal jelölt sejt OFF típusú. A (b) panelen konfokális mikroszkópai felvételek és rekonstrukciójuk láthatóak dpGC-kről és oGC-kről, piros és kék nyíllal jelölt sejtek oGC-k, zöld és szürke nyíllal jelölt sejtek dpGC-k. A (c) panelen egy feltöltött ON-OFF dpGC és rekonstrukciója látható

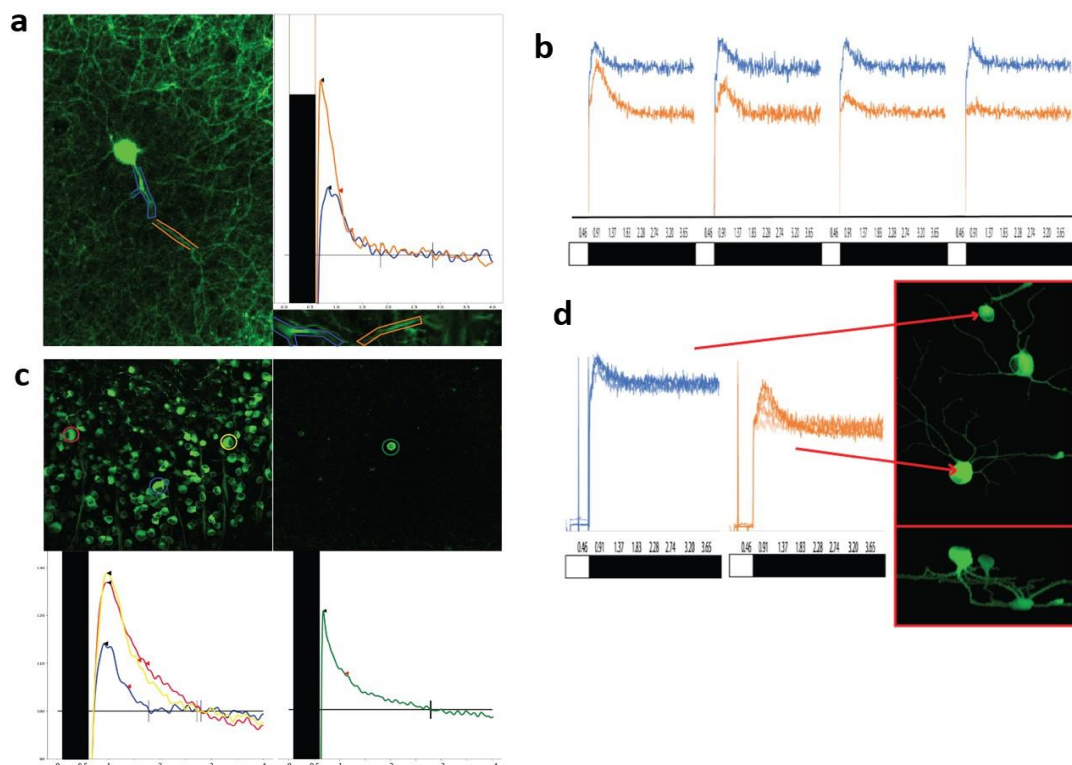
4.5. Displaced ganglionsejtek funkcionális csoportosítása

A displaced ganglionsejtek fénystimulusra adott válaszuk alapján történő csoportosítás elvégzése során ON- és OFF-típusú sejteket tudtunk elkülöníteni 2-foton mikroszkópiát használva (9. ábra, 10. ábra), amelynek az előnye, hogy a dpGC-k szómái közvetlenül mérhetőek és a gerjesztő lézer nem vált ki közvetlen fényválaszt, azonban a fluoroforok gerjesztése másodlagos foton-emissziót eredményez, amelyet a retina fotoreceptorai látnak, ezért a LED/2P lézer nagy intenzitáskülönbségét felhasználva tudtunk az intenzitáscsökkenés miatt OFF válaszokat vizualizálni.



9. ábra ON displaced ganglionsejt fényválasza Ca^{2+} -képalkotás 2-foton mikroszkópiával vizsgálva. Balra fenn X-tengely elforgatott sejt oldalnézete, lent a felülnézetben a dpGC és dendritfája, míg jobbra a Ca^{2+} fényválasz átlag Gray-intenzitás értékei horizontális időskálán, és a kísérleti protokoll sémája.(piros vonal= 20,23 μm)

A 9. ábrán egy tipikus dpGC sejt morfológiát mutatunk be. A szóma mérete és a dendritfa morfológiája egyértelműen ON-a-dpGC-re mutat, a Ca^{2+} képalkotással mért fényválasz ennek megfelelően ON. A 10. ábrán egy hasonlóan aGC morfológiát mutató sejtről készült 2-foton felvétel látható, ahol a már leírt módon OFF fényválaszt tudtunk kimutatni. A posthoc konfokális felvételen kivehető az OFF-a-dpGC morfológia, ami alátámasztotta a Ca^{2+} -képalkotó mérésünket.



10. ábra Displaced ganglionsejtek OFF-fényválaszának vizsgálata 2-foton mikroszkópiával. Az (a) panel tartalmazza egy dpGC sejtet, mellette a szómájáról és axonjáról mért Ca^{2+} fényválasz átlag Gray-intenzitás értékei horizontális időskálán. A (b) panel további dpGC-kről mért OFF Ca^{2+} fényválasz átlag Gray-intenzitás értékei horizontális időskálán látható. A (c) panel egy oRGC és dpGC Ca^{2+} fényválasz átlag Gray-intenzitás értékeit mutatja horizontális időskálán. A (d) panel a piros nyilakkal jelzett dpGC-k és hozzájuk tartozó OFF fényválasz Gray-intenzitás értékeit tartalmazza horizontális időskálán ábrázolva.

5. Összefoglalás

Munkánkban először kerül részletes leírásra az egérben található dpGC populáció topográfiai leírása. Nadal-Nicolás és mtsai (2014) végeztek hasonló kutatást a dpGC-k körében, azonban az ő megfigyeléseik pigmentált és albínó patkányokon zajlott. Vizsgálataik során pán-RGC markernek ők a Brn3 család tagjait használták fel, míg mi a Thyl markert használtuk, azonban mindkét marker hasonló eredményességgel képes jelölni az RGC-ket így eredményeink összehasonlíthatóak. Patkányok esetében a dRGC-k a temporális retina részen fordultak elő legnagyobb gyakoriságban, a vizsgált össz sejtszámuk alapján, a dpGC-k 50% volt jelen ezen a régióban, 20-20% a nazális és ventrális, és 10% a dorzális régióban volt megtalálható mind a pigmentált, mind az

albínó állatok esetében. Ezzel szemben a mi esetünkben egerekben a nazális periférián volt megfigyelhető a dpGC-k többsége. Dräger és Olsen (1981) korábbi egér retinális GC topográfiai vizsgálatukban mely során HRP injekció után vizsgálták a sejtek eloszlását, már kerültek leírásra dpGC-k azonban az ő találasukkal részben ellentmondásban állnak a mi adataink, mivel ők a temporális régióban írtak le több dpGC-t, ahol lazábban, szétszóródva voltak megtalálhatóak, míg a második legtöbb sejtet a nazális régióban találták, ahol szorosan csoportosultak a periférián.

Nadal-Nicolás és mtsai (2014) a melanopszin pozitív dpGC sejtek eloszlását is vizsgálták patkányban munkájuk során. Albínó állatok esetében a dorzális régióban találták a Mel⁺ dpGC populációt legnagyobb mennyiségben, mint ahogy az a Mel⁺ oRGC-k esetében is már leírásra került (Hughes és mtsai., 2013; Valiente-Soriano és mtsai., 2014), azonban pigmentált állatok esetében a hemitemporális félteken volt a legdenzebb ezen sejtek populációja. A mi esetünkben pigmentált állatoknál is a dorzális régióban volt a legmagasabb a Mel⁺ dpGC-k száma, ezután következett csak a temporális régió. Sejttest méréseik alapján, leginkább M1- és M2-szerű ipRGC-ket találtak a dpGC populáció tagjai között.

Brn3 és Mel kolokalizáció vizsgálata során az ő esetükben is nagyon alacsony kolokalizációs mértéket (5 és 11 sejt) találtak, mely hasonló a mi esetünkben leírt Thy1 és Mel marker között.

M4-es típusú ipRGC az alfa-RGC-k csoportjába is tartozik, azonban nagyon alacsony melanopszin tartalma miatt a melanopszin immunhisztokémiai markerre nem mutat pozitívítást (Vidal-Villegas és mtsai., 2019, 2021a,b), csak SMI32-re rácsálókban. Ezen sejtek további vizsgálatához a Mel helyett egy másik marker segíthet, a Tbr2 (Gallego-Ortega, 2021). Azonban vizsgálataink a makákóból származó mintánk esetében sikeresen azonosítottunk be SMI32 és Mel pozitív dpGC-t, mely korábban még nem került leírásra.

Az alfa-dpGC-k populációjának vizsgálatára még nem esett eddig fókusz a tudományban, a mi kezdeti eredményeink, pedig arra a konszenzusra mutatnak, hogy a nazális régióban található legdenzebb populációjuk, mely megegyezik az alfa-oRGC-k találatokkal (Bleckert, 2014).

A dpGC-ket korábbi kutatások ontogenetikus hibáknak vélték emlősökben, mivel altípusaik megegyeznek az oRGC-k altípusaival, emellett pedig a dendritikus lefedettségük nem bizonyul elég magasnak, hogy külön funkcionális altípusnak lehessen minősíteni (Dräger & Olsen, 1980; Liu & Jen, 1986; Buhl & Dann, 1988; Balkema & Dräger, 1990; Doi és mtsai, 1995). Azonban Kisseleff és munkatársainak (2021) eredményei arra, hogy a glikogén szintáz kináz 3-k (GSK3) lehetnek az első determinánsai a dRGC-k fejlődésének alakulásában a retinában. Kutatásuk során megállapították, hogy a dRGC-k számában növekedés tapasztalható abban az esetben, ha a Gsk3a egyetlen példánya jelen van a retinális progenitorokban.

Morfológiai és funkcionális klaszterezési vizsgálataink egyedinek számítanak dpGC-k esetében, mivel korábban hasonló kutatási irányok nem zajlottak, főleg ezen sejtek fényválaszának vizsgálata nehezebb megközelítésük miatt.

6. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Kovács-Öller Tamásnak, aki munkám során végig a segítségemre volt, és aki nélkül ez a kutatás és pályamunka nem készülhetett volna el.

Köszönöm Prof. Völgyi Bélának és a PTE-SZKK Retinális Neurobiológiai Kutatócsoport tagjainak, különösképpen Szarka Gergely PhD hallgatónak a segítséget.

Köszönöm a mintákat Dr. Madai Mónikának, PTE-SZKK Virologiai Kutatócsoport és Dr. Kántor Orsolyának (korábban SOTE, Anatómiai Int.).

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-22-2-III. kódszámú Új Nemzeti Kiválósági Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

7. Irodalomjegyzék

- Allen, A.E., Storch, R., Martial, F.P., Petersen, R.S., Montemurro, M.A., Brown, T.M., and Lucas, R.J. (2014). Melanopsin-driven light adaptation in mouse vision. *Curr Biol* 24, 2481-2490.
- Badea TC, Cahill H, Ecker J, Hattar S, Nathans J. 2009. Distinct roles of transcription factors Brn3a and Brn3b in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron* 61:852–64,
- Balkema, G.W., and Dräger, U.C. (1990). Origins of uncrossed retinofugal projections in normal and hypopigmented mice. *Vis. Neurosci.* 4, 595–604. doi: 10.1017/S0952523800005794
- Balkema, G.W., and Dräger, U.C. (1991). Impaired visual thresholds in hypopigmented animals. *Vis. Neurosci.* 6, 577–585. doi:10.1017/S0952523800 00256X
- Barlow HB, Hill RM, Levick WR. 1964. Retinal ganglion cells responding selectively to direction and speed of image motion in the rabbit. *J. Physiol.* 173:377–407;
- Barnstable CJ, Dräger UC. 1984. Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 11:847–55

- Baver, S.B., Pickard, G.E., Sollars, P.J., and Pickard, G.E. (2008). Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur J Neurosci* 27, 1763-1770.
- Baver, S.B., Pickard, G.E., Sollars, P.J., and Pickard, G.E. (2008). Two types of melanopsin retinal ganglion cell differentially innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the olivary pretectal nucleus. *Eur J Neurosci* 27, 1763-1770.
- Bellintani-Guardia, B., and Ott, M. (2002). Displaced retinal ganglion cells project to the accessory optic system in the chameleon (*Chamaeleo calyptratus*). *Exp. Brain Res.* 145, 56–63. doi:10.1007/s00221-002-1091-z
- Berg, D. J., Kartheiser, K., Leyrer, M., Saali, A., and Berson, D. M. (2019). Transcriptomic signatures of postnatal and adult intrinsically photosensitive ganglion cells. *eNeuro* 6:ENEURO.0022–19.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0022-19.2019
- Berson, D.M., Castrucci, A.M., and Provencio, I. (2010). Morphology and mosaics of melanopsin expressing retinal ganglion cell types in mice. *J Comp Neurol* 518, 2405-2422.
- Berson, D.M., Dunn, F.A., and Takao, M. (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 295, 1070-1073.
- Biorender, <https://app.biorender.com>
- Blandford SN, Hooper ML, Yabana T, Chauhan BC, Baldrige WH, Farrell SRM. Retinal Characterization of the Thy1-GCaMP3 Transgenic Mouse Line After Optic Nerve Transection. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019 Jan 2;60(1):183-191. doi: 10.1167/iovs.18-25861.
- Bleckert, A., Schwartz, G.W., Turner, M.H., Rieke, F., and Wong, R.O. (2014). Visual space is represented by nonmatching topographies of distinct mouse retinal ganglion cell types. *Curr. Biol.* 24, 310–315. doi:10.1016/j.cub.2013. 12.020
- Buhl, E.H., and Dann, J.F. (1988). Morphological diversity of displaced retinal ganglion cells in the rat: a lucifer yellow study. *J. Comp. Neurol.* 269, 210–218. doi: 10.1002/cne.902690206

- Bunt, A.H., and Minckler, D.S.(1977). Displaced ganglion cells in the retina of the monkey. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 16, 95–98.
- Chen, C. K., Kiyama, T., Weber, N., Whitaker, C. M., Pan, P., Badea, T. C., et al. (2021). Characterization of Tbr2-expressing retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 529, 3513–3532. doi: 10.1002/cne.25208
- Cleland, B. G., and Levick, W. R. (1974a). Brisk and sluggish concentrically organized ganglion cells in the cat’s retina. *J. Physiol.* 240, 421–456. doi: 10.1113/jphysiol.1974.sp010617
- Cleland, B. G., and Levick, W. R. (1974b). Properties of rarely encountered types of ganglion cells in the cat’s retina and an overall classification. *J. Physiol.* 240, 457–492. doi: 10.1113/jphysiol.1974.sp010618
- Cleland, B. G., Levick, W. R., and Wässle, H. (1975). Physiological identification of a morphological class of cat retinal ganglion cells. *J. Physiol.* 248, 151–171. doi: 10.1113/jphysiol.1975.sp010967
- Cook, J.E., and Podugolnikova, T.A. (2001). Evidence for spatial regularity among retinal ganglion cells that project to the accessory optic system in a frog, a reptile, a bird, and a mammal. *Vis.Neurosci.* 18, 289–297. doi: 10.1017/S0952523801182131
- Dann, J.F., and Buhl, E.H. (1987). Retinal ganglion cells projecting to the accessory optic system in the rat. *J. Comp Neurol.* 262, 141–158. doi: 10.1002/cne.902620111
- Devries SH, Baylor DA. 1997. Mosaic arrangement of ganglion cell receptive fields in rabbit retina. *J. Neurophysiol.* 78:2048–60
- Do, M.T., Kang, S.H., Xue, T., Zhong, H., Liao, H.W., Bergles, D.E., and Yau, K.W. (2009). Photon capture and signalling by melanopsin retinal ganglion cells. *Nature* 457, 281–287.
- Dogiel, A.S.(1895). Die Retina der Vögel. *Anat Entwicklungsgeschichte* 44, 622–648.
- Doi, M., Imatani, H., Sasoh, M., Uji, Y., and Yamamura, H. (1994). Displaced retinal ganglion cells in the Chinese hamster. *Jpn.J.Ophthalmol.* 38, 139–143.
- Doi, M., Uji, Y., and Yamamura, H. (1995). Morphological classification of retinal ganglion cells in mice. *J. Comp.Neurol.* 356, 368–386. doi: 10.1002/cne.903560305

- Dräger, U.C., and Olsen, J.F.(1980). Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J. Comp.Neurol.* 191, 383–412.doi: 10.1002/cne.901910306
- Dräger, U.C., and Olsen,J.F.(1981).Ganglion cell distribution in the retina of the mouse. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 20, 285–293
- Dreher, B., Sefton, A. J., Ni, S. Y., and Nisbett, G. (1985). The morphology, number, distribution and central projections of Class I retinal ganglion cells in albino and hooded rats. *Brain Behav. Evol.* 26, 10–48. doi: 10.1159/000118764
- Duan, X., Qiao, M., Bei, F., Kim, I. J., He, Z., and Sanes, J. R. (2015). Subtype-specific regeneration of retinal ganglion cells following axotomy: effects of osteopontin andmTOR signaling. *Neuron* 85, 1244–1256. doi: 10.1016/j.neuron. 2015.02.017
- Dumitrescu, O.N., Pucci, F.G., Wong, K.Y., and Berson, D.M. (2009). Ectopic retinal ON bipolar cell synapses in the OFF inner plexiform layer: contacts with dopaminergic amacrine cells and melanopsin ganglion cells. *J Comp Neurol* 517, 226-244.
- Ecker, J. L., Dumitrescu,O. N.,Wong, K. Y., Alam, N. M., Chen, S.-K., Legates, T., et al. (2010). Melanopsin-expressing retinal ganglion-cell photoreceptors: cellular diversity and role in pattern vision. *Neuron* 67, 49–60. doi: 10.1016/j.neuron.2010. 05.023
- Estevez, M. E., Fogerson, P. M., Ilardi, M. C., Borghuis, B. G., Chan, E.,Weng, S., et al. (2012). Form and function of the M4 cell, an intrinsically photosensitive retinal ganglion cell type contributing to geniculocortical vision. *J. Neurosci.* 32, 13608–13620. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1422-12.2012
- Euler, T., Haverkamp, S., Schubert, T., and Baden, T. (2014). Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 507–519. doi: 10.1038/nrn3783
- Farrow, K. & Masland, R. H. Physiological clustering of visual channels in the mouse retina. *J. Neurophysiol.* **105**, 1516–1530 (2011).

- Fite, K.V., Brecha, N., Karten, H.J., and Hunt, S.P. (1981). Displaced ganglion cells and the accessory optic system of pigeon. *J. Comp. Neurol.* 195, 279–288. doi: 10.1002/cne.901950208
- Gallego-Ortega, A., Vidal-Villegas, B., Norte-Munoz, M., Salinas-Navarro, M., Avilés-Trigueros, M., Villegas-Perez, M. P., et al. (2021). 7,8-Dihydroxiflavone maintains retinal functionality and protects various types of RGCs in adult rats with optic nerve transection. *Int. J. Mol. Sci.* 22:11815. doi: 10.3390/ijms222111815
- Grunert, U., Jusuf, P.R., Lee, S.C., and Nguyen, D.T. (2011). Bipolar input to melanopsin containing ganglion cells in primate retina. *Vis Neurosci* 28, 39-50.
- Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M., and Yau, K.W. (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295, 1065-1070;
- Hong, Y. K., Kim, I. J., and Sanes, J. R. (2011). Stereotyped axonal arbors of retinal ganglion cell subsets in the mouse superior colliculus. *J. Comp. Neurol.* 519, 1691–1711. doi: 10.1002/cne.22595
- Hoshi, H., Liu, W.L., Massey, S.C., and Mills, S.L. (2009). ON inputs to the OFF layer: bipolar cells that break the stratification rules of the retina. *J Neurosci* 29, 8875-8883.;
- Hughes S, Watson TS, Foster RG, Peirson SN, Hankins MW. Nonuniform distribution and spectral tuning of photosensitive retinal ganglion cells of the mouse retina. *Curr Biol.* 2013 Sep 9;23(17):1696-701. doi: 10.1016/j.cub.2013.07.010.
- Kántor O, Szarka G, Benkő Z, Somogyvári Z, Pálfi E, Baksa G, Rácz G, Nitschke R, Debertin G, Völgyi B. Strategic Positioning of Connexin36 Gap Junctions Across Human Retinal Ganglion Cell Dendritic Arbors. *Front Cell Neurosci.* 2018 Nov 22;12:409. doi: 10.3389/fncel.2018.00409.
- Karten, J.H., Fite, K.V., and Brecha, N. (1977). Specific projection of displaced retinal ganglion cells upon the accessory optic system in the pigeon (Columba livia). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 1753–1756. doi: 10.1073/pnas.74.4.1753

- Kisseleff E, Vigouroux RJ, Hottin C, Lourdel S, Thomas L, Shah P, Chédotal A, Perron M, Swaroop A, Roger JE. Glycogen Synthase Kinase 3 Regulates the Genesis of Displaced Retinal Ganglion Cells3. *eNeuro*. 2021 Oct 6;8(5):ENEURO.0171-21.2021. doi: 10.1523/ENEURO.0171-21.2021.
- Kovács-Öller T, Szarka G, Tengölics ÁJ, Ganczer A, Balogh B, Szabó-Meleg E, Nyitrai M, Völgyi B. Spatial Expression Pattern of the Major Ca²⁺-Buffer Proteins in Mouse Retinal Ganglion Cells. *Cells*. 2020 Mar 25;9(4):792. doi: 10.3390/cells9040792.
- Krieger, B., Qiao, M., Rousso, D. L., Sanes, J. R., and Meister, M. (2017). Four alpha ganglion cell types in mouse retina: function, structure and molecular signatures. *PLoS One* 12:e0180091. doi: 10.1371/journal.pone.0180091
- Lettvin, J., Maturana, H., McCulloch, W. & Pitts, W. What the frog's eye tells the frog's brain. *Proc. IRE* **47**, 1940–1951 (1959).
- Liu, Z.H., and Jen, L.S. (1986). Displaced retinal ganglion cells in normal rats and rats with one eye enucleated at birth. *Neurosci.Lett.* 67, 239–244.doi: 10.1016/0304-3940(86)90315-0
- Mey,J., and Johann,V.(2001). Dendrite development and target innervation of displaced retinal ganglion cells of the chick (*Gallus gallus*). *Int.J.Dev.Neurosci.* 19, 517–531.doi:10.1016/S0736-5748(01)00030-2
- Nadal-Nicolás FM, Salinas-Navarro M, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Villegas-Pérez MP, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M (2014) Displaced retinal ganglion cells in albino and pigmented rats. *Front Neuroanat* 8:99. doi: 10.3389/fnana.2014.00099
- Nelson, R., Famiglietti, E. V., Jr., and Kolb, H. (1978). Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J. Neurophysiol.* 41, 472–483. doi: 10.1152/jn.1978.41.2.472
- Pang, J.-J., Gao, F., and Wu, S. M. (2003). Light-evoked excitatory and inhibitory synaptic inputs toONandOFF alpha ganglion cells in the mouse retina. *J.Neurosci.* 23, 6063–6073. doi: 10.1523/jneurosci.23-14-06063.2003
- Peichl, L. (1989). Alpha and delta ganglion cells in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 286, 120–139. doi: 10.1002/cne.902860108

- Provencio, I., Rollag, M.D., and Castrucci, A.M. (2002). Photoreceptive net in the mammalian retina. This mesh of cells may explain how some blind mice can still tell day from night. *Nature* 415,-493.
- Quattrochi, L.E., Stabio, M.E., Kim, I., Ilardi, M.C., Michelle Fogerson, P., Leyrer, M.L., and Berson, D.M. (2019). The M6 cell: A small-field bistratified photosensitive retinal ganglion cell. *J Comp Neurol* 527, 297-311.
- Robson, J.A., and Hollander, H.(1984). Displaced ganglion cells in the rabbit retina. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 25, 1376–1381.
- Rodieck, R. W. & Brening, R. K. Retinal ganglion cells: properties, types, genera, pathways and trans-species comparisons. *Brain Behav. Evol.* **23**, 121–164 (1983).
- Rodriguez AR, de Sevilla M^uller LP, Brecha NC. 2014. The RNA binding protein RBPMS is a selective marker of ganglion cells in the mammalian retina. *J. Comp. Neurol.* 522:1411–43
- Rowe, M. H. & Stone, J. Naming of neurones. Classification and naming of cat retinal ganglion cells. *Brain Behav. Evol.* **14**, 185–216 (1977).;
- Sanes, J. R. & Masland, R. H. The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification. *Annu. Rev. Neurosci.* **38**, 221–246 (2015).;
- Schmidt TM, Do MT, Dacey D, Lucas R, Hattar S, Matynia A. (2011). Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function. *J. Neurosci.* 31:16094–101
- Schmidt, T. M., Alam, N. M., Chen, S., Kofuji, P., Li, W., Prusky, G. T., et al. (2014). A role for melanopsin in alpha retinal ganglion cells and contrast detection. *Neuron* 82, 781–788. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.022
- Schmidt, T.M., and Kofuji, P. (2009). Functional and morphological differences among intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J Neurosci* 29, 476-482.;
- Schmidt, T.M., and Kofuji, P. (2011). Structure and function of bistratified intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol* 519, 1492-1504.

- Schmidt, T.M., Taniguchi, K., and Kofuji, P. (2008). Intrinsic and extrinsic light responses in melanopsin-expressing ganglion cells during mouse development. *J Neurophysiol* 100, 371-384.;
- Seung, H. S. & Smbl, U. Neuronal cell types and connectivity: lessons from the retina. *Neuron* **83**, 1262–1272 (2014).;
- Simpson, J.I.(1984).The accessory optic system. *Annu.Rev.Neurosci.* 7, 13–41. doi: 10.1146/annurev.ne.07.030184.000305
- Sonoda, T., Lee, S.K., Birnbaumer, L., and Schmidt, T.M. (2018). Melanopsin Phototransduction Is Repurposed by ipRGC Subtypes to Shape the Function of Distinct Visual Circuits. *Neuron* 99, 696 754-767 e754.
- Sonoda, T., Okabe, Y., and Schmidt, T. M. (2020). Overlapping morphological and functional properties between M4 and M5 intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.* 528, 1028–1040. doi: 10.1002/cne.24806
- Stabio, M.E., Sabbah, S., Quattrochi, L.E., Ilardi, M.C., Fogerson, P.M., Leyrer, M.L., Kim, M.T., Kim, I., Schiel, M., Renna, J.M., Briggman, K.L., and Berson, D.M. (2018). The M5 Cell: A Color-Opponent Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cell. *Neuron* 97, 150-163 e154
- Tran, N. M., Shekhar, K., Whitney, I. E., Jacobi, A., Benhar, I., Hong, G., et al. (2019). Single-cell profiles of retinal ganglion cells differing in resilience to injury reveal neuroprotective genes. *Neuron* 104, 1039–1055.e12. doi: 10.1016/j.neuron.2019.11.006
- Valiente-Soriano FJ, García-Ayuso D, Ortn-Martínez A, Jiménez-López M, Galindo-Romero C, Villegas-Pérez MP, Agudo-Barriuso M, Vugler AA, Vidal-Sanz M. Distribution of melanopsin positive neurons in pigmented and albino mice: evidence for melanopsin interneurons in the mouse retina. *Front Neuroanat.* 2014 Nov 20;8:131. doi: 10.3389/fnana.2014.00131.
- Vaney, D.I., Peichl,L., Wassle,H., and Illing, R.B.(1981). Almost all ganglion cells in the rabbit retina project to the superior colliculus. *BrainRes.* 212, 447–453. doi: 10.1016/0006-8993(81)90476-5
- Vidal-Villegas, B., Di Pierdomenico, J., Gallego-Ortega, A., Galindo-Romero, C., Martínez-De-La-Casa, J. M., Garcia-Feijoo, J., et al. (2021a). Systemic treatment with 7,8-Dihydroxiflavone activates TtkB and affords

- protection of two different retinal ganglion cell populations against axotomy in adult rats. *Exp. Eye Res.* 210:108694. doi: 10.1016/j.exer.2021.108694
- Vidal-Villegas, B., Di Pierdomenico, J., Miralles De Imperial-Ollero, J. A., Ortín-Martínez, A., Nadal-Nicolás, F. M., Bernal-Garro, J. M., et al. (2019). MelanopsinCRGCs are fully resistant to NMDA-induced excitotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 20:3012. doi: 10.3390/ijms20123012
 - Vidal-Villegas, B., Gallego-Ortega, A., Miralles De Imperial-Ollero, J. A., Martínez De La Casa, J. M., García Feijoo, J., and Vidal-Sanz, M. (2021b). Photosensitive ganglion cells: a diminutive, yet essential population. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* (Engl Ed) 96, 299–315. doi: 10.1016/j.oftale.2020.06.020
 - Viney, T.J., Balint, K., Hillier, D., Siebert, S., Boldogkoi, Z., Enquist, L.W., Meister, M., Cepko, C.L., and Roska, B. (2007). Local retinal circuits of melanopsin-containing ganglion cells identified by transsynaptic viral tracing. *Curr Biol* 17, 981-988.
 - Wang, F., Li, E., De, L., Wu, Q., and Zhang, Y. (2021). OFF-transient alpha RGCs mediate looming triggered innate defensive response. *Curr. Biol.* 31, 2263–2273.e3. doi: 10.1016/j.cub.2021.03.025
 - Wassle, H., Levick, W. R., and Cleland, B. G. (1975). The distribution of the alpha type of ganglion cells in the cat's retina. *J. Comp. Neurol.* 159, 419–438. doi: 10.1002/cne.901590308
 - Webvision (2021). Moran Eye Center, January 25, 2012. Web. <http://webvision.med.utah.edu>
 - Xiang M, Zhou L, Macke JP, Yoshioka T, Hendry SHC, et al. 1995. The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J. Neurosci.* 15:4762–85;