

DOI: 10.13376/j.cbls/2015199

文章编号: 1004-0374(2015)11-1441-07



胡兵, 中国科学技术大学生命科学学院教授、博士生导师, 中国科学院“百人计划”择优支持(2009年)。多年从事发育神经生物学和神经损伤修复机制的研究, 发表SCI论文30余篇, 第一或共第一以及通讯作者共计14篇, 被他引700余次。代表性论文发表在*Glia*、*Development*、*Nature Medicine*、*Advanced Materials*、*PLoS One*、*Experimental Neurology*。曾获得1997年度中科院自然科学奖二等奖(4人中排名第3), 2007~2008年度香港大学最佳研究著作奖, 2009年第三届药明康德生命化学研究奖(三等奖), 2013年王宽诚育才奖。

## 斑马鱼视觉系统生物钟的研究进展

王 昆<sup>1</sup>, 聂 珂<sup>1</sup>, 黄登烽<sup>1</sup>, 王 晗<sup>2</sup>, 胡 兵<sup>1\*</sup>

(1 中国科学技术大学生命科学学院神经生物与生物物理学系, 中国科学院脑功能与脑疾病重点实验室, 合肥 230027; 2 苏州大学生物钟研究中心, 苏州 215123)

**摘 要:** 斑马鱼视觉系统生物钟相关研究在近些年取得了一定的进展。现主要对斑马鱼视觉系统中受生物钟调控的形态学、视觉功能、电生理等特性进行总结, 并初步探讨其内源性机制。同时, 也概括了近年来在斑马鱼松果体方面的研究进展, 尤其是松果体的感光特性和发育过程, 及其在斑马鱼生物钟形成中的作用。

**关键词:** 生物钟; 视网膜; 松果体; 斑马鱼

中图分类号: Q41; Q959.468 文献标志码: A

## Advances in studies of the circadian clock of the zebrafish visual system

WANG Kun<sup>1</sup>, NIE Ke<sup>1</sup>, HUANG Deng-Feng<sup>1</sup>, WANG Han<sup>2</sup>, HU Bing<sup>1\*</sup>

(1 Key Laboratory of Brain Function and Disease, Chinese Academy of Sciences, School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China; 2 Center for Circadian Clocks, Soochow University, Suzhou 215123, China)

**Abstract:** Advances in studies of the circadian clock of the zebrafish visual system have been made recently. Here we summarized the circadian rhythms of the zebrafish visual system including the morphological changes, visual functions and electrophysiological characters, and discussed the underlying mechanisms primarily. The progress in the field of the zebrafish pineal gland research has been discussed as well, especially the photoreceptive property of the pineal gland and its role in the development of the larval zebrafish biological clock.

**Key words:** circadian clock; retina; pineal gland; zebrafish

生物钟是一种生物体内源性的、以约24 h为周期的昼夜节律。从分子水平上来看, 生物钟是通过一系列生物钟基因相互作用而形成的<sup>[1]</sup>。同时, 这些钟基因能够调节一系列钟控基因的转录表达,

收稿日期: 2015-07-21

基金项目: 国家重大科学研究计划(2012CB947602)

\*通信作者: E-mail: bhu@ustc.edu.cn; Tel: 0551-63602489

进而影响生物机体的各种生理过程<sup>[2]</sup>。在视觉机制方面, 诸多生理过程受生物钟调控, 如鱼类和两栖类的视网膜运动<sup>[3-4]</sup>、光感受器细胞外段小盘脱落<sup>[5]</sup>、带状突触的形成与解聚<sup>[6-8]</sup>、Spinule的形成与消失<sup>[9]</sup>、光感受器细胞之间的缝隙连接<sup>[10]</sup>、视蛋白的表达和视敏度的节律性变化等<sup>[11-12]</sup>。近年来, 斑马鱼逐渐成为生物钟研究领域中的一种优良模式生物。与啮齿类动物如大鼠、小鼠等不同的是, 斑马鱼不仅在生理、行为等各方面表现出了显著的节律性, 更重要的是斑马鱼是典型的昼行性动物, 主要在光周期活动, 暗周期静息<sup>[13]</sup>。同时, 对昼夜节律具有重要调控作用的激素——褪黑素也主要在暗周期合成分泌<sup>[14]</sup>, 这与包括人在内的昼行性动物是一致的。斑马鱼胚胎体外发育, 用化学试剂PTU (1-phenyl-2-thiourea) 抑制其黑色素合成, 可使胚胎在数天内保持透明, 这一特点十分适合光学成像和原位杂交检测 mRNA 的时空表达<sup>[15]</sup>。同时, 这也十分利于研究生物钟在胚胎早期发育中的调控作用和用荧光素酶进行钟基因表达成像<sup>[16]</sup>。斑马鱼基因组测序已经完成, 并且易于正向遗传突变筛选、转基因和基因敲除操作。生物钟基因序列相对保守<sup>[17]</sup>, 斑马鱼 *clock1a* 与小鼠的 *clock* 编码的氨基酸序列同源性高达 80%<sup>[18]</sup>。所以, 对斑马鱼生物钟的研究将有助于人们对自身生物钟调控生理过程的理解。

与高等动物不同, 斑马鱼的核心生物钟位于松果体<sup>[19-20]</sup>。同时, 由于鸟类、爬行动物、两栖类和鱼类的松果体同时具有内分泌和感光的功能<sup>[21]</sup>, 斑马鱼的生物钟显著受到光照的影响。另一方面, 斑马鱼视觉发达, 胚胎发育 5 dpf (days post fertilization) 就具有较为完善的视觉功能<sup>[22]</sup>。从幼年到成年, 斑马鱼的视觉功能一直受到生物钟的调控<sup>[23-24]</sup>。本文主要对斑马鱼的核心生物钟——松果体和视觉功能相关研究进展进行了总结。

## 1 视网膜内的生物钟

斑马鱼视网膜的结构和功能均在一定程度上受到生物钟的影响。成年斑马鱼视网膜在亮暗 (light/dark, LD) 光周期下表现出显著的视网膜运动。光周期中, 视锥细胞内段收缩, 视杆细胞内段伸长, 视网膜色素上皮细胞 RPE (retina pigment epithelium) 色素颗粒聚集到玻璃体侧; 在暗周期中, 这些细胞都向相反方向运动。在 DD 光周期下, 短单锥细胞 (short-single cones) 与双锥细胞 (double cones) 以及 RPE 色素颗粒都可以维持昼夜节律运动, 但长单锥

细胞 (long-single cones) 和视杆细胞仅仅能够维持运动的趋势, 无统计学显著性<sup>[3]</sup>。幼体斑马鱼夜间视觉丧失, 直到 20 dpf 才表现出 RPE 色素颗粒运动, 28 dpf 才出现显著的视网膜运动<sup>[25]</sup>。斑马鱼视网膜内带状突触的形成与解聚同样具有昼夜节律性。在光周期下, 幼年斑马鱼视网膜内水平细胞与光感受器细胞之间突触连接形成特殊的带状突触, 而这种结构在暗周期中解聚消失。这种节律性结构的形成在暗周期中同样可以受到外界光照的诱导, 但是暗环境并不能诱导光周期下带状突触的解聚<sup>[23]</sup>。Balkema 等<sup>[7]</sup>在 C57BL/6J 小鼠中的实验表明, 带状突触的长度具有昼夜节律性, 在 ZT2 (zeitgeber time 2) 达到最大值。这种结构的变化同样存在于美洲红点鲑、两栖类和龟类中<sup>[6]</sup>。带状突触长度的昼夜相位与视敏度的昼夜相位相对应, 也就是说当带状突触的长度越大时, 视阈值越低<sup>[7]</sup>。这种节律性可能是幼体斑马鱼在暗周期下丧失视觉的原因之一<sup>[23]</sup>。

硬骨鱼类视网膜内与视锥细胞形成突触连接的水平细胞, 能够形成指状突起的结构, 称为 Spinule。这种结构在光周期开始时形成, 光周期结束时消失。而且, 这种周期性能够在全黑暗环境中维持, 表明 Spinule 的形成具有显著的近日节律性<sup>[9]</sup>, 但 Wagner 等<sup>[26]</sup>的实验表明, Spinule 的形成受多巴胺影响, 而不受水平细胞中内源性的生物节律调控。视黄酸能够诱导 Spinule 形成<sup>[27]</sup>, 而褪黑素则抑制 Spinule 形成。斑马鱼视网膜内 Spinule 的结构报道很少, 其是否有节律性也尚未得到阐述<sup>[28]</sup>。

在功能和生理特性方面, 斑马鱼的视敏度、视动反应以及电生理视网膜电图 ERG (electroretinogram) 也都表现出近日节律。斑马鱼视敏度受内源性生物钟的影响, 呈现出光周期结束前视阈值最低、暗周期结束前视阈值最高的变化趋势。在一个 LD 周期内, 视锥和视杆细胞的视阈值变化分别为 1.4 和 2.2 个 log 单位。全黑暗条件下这种节律性能够维持数天, 并且能够受外界光照影响而发生相位重置。全光照条件下, 这种节律性迅速消失, 视阈值维持在最低水平<sup>[24]</sup>。

与此相应, 电生理实验表明, 视网膜 ERG 也表现出显著的节律性。具体来说, 使用不同强度光照刺激诱发 ERG b 波幅值达到阈值 10~20 mV, 光周期结束前所需光强度远小于暗周期结束前。用同等强度的闪光刺激斑马鱼视网膜, ERG a 波的幅值在光周期结束前远大于暗周期结束前。这种节律性与多巴胺密切相关, 将视网膜内多巴胺能网间质细

胞损毁后, 视杆细胞的这种节律性消失, 视阈值一直处于较高的水平。电生理实验表明, 多巴胺能细胞损毁并不影响外网层的功能, 而是主要引起内网层细胞功能的变化, 光刺激反应传输到视神经上时就已经减弱了。同时, 诱发 ERG 阈值 b 波所需光强度的昼夜节律变化约为 1.2 个 log 单位, 这要小于视阈值变化<sup>[29]</sup>。幼鱼夜间视觉丧失, 主要表现在夜间 OKR (optokinetic response)、VMR (visual-motor response) 较低直至消失, ERG 对光刺激反应消失以及带状突触解聚, 但这种视觉的丧失显著受光照影响, 夜间 3 h 的光照基本可使视觉恢复<sup>[23]</sup>。

另一个比较有趣的现象是, ERG b 波和 d 波占主导的相互转移具有近日节律性。具体来讲, 在暗适应早期, 视锥细胞的功能占主导; 随着暗适应时间延长, 视杆细胞的功能逐渐占主导。这主要表现为: 随着暗适应的进行, 斑马鱼 ERG b 波幅度逐渐增大, d 波幅度逐渐减小。而这种变化在光周期即将结束时, 也就是视阈值最低的时间窗内, 所需时间最短<sup>[30]</sup>。以氨基酸作为嗅质的嗅觉刺激能够提高斑马鱼的视敏度, 并且这种效应只表现在光周期开始阶段。这一时间窗内, 斑马鱼的视敏度处于近日节律的最低值。这一过程主要是由位于嗅球内的 GnRH (gonadotropin-releasing hormone) 能 TN (terminal neuron) 神经元介导<sup>[31]</sup>。TN 神经元在视网膜内形成广泛的突触连接<sup>[32]</sup>, 可以抑制多巴胺的释放, 进而活化视网膜节细胞, 但这种效应是否具有近日节律性, 如视网膜内 GnRH 的受体表达节律性, 还是只是天花板效应, 目前还不是十分清楚。

金鱼视网膜水平细胞接受视锥细胞和视杆细胞的信号输入, 在近日节律的调控下, 光、暗周期主要分别接受视锥细胞和视杆细胞的信号<sup>[33]</sup>。这一现象在斑马鱼中并没有直接报道, 但与上述现象相关的视锥细胞与视杆细胞之间的缝隙连接是有报道的。斑马鱼视网膜内视锥细胞之间和视锥与视杆细胞之间存在有 Connexin35 构成的缝隙连接, 其通透小分子物质的能力在光周期内较强, 暗周期内较弱。也就是说, 可通透的缝隙连接数目在光周期内明显高于暗周期<sup>[34]</sup>。由此可见, 生物钟能够在形态结构、生理功能和电生理变化等多个层次影响斑马鱼的视觉系统。

## 2 视网膜内生物钟机制

视网膜内的生理过程除受内源性钟基因的调控, 还显著受到光照的影响。其中, 光照直接影响

神经递质多巴胺及激素褪黑素的合成与分泌。在视网膜中, 已知多巴胺及褪黑素分别起着光信号和暗信号的作用, 对整个视网膜的生理功能有着重要的调控作用。

多巴胺能够提高视敏度, 影响视敏度的近日节律变化<sup>[29]</sup>。多巴胺及其代谢通路中的一些关键酶, 如酪氨酸羟化酶 *th*、单胺氧化酶 *mao* 的 mRNA 转录都具有近日节律性, 并且在钟基因转录表达受到抑制时, 它们的表达水平也会受到影响。例如, 钟基因 *per1b* 缺失突变引起 *th*、*mao* 的 mRNA 转录表达上调, 多巴胺水平降低<sup>[52]</sup>。同时, 长波敏感锥细胞视蛋白 LC (long-wavelength-sensitive red cone) rhodopsin 的表达水平也有一定节律的相关性, 其表达的峰值位于光周期内<sup>[11]</sup>; 并且有实验结果表明, *clock* 基因通过依赖于 cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 的信号通路对这种节律的形成起着重要作用<sup>[35]</sup>。

Melanopsin 在哺乳动物的生物钟调节中发挥重要作用<sup>[36]</sup>。斑马鱼有更多的 melanopsin 基因 (*opn4a*、*opn4.1*、*opn4b*、*opn4xa*、*opn4xb*), 并且广泛表达于视网膜各种细胞类型中。*opn4a* 和 *opn4b* 与哺乳动物的 *opn4* 同源, *opn4xa* 和 *opn4xb* 与非洲爪蟾的 *opn4* 同源, *opn4.1* 没有内含子, 可能是在进化中转座子插入形成的。这些基因启动子中都有 E-box 结构元件, 暗示其表达可能具有近日节律性<sup>[36]</sup>。同时, Matos-Cruz 等<sup>[37]</sup>也发现, 在幼鱼视网膜中 *opn4a* 和 *opn4.1* 的 mRNA 转录具有节律性, 但还需进一步实验验证。视网膜内缝隙连接在 Connexin35 处于磷酸化状态时激活开放, 利于细胞间信号的整合。而 Connexin35 的磷酸化是受生物钟调控的, 即暗周期下处于高磷酸化状态。进一步实验表明, PKA (protein kinase A) 在这一过程中起着重要作用。cAMP 类似物能够促使 Connexin35 磷酸化, 模拟夜间高缝隙连接的状态<sup>[34]</sup>。在金鱼实验中, Ribelayga 等<sup>[33]</sup>观察到多巴胺促进水平细胞接受视锥细胞信号输入, 并提出类似的模型。也就是说, 多巴胺通过调节 PKA 通路, 在光周期内抑制视锥与视杆细胞之间的缝隙连接, 而使得水平细胞接受视锥细胞信号输入。

## 3 松果体内的生物钟

成年斑马鱼松果体的光感受器细胞位于松果体内部, 电镜显示其由外段、内段和包含有突触蒂的基底杆状结构组成<sup>[38]</sup>。离体培养的斑马鱼松果体分泌合成褪黑素具有显著的生物钟节律性。与大多数脊椎动物一样, 斑马鱼褪黑素合成分泌的峰值出现



在暗周期内<sup>[14]</sup>。幼鱼中这种节律性的形成非常迅速,正常光暗周期下 20~26 hpf 这种节律性就已经开始建立了,并且具有相对稳定性,如第二个正常光周期结束后将幼鱼放到全黑暗条件下培养,这种节律至少能维持 3 个正常光周期。但如果在 20 hpf 之前将幼鱼放到全黑暗条件下培养,这种节律不能形成<sup>[39]</sup>。与哺乳动物不同,这一节律性不受儿茶酚胺的影响,但光照能够显著抑制褪黑素的分泌<sup>[40]</sup>。Ziv 等<sup>[41]</sup>的实验证据进一步表明,斑马鱼松果体对 400~600 nm 的光波均具有敏感性,尤其对 500 nm 和 570 nm 的光波最为敏感,这也暗示了多种感光蛋白的存在。

金鱼和蝶螈的松果体光感受器细胞也都存在带状突触结构,并且与视网膜中的带状突触相类似,其长度表现出昼夜节律性变化。但不同的是,其长度最大峰值位于暗周期<sup>[42-43]</sup>。斑马鱼松果体的超微结构已经有所报道,但其是否同样存在带状突触结构还不清楚。

#### 4 松果体内生物钟机制

*Clock1a* 是第一个被克隆的斑马鱼钟基因,而且首次发现时就被检测到在松果体内振荡表达,其表达的峰值位于光周期结束、暗周期开始的时间窗内<sup>[18]</sup>。褪黑素合成的关键限速酶 *aanat2* 特异性地表达在视网膜光感受器细胞和松果体内,其开始表达的时间与褪黑素初始合成时间一致,约为 22 hpf,并且呈现出显著的昼夜节律<sup>[44]</sup>。在这一机制形成的过程中,光照、对光敏感的 *per2* 基因和 *otx5* 都起了重要作用<sup>[45]</sup>。将 *per2* 基因敲减后,光照对于 *aanat2* 节律形成的调节作用也随即消失。进一步实验表明,早在松果体细胞分化形成之前,光照即可诱导 *per2* 基因在松果体前体细胞内高表达<sup>[46]</sup>。

除此之外,松果体内至少表达两种感光蛋白,Exo-rhodopsin 和 LC rhodopsin<sup>[47]</sup>。其中,Exo-rhodopsin 在夜间高表达,能够上调 *aanat2* 的转录表达,进而影响褪黑素的合成与分泌<sup>[48]</sup>。Exo-rhodopsin 的表达受到 *Otx5* 和 *Per3* 的双重调控,前者促进其转录表达,而后者起到抑制作用<sup>[45,48]</sup>。相比之下,没有报道显示 LC rhodopsin 的表达具有近日节律表达模式,但它与幼鱼的发育阶段相关,从 10 dpf 起表达下降,成年又开始回升<sup>[49]</sup>。Ziv 等<sup>[41]</sup>没有检测到 VA (vertebrate ancient) 和 VAL (vertebrate ancient long) opsins 在松果体的表达。同时,Exo-rhodopsin 和 LC rhodopsin 的最大吸收光谱分别为 492~503 nm 和 570 nm,表明还有其他的感光蛋白存在。

除内分泌功能外,松果体光感受器细胞存在自发放特性。早期研究显示,鳟鱼松果体节细胞自发放放在 10 Hz 左右。这种自发放受光照抑制,发放频率随光强的增加逐渐降低。同时,多巴胺能够降低这种抑制作用<sup>[50]</sup>。鸡的松果体细胞也有自发放,其平均发放频率一般低于 10 Hz,而且不同细胞的发放频率具有近日节律性或超日节律性,周期分别为  $(26.25 \pm 1.26)$  h 和  $(10.75 \pm 1.06)$  h。细胞自发放频率在暗周期内较高,与褪黑素合成的峰值相对应<sup>[51]</sup>。目前,斑马鱼松果体细胞的电生理特性还未见报道。

#### 5 斑马鱼应用于生物钟研究的新方法

王晗实验组应用病毒插入的方法成功抑制 *per1b* (*period1b*) 基因的转录表达,构建了 *per1b* 基因缺失突变体,这也是第一个成功运用此方法构建的钟基因缺失突变斑马鱼品系<sup>[52]</sup>。荧光素酶标记生物钟基因转基因斑马鱼也得到广泛的应用,利用这种标记的鱼,可以通过成像的方法简易而又精确地观测钟基因的振荡表达。这种方法也尤其适用于以幼鱼和离体细胞为对象,研究光照<sup>[53-54]</sup>、温度<sup>[55]</sup>、激素<sup>[56]</sup>等因素对钟基因的直接作用。钙离子成像技术成功用于视网膜自感光神经节细胞 ipRGC (intrinsically photosensitive retinal ganglion cell) 的研究。应用钙染料 FURA-2, Sekaran 等<sup>[57]</sup>发现 C3H/He *rd/rd cl* 小鼠 ipRGC 存在 3 种发放模式:维持发放、瞬时发放和重复发放。维持发放的细胞在撤除光照刺激后维持发放,一般在 5 min 内停止发放。瞬时发放的细胞迅速停止发放,一般在光照刺激停止前就回到基线水平。重复发放的细胞振荡发放,一般 20 min 后才回到基线水平。此外,他们还发现,ipRGC 可以通过缝隙连接使其他类型的视网膜节细胞对光照刺激发放。李雷实验组也使用类似的方法,研究多巴胺对斑马鱼视网膜节细胞钙离子内流的影响。他们发现,多巴胺能够通过 D1 受体抑制高膜电位和低膜电位钙离子内流<sup>[58]</sup>。斑马鱼视网膜内受多巴胺影响的具生物节律的相关结构及生理特性详见表 1。

#### 6 展望

目前,斑马鱼视觉系统生物钟研究已经取得了一定进展。包括形态学上的视网膜运动<sup>[25]</sup>、带状突触的形成与解聚<sup>[23]</sup>,功能上的视敏度和电生理视网膜电图 ERG 的昼夜节律变化<sup>[24]</sup>,以及 *th*、*mao* 等

表1 斑马鱼视网膜内受多巴胺影响的具生物节律的相关结构及生理特性

相关结构及特性	受体类型	作用
视网膜运动	D2	只影响视网膜运动的幅度
缝隙连接	D2	抑制缝隙连接形成
视敏度		提高视敏度
ERG		提高b波幅度
Spinule	D1 D2	促进spinule的形成
视锥水平细胞信号输入	D2	促进视锥细胞信号输入
褪黑素	D2	抑制褪黑素合成释放
视网膜节细胞	D1	通过降低内向钙离子电流抑制发放

在 mRNA 水平的昼夜节律变化。同时, 作为斑马鱼生物钟的核心, 松果体也一直备受关注。松果体的发育及其在幼鱼生物节律形成中的作用以及部分分子机制也得到了阐述<sup>[39,46]</sup>, 但目前的工作还较为基础, 研究人员多采用干扰光周期<sup>[37]</sup>、药理学手段和电生理记录<sup>[29]</sup>的方式开展工作。人们还不能很好地去解释这些变化的内在机制, 尤其是钟基因和钟控基因如何直接调节这些形态、生理变化。未来, 一方面, 斑马鱼基因组测序已经完成, 且易于正向遗传突变筛选、转基因和基因敲除操作, 通过这些手段进行遗传操作以获得钟基因突变体系, 十分利于进一步的深入研究; 另一方面, 斑马鱼幼鱼通体透明, 结合荧光素酶基因标记技术进行活体成像, 能够更加直观和精确地去阐述钟基因作用机理<sup>[16]</sup>。

### [参 考 文 献]

- [1] Ben-Shlomo R, Kyriacou CP. Circadian rhythm entrainment in flies and mammals. *Cell Biochem Biophys*, 2002, 37(2): 141-56
- [2] Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*, 2010, 330(6009): 1349-54
- [3] Menger GJ, Koke JR, Cahill GM. Diurnal and circadian retinomotor movements in zebrafish. *Vis Neurosci*, 2005, 22(2): 203-9
- [4] Anderson FE, Green CB. Symphony of rhythms in the *Xenopus laevis* retina. *Microsc Res Tech*, 2000, 50(5): 360-72
- [5] LaVail MM. Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1980, 19(4): 407-11
- [6] Wagner HJ, Ali MA. Cone synaptic ribbons and retinomotor changes in the brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Salmonidae, Teleostei), under various experimental conditions. *Can J Zool*, 1977, 55(10): 1684-91
- [7] Balkema GW, Cusick K, Nguyen TH. Diurnal variation in synaptic ribbon length and visual threshold. *Vis Neurosci*, 2001, 18(5): 789-97
- [8] Hull C, Studholme K, Yazulla S, et al. Diurnal changes in exocytosis and the number of synaptic ribbons at active zones of an ON-type bipolar cell terminal. *J Neurophysiol*, 2006, 96(4): 2025-33
- [9] Douglas RH, Wagner HJ. Endogenous control of spinule formation in horizontal cells. *Cell Tissue Res*, 1983, 229(2): 443-9
- [10] Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron*, 2008, 59(5): 790-801
- [11] Li P, Temple S, Gao Y, et al. Circadian rhythms of behavioral cone sensitivity and long wavelength opsin mRNA expression: a correlation study in zebrafish. *J Exp Biol*, 2005, 208(Pt 3): 497-504
- [12] Bassi CJ, Powers MK. Circadian rhythm in goldfish visual sensitivity. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1987, 28(11): 1811-5
- [13] Cahill GM, Hurd MW, Batchelor MM. Circadian rhythmicity in the locomotor activity of larval zebrafish. *Neuroreport*, 1998, 9(15): 3445-9
- [14] Cahill GM. Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. *Brain Res*, 1996, 708(1-2): 177-81
- [15] Wang H. Comparative analysis of period genes in teleost fish genomes. *J Mol Evol*, 2008, 67(1): 29-40
- [16] Weger M, Weger BD, Diotel N, et al. Real-time *in vivo* monitoring of circadian E-box enhancer activity: A robust and sensitive zebrafish reporter line for developmental, chemical and neural biology of the circadian clock. *Dev Biol*, 2013, 380(2): 259-73
- [17] Zheng X, Sehgal A. Probing the relative importance of molecular oscillations in the circadian clock. *Genetics*, 2008, 178(3): 1147-55
- [18] Whitmore D, Foulkes NS, Strähle U, et al. Zebrafish clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Nat Neurosci*, 1998, 1(8): 701-7
- [19] Noche RR, Lu PN, Goldstein-Kral L, et al. Circadian rhythms in the pineal organ persist in zebrafish larvae that lack ventral brain. *BMC Neurosci*, 2011, 12: 7
- [20] Zhdanova IV. Sleep and its regulation in zebrafish. *Rev Neurosci*, 2011, 22(1): 27-36
- [21] Ekström P, Meissl H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci*, 2003,

- 358(1438): 1679-700
- [22] Fleisch VC, Neuhauss SC. Visual behavior in zebrafish. *Zebrafish*, 2006, 3(2): 191-201
- [23] Emran F, Rihel J, Adolph AR, et al. Zebrafish larvae lose vision at night. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(13): 6034-9
- [24] Li L, Dowling JE. Zebrafish visual sensitivity is regulated by circadian clock. *Vis Neurosci*, 1998, 15(5): 851-7
- [25] Hodel C, Neuhauss SC, Biehlermaier O. Time course and development of light adaptation processes in the outer zebrafish retina. *Anat Rec A: Discov Mol Cell Evol Biol*, 2006, 288(6): 653-62
- [26] Wagner HJ, Behrens UD, Zaunreiter M, et al. The circadian component of spinule dynamics in teleost retinal horizontal cells is dependent on the dopaminergic system. *Vis Neurosci*, 1992, 9(3-4): 345-51
- [27] Weiler R, Schultz K, Pottek M, et al. Retinoic acid has light-adaptive effects on horizontal cells in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 7139-44
- [28] Allwardt BA, Lall AB, Brockerhoff SE, et al. Synapse formation is arrested in retinal photoreceptors of the zebrafish *nrc* mutant. *J Neurosci*, 2001, 21(7): 2330-42
- [29] Li L, Dowling JE. Effects of dopamine depletion on visual sensitivity in zebrafish. *J Neurosci*, 2000, 20(5): 1893-903
- [30] Ren JQ, Li L. A circadian clock regulates the process of ERG b- and d-wave dominance transition in dark-adapted zebrafish. *Vision Res*, 2004, 44(18): 2147-52
- [31] Maaswinkel H, Li L. Olfactory input increases visual sensitivity in zebrafish: a possible function for the terminal nerve and dopaminergic interplexiform cells. *J Exp Biol*, 2003, 206(Pt 13): 2201-9
- [32] Wang X, Huang L, Li Y, et al. Characterization of GFP-tagged GnRH-containing terminalis neurons in transgenic zebrafish. *J Cell Physiol*, 2011, 226(3): 608-15
- [33] Ribelayga C, Wang Y, Mangel SC. Dopamine mediates circadian clock regulation of rod and cone input to fish retinal horizontal cells. *J Physiol*, 2002, 544(Pt 3): 801-16
- [34] Li H, Chuang AZ, O'Brien J. Photoreceptor coupling is controlled by connexin 35 phosphorylation in zebrafish retina. *J Neurosci*, 2009, 29(48): 15178-86
- [35] Li P, Chaurasia SS, Gao Y, et al. CLOCK is required for maintaining the circadian rhythms of Opsin mRNA expression in photoreceptor cells. *J Biol Chem*, 2008, 283(46): 31673-8
- [36] Davies WI, Zheng L, Hughes S, et al. Functional diversity of melanopsins and their global expression in the teleost retina. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(24): 4115-32
- [37] Matos-Cruz V, Blasic J, Nickle B, et al. Unexpected diversity and photoperiod dependence of the zebrafish melanopsin system. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25111
- [38] Laurà R, Magnoli D, Zichichi R, et al. The photoreceptive cells of the pineal gland in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Microsc Res Tech*, 2012, 75(3): 359-66
- [39] Kazimi N, Cahill GM. Development of a circadian melatonin rhythm in embryonic zebrafish. *Brain Res Dev Brain Res*, 1999, 117(1): 47-52
- [40] Cahill GM. Circadian melatonin rhythms in cultured zebrafish pineals are not affected by catecholamine receptor agonists. *Gen Comp Endocrinol*, 1997, 105(2): 270-5
- [41] Ziv L, Tovim A, Strasser D, et al. Spectral sensitivity of melatonin suppression in the zebrafish pineal gland. *Exp Eye Res*, 2007, 84(1): 92-9
- [42] McNulty A. Ultrastructural observations on synaptic ribbons in the pineal organ of the goldfish. *Cell Tissue Res*, 1980, 210(2): 249-56
- [43] Kikuchi M, Chiba A, Aoki K. Daily melatonin injections entrain the circadian change of synaptic ribbon number in the pineal organ of the Japanese newt. *Neurosci Lett*, 2000, 285(3): 181-4
- [44] Gothilf Y, Coon SL, Toyama R, et al. Zebrafish serotonin N-acetyltransferase-2 marker for development of pineal photoreceptors and circadian clock function. *Endocrinology*, 1999, 140(10): 4895-903
- [45] Gamse JT, Shen YC, Thisse C, et al. Otx5 regulates genes that show circadian expression in the zebrafish pineal complex. *Nat Genet*, 2002, 30(1): 117-21
- [46] Ziv L, Gothilf Y. *Period2* expression pattern and its role in the development of the pineal circadian clock in zebrafish. *Chronobiol Int*, 2006, 23(1-2): 101-12
- [47] Toyama R, Chen X, Jhavar N, et al. Transcriptome analysis of the zebrafish pineal gland. *Dev Dyn*, 2009, 238(7): 1813-26
- [48] Pierce LX, Noche RR, Ponomareva O, et al. Novel functions for Period 3 and Exo-rhodopsin in rhythmic transcription and melatonin biosynthesis within the zebrafish pineal organ. *Brain Res*, 2008, 1223: 11-24
- [49] Magnoli D, Zichichi R, Laurà R, et al. Rhodopsin expression in the zebrafish pineal gland from larval to adult stage. *Brain Res*, 2012, 1442: 9-14
- [50] Brandstätter R, Zaunreiter M, Fait E, et al. Signal transmission in the photosensitive pineal organ of the rainbow trout modulation of ganglion cell activity by intrinsic dopamine. *Neurochem Int*, 1995, 27(6): 473-9
- [51] Schenda J, Vollrath L. Single-cell recordings from chick pineal glands *in vitro* reveal ultradian and circadian oscillations. *Cell Mol Life Sci*, 2000, 57(12): 1785-92
- [52] Huang J, Zhong Z, Wang M, et al. Circadian modulation of dopamine levels and dopaminergic neuron development contributes to attention deficiency and hyperactive behavior. *J Neurosci*, 2015, 35(6): 2572-87
- [53] Kaneko M, Hernandez-Borsetti N, Cahill GM. Diversity of zebrafish peripheral oscillators revealed by luciferase reporting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(39): 14614-9
- [54] Tamai TK, Carr AJ, Whitmore D. Zebrafish circadian clocks: cells that see light. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(Pt 5): 962-6
- [55] Lahiri K, Vallone D, Gondi SB, et al. Temperature regulates transcription in the zebrafish circadian clock. *PLoS Biol*, 2005, 3(11): e351
- [56] Weger BD, Weger M, Diotel N, et al. Monitoring glucocorticoid signaling and circadian clock function with transgenic zebrafish reporter lines. *Endocrine Abstracts*, 2013, 31: S6.1

- 
- [57] Sekaran S, Foster RG, Lucas RJ, et al. Calcium imaging reveals a network of intrinsically light-sensitive inner-retinal neurons. *Curr Biol*, 2003, 13(15): 1290-8
- [58] Huang L, Maaswinkel H, Li L. Olfactoretinal centrifugal input modulates zebrafish retinal ganglion cell activity: a possible role for dopamine-mediated  $Ca^{2+}$  signalling pathways. *J Physiol*, 2005, 569(Pt 3): 939-48