

ELŻBIETA PYZA

*Uniwersytet Jagielloński
Muzeum Zoologiczne, Instytut Zoologii
Ingardena 6, 30-060 Kraków*

CZYNNIK ROZPRASZAJĄCY PIGMENT JAKO MEDIATOR ZEGARA BIOLOGICZNEGO OWADÓW

ZJAWISKO RYTMU I ZEGARA BIOLOGICZNEGO

Rytmy biologiczne obserwujemy w funkcjonowaniu naszego organizmu, jak również organizmów zwierzęcych i roślinnych w stosunku do zmian zachodzących w środowisku, przede wszystkim do dobowych zmian światła i ciemności. Rytmy te wykryto nawet u organizmów prokariotycznych, a przejawiają się one niemal we wszystkich procesach życiowych organizmów żywych. Jesteśmy aktywni w dzień, a znacznie mniej w nocy i podobnie zachowują się zwierzęta o dziennym, a przeciwnie o nocnym trybie życia. U wszystkich, zarówno u ludzi jak i u zwierząt, pora aktywności jest wyznaczana przez endogenne zegary biologiczne (HASTINGS i współaut. 1991). Zaburzenia rytmów i zegara biologicznego prowadzą do licznych schorzeń, więc badanie tego zjawiska u różnych organizmów ma znaczenie nie tylko poznawcze.

Chociaż rytmy biologiczne są badane od ponad 100 lat, nadal nie wiadomo, jak rytmy te są generowane i w jaki sposób zegar biologiczny sprawuje kontrolę nad funkcjonowaniem całego organizmu, synchronizując jego procesy fizjologiczne z dobowym cyklem zmian dnia i nocy oraz z innymi cyklicznymi zmianami zachodzącymi w środowisku zewnętrznym.

Wśród rytmów biologicznych wyróżnia się rytmy dobowe, roczne (sezonowe), księżycowe i inne w zależności od długości ich okresu (SAUNDERS 1977). W przypadku rytmów dobowych okres rytmu jest równy 24 godz., co oznacza, że w danym procesie zachodzą cykliczne oscylacje, w których maksima i minima występują co 24 godz.

Najważniejszą właściwością większości rytmów biologicznych jest ich endogenne pochodzenie. Oznacza to, że w tak zwanych stałych warunkach, w stałej ciemności (DD) lub w stałym świetle (LL), gdy zwierzę jest pozbawione informacji o zmianach warunków świetlnych zachodzących cyklicznie w środowisku (brak tzw. Dawcy Czasu), rytmy nadal utrzymują się dzięki wewnętrznemu zegarowi. Ich okres ulega jednak wydłużeniu lub skróceniu i staje się okołodobowy (circadian). W warunkach zmiennego oświetlenia dzień/noc (LD) rytmy okołodobowe ulegają synchronizacji do dobowych zmian światła i ciemności, zachodzących w środowisku zewnętrznym, poprzez narządy wzroku i także poprzez pozawzro-

kowe fotoreceptory, a ich okres staje się 24-godzinny (HASTINGS i współaut. 1991).

Cechy rytmów biologicznych są wyznaczane genetycznie (HALL i KYRIACOU 1990). U muszki owocowej *Drosophila melanogaster* wykryto gen, który nazwano *period* (*per*), odpowiedzialny za wyznaczanie długości okresu rytmu aktywności lokomotorycznej i rytmu wylęgu z poczwerek. W przypadku genu *per* jego mutacja *per^L* powoduje wydłużenie okresu rytmu do 29 godz., a mutacja *per^S* skrócenie okresu rytmu do 19 godz. Mutacja *per^O* powoduje natomiast całkowity zanik rytmiki. Oprócz rytmów okołodobowych, gen *per* reguluje także inne procesy rytmiczne u *Drosophila*, jak na przykład rytmikę „śpiewu” samca wabiącego samicę. Długość przerw, wynoszących 55 s, pomiędzy kolejnymi seriami dźwięków wytwarzanymi przez wibrację skrzydeł samców, ulega zmianie u mutantów *per^S* i *per^L*.

Utrzymywanie się rytmów biologicznych w stałych warunkach otoczenia oraz wyznaczanie ich parametrów przez geny wykazały więc, że rytmy okołodobowe są endogenną właściwością organizmów i muszą być generowane w specjalnych strukturach, które nazwano zegarami biologicznymi. Struktury takie zostały wykryte w ostatnich latach u kilku grup zwierząt. U ssaków zegar biologiczny zlokalizowano w mózgu, w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza, u ptaków, gadów i ryb w szyszynce, a u mięczaków w oku (HASTINGS i współaut. 1991). Jednak liczba zegarów, mechanizm działania pojedynczego zegara oraz całego biologicznego systemu zegarowego w skład którego wchodzi oprócz samego zegara tak zwane drogi doprowadzające (input), dostarczające do zegara informacje o zmianach światła w środowisku zewnętrznym, i drogi odprowadzające (output), dostarczające informacje z zegara do narządów wykonawczych (efektorowych), nadal nie są znane.

Funkcjonowanie zegara biologicznego polega więc nie tylko na generowaniu rytmów, ale także na przepływie informacji pomiędzy elementami systemu zegarowego. Tę funkcję mogą pełnić neuroprzekaźniki, substancje chemiczne przekazujące informacje pomiędzy neuronami, zwane także neurotransmiterami lub neuromediatorami. Wykrycie takich substancji w systemie zegarowym zwierząt i poznanie ich funkcji ma kluczowe znaczenie w badaniach nad zegarem.

ZEGAR BIOLOGICZNY OWADÓW

U owadów położenie zegara biologicznego wykryto w płatach wzrokowych mózgu u jednych gatunków (karaczany i świerszcze) a u innych w centralnej części mózgu (muchówki, motyle; PAGE 1985). Zegar w odizolowanym od mózgu płacie wzrokowym świerszczy lub karaczanów może samodzielnie generować rytm a transplantacja płatu wzrokowego z owada wykazującego rytm aktywności lokomotorycznej do osobnika nierytmicznego przywraca rytmikę temu ostatniemu. U świerszczy i karaczanów neurony zegara zlokalizowano w brzusznej części płatów wzrokowych, pomiędzy drugą (medulla) a trzecią (lobula) warstwą neuropilu wzrokowego (neuropil jest gęstą masą wypustek komórek nerwowych tworzących tkankę nerwową owadów). Neurony te stanowią elementy głównego zegara biologicznego (pacemaker), składającego się z dwóch oscylatorów, po

jednym w każdym płacie wzrokowym. Każdy z tych oscylatorów wysyła i otrzymuje informacje poprzez włókna nerwowe z przeciwnego płatu wzrokowego. Dzięki temu oba oscylatory są wzajemnie sprzężone ze sobą i oba mają wpływ na okres i fazę rytmu aktywności lokomotorycznej owada. Przerwanie połączenia pomiędzy oscylatorami zaburza rytm aktywności lokomotorycznej, a odcięcie czy usunięcie płatów wzrokowych u karaczanów prowadzi do zaniku rytmiki (PAGE 1985).

Lokalizację zegara biologicznego w mózgu muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) przeprowadzono badając rytm aktywności lokomotorycznej u mutantów wykazujących zmiany strukturalne w mózgu. Stwierdzono, że bezokie mutanty (*sine oculis*, *so*) oraz mutanty o zredukowanych płatach wzrokowych (*small optic lobe*, *so*) nadal są rytmiczne, a więc zegar biologiczny u muszki owocowej i zapewne u innych muchówek musi być zlokalizowany poza płatami wzrokowymi, a rytm synchronizowany przez pozawzrokowe fotoreceptory (HELFRICH i ENGELMANN 1983). U *Drosophila* wykryto również za pomocą przeciwciał miejsca występowania białka będącego produktem genu *per* — genu zegara. Występowanie tego białka stwierdzono w fotoreceptorach, w niektórych neuronach i komórkach glejowych w płatach wzrokowych, w centralnej części mózgu oraz w zwojach brzuszno-łancuszkowego nerwu, a także w tkankach poza układem nerwowym, takich jak gruczoły ślinowe, cewki Malpighiego, jajniki, jądra i przelyk (LIU i współaut. 1988). Białka podobne do białka PER muszki owocowej wykryto także u świerszczy i motyli, a nawet w jądrach nadskrzyżowaniowych szczura. Co więcej, okazało się, że białko PER syntetyzowane jest także w rytmie dobowym, a zmiany w jego występowaniu zachodzące pod wpływem manipulacji genetycznych lub różnych warunków świetlnych otoczenia, odpowiadały zmianom obserwowanym w rytmie aktywności lokomotorycznej *Drosophila* na skutek takich samych manipulacji (HALL 1995). Okołodobowe oscylacje w syntezie białka PER wykryto u *Drosophila* w fotoreceptorach, w neuronach i komórkach glejowych płatów wzrokowych oraz w centralnej części mózgu (protocerebrum), a jego maksimum przypadało na środek nocy. Stwierdzono także, że proces transkrypcji również przebiega rytmicznie, a poziom mRNA oscyluje w rytmie okołodobowym, z maksimum przypadającym na koniec dnia, a więc pojawiającym się wcześniej niż maksimum poziomu białka PER (HALL 1995). Nie wszystkie jednak komórki, w których wykryto obecność białka PER, są jednakowo niezbędne do utrzymania rytmu aktywności lokomotorycznej u muszki owocowej. Neurony, które mają kluczowe znaczenie dla tego rytmu zlokalizowano po obu stronach mózgu pomiędzy medulla a protocerebrum (SIWICKI i współaut. 1988, ZERR i współaut. 1990). Neurony te nazwano neuronami lateralnymi (*lateral neurones*, *LN*s) i uważa się je za neurony zegara biologicznego, chociaż *LN*s prawdopodobnie nie są jedynymi elementami zegara w mózgu much (EWER i współaut. 1992). U mutantów *Drosophila* zwanych *disco* (*disconnected*), u których połączenie pomiędzy fotoreceptorami a mózgiem jest przerwane na skutek silnej redukcji płatów wzrokowych, *LN*s nie występują i mutanty te są nierytmiczne (DUSHAY i współaut. 1989, ZERR i współaut. 1990). W *LN*s u *Drosophila* oprócz białka PER wykryto również peptyd podobny do peptydów znanych wcześniej u skorupiaków, zwanych hormonami rozpraszającym pigment (*PDH*s, *pigment-dispersing hormones*) (HELFRICH-FÖRSTER 1995),

co pozwoliło na wysunięcie hipotezy, że peptyd ten może być mediatorem zegara biologicznego owadów.

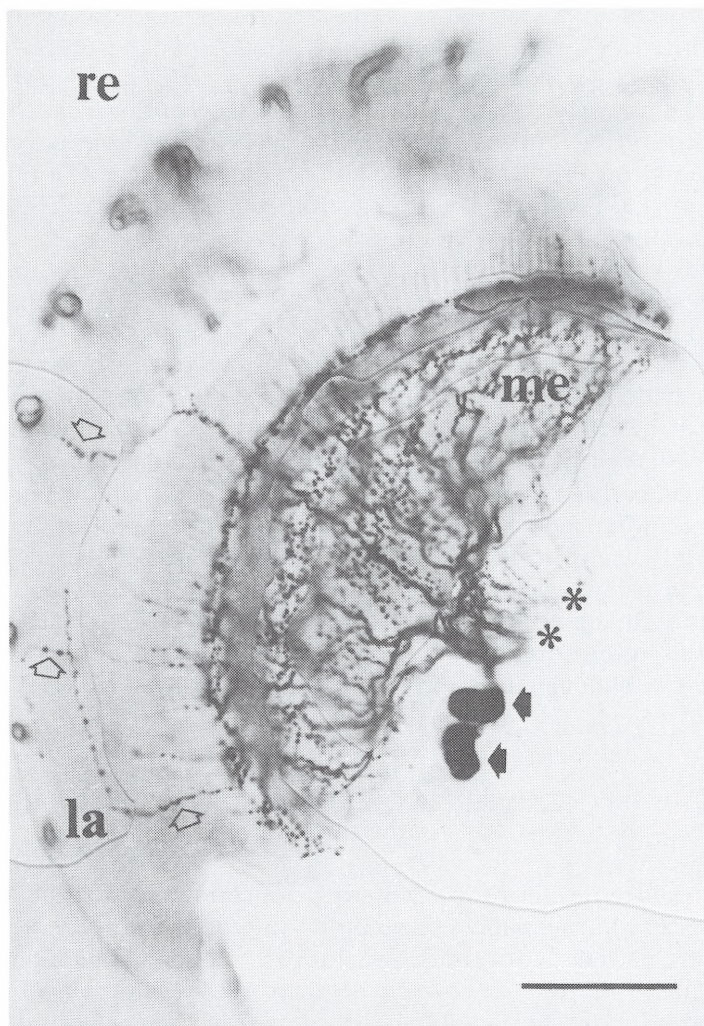
PDH W UKŁADZIE NERWOWYM OWADÓW

Hormony rozpraszające pigment stanowią rodzinę oktadekapeptydów wyizolowanych z różnych gatunków skorupiaków, u których poznano do tej pory strukturę dwóch różnych form PDH: α i β (RAO i RIEHM 1989). PDH reguluje przemieszczanie się pigmentu w fotoreceptorach oka skorupiaków w wyniku adaptacji do światła oraz bierze udział w zmianach ubarwienia ciała skorupiaków (RAO 1985). Kraby potrafią zmieniać ubarwienie ciała w zależności od podłoża, na którym się znajdują a proces ten jest regulowany hormonalnie. Te zmiany barwy ciała polegają na rozpraszaniu (ciemnienie ciała) lub skupianiu (rozjaśnianie barwy ciała) ziarenek czarnego u jednych gatunków a czerwonego u innych pigmentu znajdującego się w chromatoforach, czyli komórkach barwnikowych. W procesie tym biorą udział dwie substancje: hormon skupiający i hormon rozpraszający pigment.

W odróżnieniu od hormonów rozpraszających pigment skorupiaków, wykryty u owadów hormon rozpraszający pigment nazwano czynnikiem rozpraszającym pigment (PDF, pigment-dispersing factor), chociaż u owadów nie reguluje on migracji pigmentu. Peptydy PDF owadów wykazują 78-83% podobieństwa w sekwencji aminokwasów do β PDH krabów, a zostały wyizolowane z karaczana *Periplaneta americana*, pasikonika *Romalea microptera* oraz świerszcza *Acheta domesticus*. O podobieństwie tych peptydów u owadów i skorupiaków świadczy fakt, że ekstrakt mózgu muchy zawierający PDF wywołuje rozproszenie pigmentu w chromatoforach kraba *Uca pugnator*, którego pozbawiono własnego PDH (RAO i RIEHM 1989).

Komórki immunoreaktywne do PDH, czyli takie w których wykryto, jak sądzi się, obecność PDF stosując przeciwciała anti- β PDH, badano do tej pory u kilku gatunków owadów. U świerszczy i karaczanów trzy grupy ciał komórkowych neuronów immunoreaktywnych do PDH znajdują się w płatach wzrokowych: dwie grupy w lamina na stronie brzusznej i grzbietowej oraz jedna, licząca 9-17 komórek, w medulla (HOMBERG i współaut. 1991). U muchówek ciała komórkowe neuronów immunoreaktywnych do PDH występują tylko w medulla płatów wzrokowych, a także w grzbietowej części protocerebrum, w rejonie kielichów ciał grzybkowatych i w pars intercerebralis. U muchy domowej w medulla każdego płatu wzrokowego znajdują się dwie grupy tych neuronów: grupa czterech neuronów o dużych ciałach komórkowych i druga grupa, również czterech neuronów, o małych ciałach komórkowych (fot. 1). Ciała komórkowe dużych neuronów wysyłają włókna nerwowe do obu płatów wzrokowych, do płatu leżącego po tej samej stronie co dana grupa neuronów, jak również do płatu leżącego po przeciwnej stronie mózgu i tworzą gęstą sieć włókien nerwowych przede wszystkim w obu medulla. Nieco mniej jest tych włókien w lobula, a pojedyncze wypustki docierają do lamina. Małe neurony unerwiają z kolei protocerebrum tworząc liczne wypustki w rejonie szesnastu ciał komórkowych neuronów immunoreaktywnych do PDH leżących w protocerebrum. Neurony

o małych ciałach komórkowych unerwiają także płaty wzrokowe, ale ich wypustki nerwowe są w płatach wzrokowych nieliczne (Pyza, dane własne). Podobne rozmieszczenie neuronów immunoreaktywnych do PDH występuje też u *Drosophila*



Fot. 1. Zdjęcie mikroskopowe neuronów immunoreaktywnych do PDH w płacie wzrokowym mózgu muchy domowej (frontalny skrawek mózgu o grubości 100 μm).

Ciała komórkowe dużych neuronów (pełne strzałki) są widoczne na wewnętrznej, brzusznej stronie medulla, a ich włókna nerwowe w medulla i lamina (puste strzałki). Neurony te wysyłają również aksony do przeciwległej medulla, więc część włókien widocznych na zdjęciu w medulla pochodzi z neuronów położonych w przeciwległej medulla. Ciała komórkowe małych neuronów (niewidoczne na zdjęciu), których aksony są zaznaczone gwiazdkami, wysyłają włókna nerwowe zarówno do płatu wzrokowego, jak i do grzbietowej części protocerebrum. Skalę powiększenia wyznacza pozioma kreska odpowiadająca 100 μm w prawym, dolnym rogu zdjęcia. re — siatkówka oka, la — lamina, pierwsza warstwa neuropilu płatu wzrokowego, me — medulla, druga warstwa neuropilu płatu wzrokowego (zdjęcie oryginalne).

phila, chociaż neurony te są mniej liczne i na przykład w płacie wzrokowym ich dendryty nie docierają do lamina (NÄSSEL i współaut. 1993). Wiąże się to zapewne z mniejszymi rozmiarami mózgu u muszki owocowej niż u muchy domowej.

U wszystkich badanych owadów neurony, których ciała komórkowe są zlokalizowane w medulla, wykazują pewne morfologiczne podobieństwa (HOMBERG i współaut. 1991, NÄSSEL i współaut. 1993). Ciała komórkowe tych neuronów są zlokalizowane w podobnym rejonie, tworzą podobną sieć włókien nerwowych w medulla i wysyłają wypustki do sąsiedniego płatu wzrokowego. Neurony te mają też dendryty w lamina — w strukturze, która pośredniczy w przekazywaniu informacji świetlnych z siatkówki do mózgu i prawdopodobnie bierze udział w regulacji aktywności komórek wzrokowych siatkówki (PYZA i MEINERTZ-HAGEN 1995a, 1996). Neurony immunoreaktywne do PDH kontaktują się również z pozawzrokowymi fotoreceptorami znajdującymi się w pobliżu tylnej krawędzi oka, pomiędzy siatkówką a pierwszą warstwą neuropilu wzrokowego (HOFBAUER i BUCHNER 1989, HELFRICH-FÖRSTER i HOMBERG 1993). Fotoreceptory te są odpowiedzialne przypuszczalnie za synchronizację rytmów okołodobowych z naturalnym cyklem dnia i nocy (HELFRICH i ENGELMANN 1983). Neurony immunoreaktywne do PDH o małych ciałach komórkowych wysyłają włókna nerwowe do grzbietowego rejonu protocerebrum (superior protocerebrum), który pełni funkcję integrującą (otrzymuje informacje z różnych narządów zmysłów) i kontaktuje się z układem neurosekrecyjnym w pars intercerebralis (odpowiedzialnym za regulację wielu procesów fizjologicznych u owadów) a także z układem motorycznym w tułowiowych zwojach brzuszno-łancuszkowego nerwowego (HELFRICH-FÖRSTER i HOMBERG 1993, STENGL i HOMBERG 1994, HELFRICH-FÖRSTER 1995). Neurony immunoreaktywne do PDH występują więc w kluczowych dla regulacji rytmów biologicznych strukturach ośrodkowego układu nerwowego owadów.

ROLA PDF W REGULACJI RYTMÓW BIOLOGICZNYCH U ŚWIRSZCZY I KARACZANÓW

Podobne położenie neuronów zegara i neuronów wykazujących obecność PDF u świerszczy i karaczanów pozwoliło na przypuszczenie, że mogą to być te same neurony. Co więcej, drogi nerwowe, które przechodzą przez centralną część mózgu od jednego płatu wzrokowego do drugiego i wykazują obecność PDF, mogłyby stanowić drogi łączące oba oscylatory zegara u świerszczy i karaczanów. U karaczana *Leucophea maderae* i u świerszcza *A. domesticus* morfologia neuronów PDF wykazuje wyraźną korelację z cechami rytmiki aktywności lokomotorycznej obserwowanej u obu tych gatunków. Karaczany wykazują silny dobowy rytm aktywności lokomotorycznej, którego maksimum przypada na godziny nocne i stabilny rytm o okresie krótszym od 24 godz. w DD. W przeciwieństwie do karaczanów świerszcze są aktywne głównie pod koniec dnia i na początku nocy, a ich rytm aktywności lokomotorycznej wykazuje często zaburzenia i łatwo ulega rozszczepieniu na dwa rytmy składowe, pochodzące z dwóch oscylatorów, w prawym i w lewym płacie wzrokowym. Te różnice w rytmice aktywności lokomotorycznej zależą od stopnia sprzężenia pomiędzy oscylatorami

zegara, które musi być silne u karaczanów, a słabe u świerszczy. Włókna nerwowe immunoreaktywne do PDH, przechodzące przez centralną część mózgu, są liczne u karaczana, a prawie nie występują u świerszcza, co wskazuje, że PDF może brać udział we wzajemnych interakcjach oscylatorów zegara (HOMBERG i współaut. 1991).

Kolejne badania przeprowadzone na karaczanach wyraźnie wykazały zależność pomiędzy rytmiką aktywności lokomotorycznej a obecnością PDF w aksonach neuronów łączących płaty wzrokowe. Degeneracja tych aksonów w wyniku odcięcia płatów wzrokowych od mózgu i ich regeneracja po 12–38 dniach od operacji była skorelowana kolejno z zanikaniem i pojawianiem się rytmiki aktywności lokomotorycznej. Co więcej, liczba zregenerowanych włókien nerwowych, zawierających PDF, miała wpływ na długość okresu rytmu u karaczanów, które odzyskały rytmikę aktywności. Im więcej było włókien nerwowych w zregenerowanym szlaku nerwowym, tym okres rytmu był krótszy (STENGL i HOMBERG 1994).

Iniekcje PDH w okresie poprzedzającym fazę wysokiej aktywności ruchowej karaczanów również działają na rytm aktywności ruchowej wywołując opóźnienie fazy rytmu, co wskazuje, że rytm aktywności zależy od poziomu PDF w płatach wzrokowych (PETRI i STENGL 1994).

U świerszczy aksomy w centralnej części mózgu, zawierające PDF, nie degenerują po odcięciu płatów wzrokowych, a rytm aktywności lokomotorycznej nadal utrzymuje się u większości osobników. Dowodzi to obecności u świerszczy prawdopodobnie drugiego zegara w centralnej części mózgu, którego funkcjonowanie jest związane z obecnością PDF w centralnej części mózgu (STENGL 1995).

PDF A REGULACJA RYTMÓW BIOLOGICZNYCH U MUCHÓWEK

Niezależne badania rytmiki zachowania i PDF u muszki owocowej także potwierdziły wyraźny związek pomiędzy morfologią neuronów immunoreaktywnych do PDH w mózgu a rytmem aktywności lokomotorycznej. Mutanty muszki owocowej *disco*, nierytmiczne pod względem aktywności lokomotorycznej, nie posiadają zarazem neuronów immunoreaktywnych do PDH w medulla płatów wzrokowych (HELFRICH-FÖRSTER i HOMBERG 1993). U innych mutantów *Drosophila*, o zredukowanych płatach wzrokowych (mutanty *so* i *sol*) rytm aktywności lokomotorycznej jest prawie normalny, a mutanty te posiadają neurony immunoreaktywne do PDH, chociaż ich morfologia ulega zmianie. Włókna nerwowe immunoreaktywne do PDH, które przebiegają posterioralnym szlakiem wzrokowym od jednego do drugiego płatu wzrokowego, u mutantów *so* i *sol* opuszczają szlak wzrokowy i kończą się nie w medulla lecz w innych rejonach mózgu. Ta zmiana kierunku wiąże się najprawdopodobniej z brakiem tkanki docelowej, jaką dla tych neuronów jest medulla. Mutanty *Drosophila sol* i *so* mają też mniejszą liczbę włókien nerwowych immunoreaktywnych do PDH w posterioralnym szlaku wzrokowym, od których prawdopodobnie zależy stabilność rytmiki, ponieważ mutanty te często wykazują rozszczepienie rytmu aktywności lokomotorycznej (HELFRICH-FÖRSTER i HOMBERG 1993). Tak więc PDF bierze udział we wzajemnym sprzężeniu oscylatorów zegara także u muszki owocowej.

Wykrycie obecności PDF w neuronach LNs, wykazujących ekspresję genu *per*, dostarczyło kolejnego dowodu, że ten neuropeptyd występuje w neuronach zegara biologicznego i może brać udział w regulacji rytmów biologicznych u owadów. U muszki owocowej wykryto PDF w LNs położonych na brzusznej stronie mózgu. Neurony te odpowiadają czterem neuronom immunoreaktywnym do PDH o dużych ciałach komórkowych, wykrytych metodami immunohistochemicznymi w medulla płatów wzrokowych u much (HELFRICH-FÖRSTER 1995). Dendryty tych neuronów w dystalnej części medulla są położone z kolei w bliskim sąsiedztwie komórek glejowych zawierających białko PER. Takie położenie może świadczyć o wzajemnych interakcjach pomiędzy neuronami PDF a komórkami glejowymi (HELFRICH-FÖRSTER 1995). W układzie wzrokowym komórki glejowe otaczają neurony, których aktywność mogłaby być regulowana przez PDF za ich pośrednictwem, albo dzięki wzajemnym interakcjom pomiędzy neuronami PDF i komórkami glejowymi wykazującymi ekspresję genu *per*. Udział komórek glejowych zawierających białko PER stwierdzono w regulacji rytmiki aktywności lokomotorycznej u muszki owocowej (EWER i współaut. 1992) oraz w regulacji rytmów biologicznych u innych zwierząt. U ssaków uszkodzenie komórek glejowych w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza mózgu, uważanych za miejsce występowania zegara biologicznego u tych zwierząt, zaburza endogenne rytmy aktywności neuronów zegara (PROSSER i współaut. 1994).

UDZIAŁ PDF W REGULACJI RYTMÓW W UKŁADZIE WZROKOWYM

Neurony PDF w medulla mogą kontaktować się więc bezpośrednio albo pośrednio z neuronami układu wzrokowego położonymi w lamina, które w medulla mają swe zakończenia. Neurony PDF mogą być neuronami zegara lub neuronami pośredniczącymi, dostarczającymi informację z zegara do neuronów układu wzrokowego regulując ich aktywność w ciągu doby (PYZA i MEINERTZHAGEN 1996). Badania przeprowadzane na karaczanach wykazały, że ten sam zegar biologiczny reguluje zarówno rytm aktywności lokomotorycznej, jak i rytm zmian wrażliwości siatkówki na światło. Zatem informacje generowane w tym samym zegarze są dostarczane do różnych narządów efektorowych, gdzie uwidacznia się ich ekspresja (WILLS i współaut. 1985). W siatkówce oka karaczanów a także u wielu innych zwierząt wykryto szereg rytmów biologicznych takich jak: rytm aktywności elektrycznej fotoreceptorów rejestrowanej jako tak zwany elektretinogram (ERG), rytm syntezy i degradacji barwników wzrokowych, rytm powstawania i rozpadu światłoczułych błon wychwytyjących fotony światła oraz rytmiczne migracje pigmentu (BARLOW i współaut. 1989). Rytmu te obserwowano u większości zwierząt, zarówno u kręgowców, jak i u bezkręgowców.

U wyższych muchówek, do których należy mucha domowa i muszka owocowa, fotoreceptory siatkówki nie wykazują wyraźnego, endogenne rytmu ERG czy budowy i rozpadu światłoczułych błon. Rytmikę endogenną wykryto natomiast w lamina, w pierwszej warstwie neuropilu wzrokowego leżącego za siatkówką w płacie wzrokowym mózgu (PYZA i MEINERTZHAGEN 1993, 1995a). W lamina ma swoje zakończenia sześć fotoreceptorów (R1-R6) z każdego ommatidium oka złożonego muchy, zaś dwa pozostałe fotoreceptory, komórki wzrokowe

R7 i R8 przechodzą przez lamina i kończą się w medulla — w następnej warstwie neuropilu wzrokowego. Zakończenia fotoreceptorów R1–R6 tworzą połączenia synaptyczne (miejsca przekazywania impulsów nerwowych pomiędzy neuronami), tak zwane synapsy tetradyczne (synapsy utworzone pomiędzy czterema komórkami, jedną presynaptyczną i trzema postsynaptycznymi) z interneuronami (neuronami pośredniczącymi) lamina zwanymi komórkami monopolarnymi L1 i L2, które są jednymi z elementów tych synaps (BURKHARDT i BRAITENBERG 1976). Komórki L1 i L2 odbierają informacje wzrokowe z fotoreceptorów i transmitują je do wyższych ośrodków nerwowych w mózgu. Z kolei jedna z komórek monopolarnych, L2, tworzy z fotoreceptorami R1–R6 synapsy skierowane przeciwnie, tak zwane synapsy zwrotne (feedback), z powrotem na komórki R1–R6 (STRAUSFELD and CAMPOS-ORTEGA 1977). Liczba tych obu rodzajów synaps, tetradycznych i zwrotnych, nie jest stała w ciągu doby. Najwięcej synaps tetradycznych tworzy się na początku dnia, a synaps zwrotnych na początku nocy. Co więcej, w przypadku synaps zwrotnych rytm zmian ich liczby utrzymuje się również w stałej ciemności lub w stałym świetle, czyli jest generowany endogenne. Liczba synaps tetradycznych jest regulowana natomiast głównie przez światło, które z kolei nie ma wpływu na rytm dobowy zmian liczby synaps zwrotnych.

W lamina oprócz rytmiki zmian liczby synaps wykryto także rytm zmian objętości aksonów komórek monopolarnych L1 i L2. Objętość aksonów tych komórek rośnie w ciągu dnia a maleje w nocy. Rytm zmian wielkości komórek monopolarnych zachodzi również w DD i w LL, a więc jest endogenne. Komórki L1 i L2 zmieniają swoją objętość pod wpływem informacji napływających z zegara, chociaż bezpośrednie działanie bodźca świetlnego ma również wpływ na objętość neuronów L1 i L2, ponieważ w warunkach stałego światła ich średnia objętość jest większa niż w stałej ciemności. Wstępne badania wykazały też, że rytmicznym zmianom objętości aksonów interneuronów towarzyszą zmiany wielkości komórek glejowych otaczających interneurony i zakończenia fotoreceptorów w lamina. Komórki glejowe powiększają się w ciągu nocy a kurczą się w czasie dnia, odwrotnie niż komórki monopolarne L1 i L2.

Wielkość komórek monopolarnych jest zatem regulowana przez zegar biologiczny, chociaż nie jest wykluczone, że obserwowany efekt jest pośredni i jest wynikiem działania zegara na inne komórki, na przykład glejowe, które z kolei regulują szereg innych procesów, w tym także objętość komórek monopolarnych. Informacja z zegara mogłaby docierać do interneuronów L1 i L2 za pośrednictwem neuroprekaźnika. Okazało się, że niektóre neurotransmitery wykryte w lamina mogą zmieniać wielkość komórek monopolarnych, co wskazuje, że mogłyby pośredniczyć w tym procesie. Iniekcje takich neurotransmiterów, jak serotonina i histamina do płatu wzrokowego muchy domowej wywoływały istotny wzrost wielkości, ale tylko jednej komórki monopolarnej L1. Kurczenie się aksonów obu tych komórek zaobserwowano po iniekcjach kwasu glutaminowego i γ -aminomasłowego (GABA), natomiast wzrost objętości obu interneuronów wywoływały iniekcje PDF karaczana (PYZA i MEINERTZHAGEN 1996).

Wyniki uzyskane w tych doświadczeniach wykazały więc, że rytmy wykryte w układzie wzrokowym muchy mogą być regulowane przez zegar biologiczny za pośrednictwem PDF. Objętość aksonów obu komórek wzrasta po iniekcji PDF

podobnie jak w czasie dnia, zatem wzrost wymiarów interneuronów L1 i L2 może być związany z uwalnianiem PDF w ciągu dnia. Wstępne badania wykazały, że średnica dendrytów neuronów immunoreaktywnych do PDH w medulla jest większa w ciągu dnia niż w nocy, co przypuszczalnie wiąże się ze wzrostem poziomu PDF w ciągu dnia (PYZA i MEINERTZHAGEN 1995b). PDF może więc dostarczać endogenne informacje generowane w zegarze do układu wzrokowego, który w ten sposób może „przewidywać” dobowe zmiany dnia i nocy w otoczeniu.

PDF JAKO MEDIATOR ENDOGENNYCH OSCYLACJI ZEGARA BIOLOGICZNEGO

Niezależne odkrycie wpływu PDH i PDF na endogenny rytm aktywności lokomotorycznej u świerszczy, karaczanów i much oraz aktywności układu wzrokowego u muchy pozwala na stwierdzenie, że PDF bierze udział w regulacji różnego typu rytmów biologicznych u owadów. Obecność tego peptydu w neuronach, w których ujawnia się również ekspresja genu *per*, jak również sąsiedztwo włókien nerwowych immunoreaktywnych do PDH z komórkami glicyjowymi wykazującymi obecność białka PER potwierdza bezpośredni udział tego neuro-peptydu w systemie zegarowym owadów. Ponieważ ekspresja genu *per* w neuronach uwidacznia się tylko w ich ciałach komórkowych a obecność PDF zaznacza się w całych komórkach, wiadomo obecnie, gdzie docierają aksony i dendryty neuronów zegara zawierających białko PER i PDF. Nie wiadomo jednak, czy PDF pośredniczy w przekazywaniu informacji z zegara do układu wzrokowego, motorycznego i prawdopodobnie także do innych organów jako neuroprzekaznik, czy jest on hormonalnym mediatorem tych informacji, czy też endogennym neuromodulatorem aktywności innych neuronów w płatach wzrokowych i w protocerebrum. Kwestie te pozostają przedmiotem dalszych badań. Na odpowiedź oczekują również pytania, w jaki sposób informacja dostarczana przez PDF jest odbierana przez narządy efektorowe i jak zmieniają się właściwości neuronów docelowych, stymulujących lub hamujących dany układ lub narząd w taki sposób, że jest on aktywny o określonej porze doby.

PIGMENT-DISPERSING FACTOR AS A MEDIATOR IN THE INSECT'S CIRCADIAN CLOCK

Summary

Recently, independent studies have shown that the neuropeptide pigment-dispersing hormone (PDH) is involved in regulating insect circadian rhythms. PDH has been found in crustaceans, in which it regulates pigment migration in the photoreceptors and chromatophores. Insects have a homologue of the PDH peptide, called a pigment-dispersing factor (PDF), and in some insects several neurones of the optic lobes and midbrain which express PDH immunoreactivity, presumably contain PDF. Those with cell bodies located in the medulla of both optic lobes have similar forms in several insect species. Their somata are located in the same general region as those of the pacemaker neurones in cockroaches, crickets and flies. In *Drosophila*, pacemaker neurones that express the product of the *period* gene, an essential gene of the circadian clock, also express PDH immunoreactivity. Moreover, a strong correlation has been found between the morphology of the medulla PDF neurones and circadian rhythms in cockroaches, crickets and flies. The rhythm of locomotor activity in the cockroach disappears when the optic lobes are disconnected from the central brain and the PDH-immunoreactive fibres in the posterior optic tract degenerate. The circadian rhythm of locomotion

tor activity in *Drosophila* is impaired in a mutant *disconnected* which lacks medulla PDH-immunoreactive neurones.

The role of PDF in regulating circadian rhythms has been suggested not only in behavioural rhythms but is also implicated in two structural circadian rhythms recently detected in the fly's visual system, namely, in: 1) the number of feedback and tetrad synapses formed between photoreceptor terminals and two interneurons of the first visual neuropile (or lamina), L1, L2; and 2) the sizes of L1 & L2, the lamina axons of which swell during the day and shrink during the night. Injections of PDF mimic the size increase of both L1 and L2 during the day under day/night conditions.

PDH-immunoreactive medulla neurones which have dense arborizations in the medulla — where L1 and L2 terminate — may mediate the direct transfer of circadian information to those cells, regulating their activity. L1 and L2 could additionally receive circadian information directly or indirectly through glia cells, which also express the *period* gene.

It seems that PDH-immunoreactive neurones connect all parts of the central nervous system important for the expression of circadian rhythms. Not only do they connect oscillators in the medullae of both optic lobes, they also send fibres to both the visual system and to the superior protocerebrum which is considered to be an integrative neuropile. It receives inputs from different sensory neuropiles, is linked to the neurosecretory system in the brain and indirectly connected to motor centres in the thorax.

LITERATURA

- BARLOW R. B. Jr, CHAMBERLAIN S. C., LEHMAN H. K., 1989. *Circadian rhythms in the invertebrate retina*. [W:] *Facets of vision*. D. G. STAVENGA i R. G. HARDIE (red.) Springer-Verlag, Berlin. 257–280.
- BURKHARD W., BRAITENBERG V., 1976. *Some peculiar synaptic complexes in the first visual ganglion of the fly Musca domestica*. Cell Tissue Res. 173, 287–308.
- DUSHAY M. S., ROSBASH M., HALL J. C., 1989. *The disconnected visual mutations in Drosophila melanogaster drastically disrupt circadian rhythms*. J. Biol. Rhythms 4, 1–27.
- EWER J., FRISCH B., HAMBLIN-COYLE, ROSBASH M., HALL J. C., 1992. *Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of Drosophila adults and mosaic analysis of these cells influence on circadian behavioral rhythms*. J. Neurosci. 12, 3321–3349.
- HALL J. C., KYRIACOU C. P., 1990. *Genetics of biological rhythms in Drosophila*. Adv. Insect Physiol. 22, 221–298.
- HALL J. C., 1995. *Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks*. Trends Neurosci. 18, 203–240.
- HASTINGS J. W., RUSAK B., BOULOS Z., 1991. *Circadian rhythms: the physiology of biological timing*. [W:] *Neural and integrative animal physiology*. C. L. PROSSER (red.). Wiley-Liss, Inc., New York, 435–546.
- HELFRICH C., ENGELMANN W., 1983. *Circadian rhythm of the locomotor activity in Drosophila melanogaster and its mutants "sine oculis" and "small optic lobe"*. Physiol. Entomol. 8, 257–272.
- HELFRICH-FÖRSTER C., HOMBERG U., 1993. *Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the nervous system of wild-type Drosophila melanogaster and of several mutants with altered circadian rhythmicity*. J. Comp. Neurol. 337, 177–190.
- HELFRICH-FÖRSTER C., 1995. *The period clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 612–616.
- HOFBAUER A., BUCHNER E., 1989. *Does Drosophila have seven eyes?* Naturwissenschaften 76, 335–336.
- HOMBERG U., WÜRDEN S., DIRCKSEN H., RAO K. R., 1991. *Comparative anatomy of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the brain of orthopteroid insects*. Cell Tissue Res. 266, 343–357.
- LIU X. L., LORENZ J. YU Q., HALL J. C., ROSBASH M., 1988. *Spatial and temporal expression of the period gene in Drosophila melanogaster*. Genes Dev. 2, 228–238.
- NÄSSEL D. R., SHIGA S., MOHRHERR C. J., RAO K. R., 1993. *Pigment-dispersing hormone-like peptide in the nervous system of the flies Phormia and Drosophila: immunocytochemistry and partial characterization*. J. Comp. Neurol. 331, 183–198.
- PAGE T. L., 1985. *Clocks and circadian rhythms*. [W:] *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology*. G. A. KERKUT i L. I. GILBERT (red.) Pergamon Press, Oxford, 9, 577–671.

- PETRI B., STENGL M., 1994. *The role of neuropeptides in the generation of circadian rhythms in the cockroach Leucophaea maderae*. [W:] *Göttingen Neurobiology Report 1994*. N. ELSNER, BREER H. (red.) G. THIEME, Stuttgart, New York, 314.
- PROSSER R. A., EDGAR D. M., HELLER H.C., MILLER J.D. 1994. *A possible glial role in the mammalian circadian clock*. *Brain Res.* 643, 296–301.
- PYZA E., MEINERTZHAGEN I. A., 1993. *Daily and circadian rhythms of synaptic frequency in the first visual neuropile of the housefly (Musca domestica L.) optic lobe*. *Proc. Roy. Soc. London* 254, 97–105.
- PYZA E., MEINERTZHAGEN I. A., 1995a. *Monopolar cell axons in the first optic neuropil of the housefly, Musca domestica L., undergo daily fluctuations in diameter that have a circadian basis*. *J. Neurosci.* 15, 407–418.
- PYZA E., MEINERTZHAGEN I. A., 1995b. *The role of the pigment dispersing hormone peptide in regulating circadian rhythms in the lamina neuropile of the housefly's optic lobe*. Abstracts of the Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, 162.
- PYZA E., MEINERTZHAGEN I. A., 1996. *Neurotransmitters regulate rhythmic size changes amongst cells in the fly's optic lobe*. *J. Comp. Physiol. A* 178, 33–45.
- RAO K. R., 1985. *Pigmentary effectors*. [W:] *The biology of Crustacea*. D. E. BLISS, L. H. MANTEL (red.), Academic Press, New York, 9, 395–462.
- RAO K. R., RIEHM J. P., 1989. *The pigment-dispersing hormone family: chemistry, structure activity relations, and distribution*. *Biol. Bull.* 177, 225–229.
- SAUNDERS D. S., 1977. *An Introduction to Biological Rhythms*. Blackie, Glasgow and London.
- SIWICKI K. K., EASTMAN C., PETERSEN G., ROSBASH M., HALL J. C., 1988. *Antibodies to the period gene product of Drosophila reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system*. *Neuron* 1, 141–150.
- STENGL M., HOMBERG U. 1994. *Pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the cockroach Leucophaea maderae share properties with circadian pacemaker neurons*. *J. Comp. Physiol. A* 175, 203–213.
- STENGL M., 1995. *Pigment-dispersing hormone-immunoreactive fibers persist in crickets which remain after bilateral transection of the optic stalks*. *J. Comp. Physiol. A* 176, 217–228.
- STRAUSFELD N. J., CAMPOS-ORTEGA J. A., 1977. *Vision in insects: pathways possibly underlying neural adaptation and lateral inhibition*. *Science* 195, 894–897.
- WILLS, S. A., PAGE, T. L., COLWELL, C. S., 1985. *Circadian rhythms in the electroretinogram of the cockroach*. *J. Biol. Rhythms* 1, 25–37.
- ZERR D. M., HALL J. C., ROSBASH M., SIWICKI K. K., 1990. *Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of Drosophila*. *J. Neurosci.* 10, 2749–2762.