

MONIKA BAŁYS

Muzeum Zoologiczne

Pracownia Neuroetologii Owadów, Instytut Zoologii

Uniwersytet Jagielloński

Ingardena 6, 30-060 Kraków

e-mail: balys@zukunft.iz.uj.edu.pl

ROLA TLENKU AZOTU W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM U OWADÓW

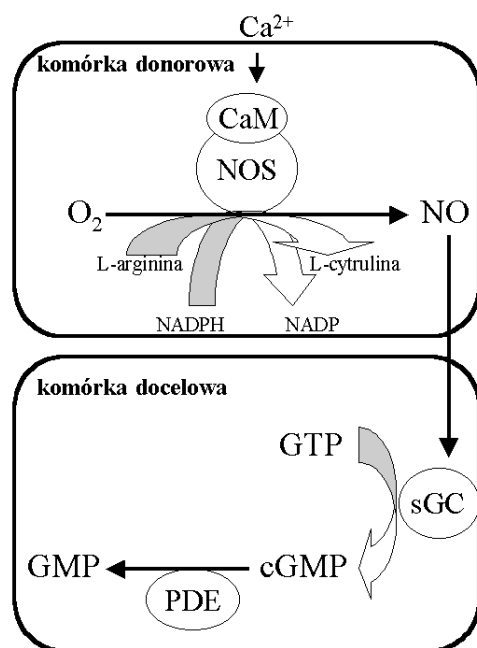
Tlenek azotu (NO) jest swobodnie przenikającym przez błony gazem, pełniącym funkcję wtórnego przekaźnika komórkowego. Aktywuje on rozpuszczalną, zależną od kompleksów kalmodulina- Ca^{2+} , cyklazę guanylanową (GC) odpowiedzialną za syntezę 3',5'-cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP). NO jest cząsteczką o dużej lipofilności, dlatego może przenikać swobodnie z miejsc syntezy, poprzez błony komórkowe, do miejsc docelowych wywierając działanie bezpośrednio we wnętrzu komórki. NO jest syntetyzowany z L-argininy przez enzym syntazę tlenku azotu (NOS). Okres połowicznego trwania NO w płynach fizjologicznych wynosi zaledwie kilka sekund. Wszystko to sprawia, że NO jest niekonwencjonalnym neurotransmiterem, który aktywując GC prowadzi do wytworzenia

cGMP. Nukleotyd ten z kolei może wpływać na aktywność kanałów jonowych, kinaz białkowych i fosfodiesteraz. Gen kodujący NOS u owadów (*Drosophila melanogaster*), wykazuje 43% homologii do genu kodującego NOS u ssaków (REGULSKI i TULLY 1995). NOS u *D. melanogaster* (DNOS), podobnie jak NOS u ssaków, posiada miejsca wiążące kalmodulinę, FMN (mononukleotyd flawinowy), FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy) i NADPH (fosforan dinukleotydu nikotynaminoadeninowego). DNOS jest aktywowana kompleksem Ca^{2+} /kalmodulina (REGULSKI i TULLY 1995). Strukturalne podobieństwo syntazy NO u owadów i ssaków sugeruje, że jest to konserwatywna cząsteczka, a jej funkcja w trakcie ewolucji nie uległa zmianie (Ryc 1).

TLENEK AZOTU W UKŁADZIE WĘCHOWYM

U ssaków udział systemu NO/cGMP stwierdzono w procesach węchowych. NO/cGMP zaangażowany jest w transdukcję bodźców węchowych i ich przetwarzanie w opuszkach węchowych, a w węchowych komórkach receptorowych cGMP bierze udział w mechanizmie adaptacji (BREER i SHEPHERD 1993). Zarówno opuszki węchowe ssaków, jak i płaty czułkowe owadów są obszarem mózgu, gdzie występuje szczególnie wysokie stężenie NOS. Wysoką aktywność syntazy NO obserwowano m.in. w płatach czułkowych pszczoły (*Apis mellifera*)

(MÜLLER i HILDENRANDT 1995), muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*) (MÜLLER i BUCHNER 1993) i szarańczy (*Schistocerca gregaria*) (MÜLLER i BICKER 1994). U tych gatunków owadów miejscem syntezy NO są neurony pośredniczące (interneurony), unerwiające płaty czułkowe. U szarańczy jest to wiązka 45–50 lokalnych interneuronów w płacie czułkowym. Analogicznie do opuszek węchowych u ssaków, neuropil w płatach czułkowych u owadów zbudowany jest z jednostek – glomerul. Uwalniane przez zakończenia in-



Rys. 1. Schemat drogi sygnałowej angażującej NO-cGMP.

Aktywność neuronalną w komórce donorowej prowadzi do napływu Ca^{2+} , który poprzez kalmodulinę (CaM) stymuluje syntazę tlenku azotu (NOS). NOS katalizuje przemianę argininy w cytrulinę, która syntetyzowana jest w stosunku stechiometrycznym do NO. Reakcja ta wymaga obecności NADPH jako kofaktora. W komórce docelowej NO aktywuje rozpuszczalną formę cyklazy guanylowej (sGC), co prowadzi do podniesienia poziomu 3',5'-cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP). cGMP jest rozkładany przez fosfodiesterazę (PDE).

terneuronów NO moduluje i synchronizuje neuronalną aktywność w poszczególnych częściach płatu. U owadów, miejscem syntezy NO są również neurony sensoryczne rozmieszczone na czułkach. W nerwie czułkowym u szara-

ńczy nie wykryto obecności NOS (MÜLLER i BICKER 1994), podczas gdy u muszki owocowej, obecność NOS obserwowano w niektórych komórkach chemosensorycznych (MÜLLER i BUCHNER 1993). U pszczoły (MÜLLER i HILDENBRANDT 1995) i u ćmy *Manduca sexta* (STENGL i ZINTL 1996) NOS obecna jest w komórkach chemosensorycznych, a dodatkowo u *M. sexta* również w komórkach towarzyszących nie będących komórkami nerwowymi. U *M. sexta*, stymulacja feromonem płciowym czułków samców podnosi istotnie liczbę komórek wykazujących obecność produktu reakcji histochemicznej NADPH-diaforaza (NADPH-d) umożliwiającej uwidocznienie aktywności enzymów związanych z syntezą tlenku azotu (STENGL i ZINTL 1996). Jednakże wzrost aktywności NADPHd w czułkach u *M. sexta* po stymulacji feromonem nie jest hamowany przez blokery NOS, dlatego też przypuszcza się, że wzrost liczby komórek NADPHd – pozytywnych spowodowany jest aktywnością innego enzymu (enzymów) niż NOS. Podobnie jest w nabłonku węchowym u dorosłych gryzoni, u których aktywność NADPHd wywoływana jest przez inne enzymy utleniające niż NOS (KISHIMOTO i współaut. 1993).

W układzie węchowym NO stymuluje także, poprzez aktywację GC, syntezę cGMP, który u bezkręgowców, podobnie jak u kręgowców, aktywuje kinazy białkowe, wpływa na aktywność fosfodiesteraz, a przez to pośrednio również na poziom cAMP (3',5'-cykliczny adenozymonofosforan). NO oddziałuje też na kanały jonowe zależne od cyklicznych nukleotydów. W płatach czułkowych u pszczoły miodnej, cGMP może współdziałać z cAMP aktywując kinazę białkową zależną od cAMP (HILDENBRANDT i współaut. 1994).

TLENEK AZOTU W PROCESIE UCZENIA SIĘ I POWSTAWANIA PAMIĘCI

NO bierze również udział w procesach uczenia się i pamięci. U gryzoni NO pełni ważną funkcję w plastyczności synaptycznej (termin wprowadzony przez J. Konorskiego; zjawisko polegające na trwałych strukturalnych modyfikacjach połączeń komórek nerwowych, zachodzących w wyniku działania określonych bodźców). Jest on zaangażowany w proces długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (ang. long-term potentiation, LTP) (SCHUMAN i MADISON 1994), które może być zahamowane poprzez zablokowanie NOS.

Wśród owadów, pszczoła miodna jest dogodnym modelem eksperymentalnym do wyjaśnienia mechanizmu towarzyszącego procesowi nabywania pamięci. Największa aktywność NOS występuje w tej części neuropilu, która związana jest z przesyłaniem bodźców węchowych. Ponadto, owad ten może być trenowany bodźcami zapachowymi w ściśle określonych przedziałach czasowych. W zależności od liczby powtórzeń bodźca, trenowanie odruchu apetytywnego u pszczoły prowadzi do powstania różnych rodzajów pamięci. U pszczoły

miodnej, farmakologiczne zablokowanie syntazy tlenu azotu w płatach czułkowych zaburza formowanie pamięci długotrwałej, powstającej w wyniku wielokrotnej stymulacji owada bodźcem zapachowym, nie ma natomiast wpływu na formowanie pamięci krótkotrwałej, powstającej po jednokrotnej stymulacji bodźcem (MÜLLER 1996). U ssaków NO po-

średniczy w tworzeniu pamięci „węchowej” poprzez ułatwianie uwolnienia neurotransmitera w opuszkach węchowych. Doświadczenia prowadzone na owcach wykazały, że NO bierze udział w selektywnym rozpoznawaniu matki przez młode jagnię (KENDRICK i współaut. 1997).

TLENEK AZOTU W UKŁADZIE WZROKOWYM

Tlenek azotu może również pełnić rolę przekaźnika zwrotnego u układzie wzrokowym u owadów. U szarańczy taka droga sygnalizacji zwrotnej istnieje pomiędzy komórkami fotoreceptorowymi a interneuronami płytki lamina – komórkami monopolarnymi, które dla fotoreceptorów są elementami postsynaptycznymi. W płycie lamina około 40% interneuronów wykazuje aktywność enzymatyczną charakterystyczną dla syntazy tlenu azotu, dlatego są one prawdopodobnym źródłem NO w płycie lamina (BICKER i SCHMACHTENBERG 1997). Podwyższenie poziomu NO w płacie wzrokowym u szarańczy, powoduje wzrost akumulacji cGMP w komórkach fotoreceptorowych. Podawanie związków takich jak nitroprusydek sodu, które podnoszą poziom NO/cGMP w płacie wzrokowym, powoduje wzrost amplitudy elektroretinogramu (ERG). Natomiast eksperymentalne obniżenie poziomu NO przez związek o nazwie ETU (2-ethyl-2-thiopseudourea) powoduje obniżenie odpowiedzi na bodźce świetlne (SCHMACHTENBERG i BICKER 1999). Zarówno cytochemiczne, jak i elektrofizjologiczne dane są zgodne z tym, że syntetyzowany w komórkach monopolarnych NO oddziałuje na fotoreceptory jako przekaźnik zwrotny. Takie zwrotne przesyłanie sygnałów może być wykorzystywane w adaptacji komórek monopolarnych do ciemności. Obniżenie poziomu natężenia światła docierającego przez fotoreceptory do interneuronów płytki lamina u szarańczy wywołuje depolaryzację błony komórek monopolarnych (LAUGHLIN 1994, JUUSOLA i

współaut. 1996) i prowadzi do uwolnienia NO, który działa jak przekaźnik zwrotny. Uwolniony NO może aktywować w komórkach fotoreceptorowych cyklazę guanylanową i poprzez syntezę cGMP prowadzić do wzrostu wrażliwości siatkówki na światło. Wzrost wrażliwości siatkówki podczas adaptacji do ciemności obserwowany jest poprzez wzrost amplitudy ERG (SCHMACHTENBERG i BICKER 1999).

W siatkówce u ssaków szczególnie wysoka immunoreaktywność do syntazy tlenu azotu występuje w komórkach amakryalnych (rodzaj komórek nerwowych występujących pomiędzy warstwą spłotową zewnętrzną a wewnętrzną siatkówki kręgowców. Komórki amakryalne wysyłają swoje wypustki do warstwy spłotowej wewnętrznej, tworząc synapsy z neuronami dwubiegunowymi i neuronami wzrokowo-zwojowymi) (SANDELL 1985, YAMAMOTO i współaut. 1993), w niektórych komórkach glejowych i dwubiegunowych (KURENNY i współaut. 1994). Podawanie donora tlenu azotu, np. nitroprusydku sodu (NaNP), zwiększa poziom cGMP w komórkach dwubiegunowych w siatkówce (KOISTINAHO i współaut. 1993), a także moduluje kanały jonowe w komórkach pręcikowych i zwojowych w siatkówce (KURENNY i współaut. 1994). NO i cGMP zaangażowane są w procesie przesyłania informacji świetlnych w układzie wzrokowym ssaków; przykładem może być wspomniana już możliwość modulacji kanałów jonowych w komórkach siatkówki, czy też zmiana dróg pobudzenia pręcikowego i czopkowego w czasie adaptacji świetlnej.

TLENEK AZOTU W PROCESIE ROZWOJU UKŁADU NERWOWEGO

Dynamiczna regulacja NOS podczas rozwoju układu nerwowego wskazuje, że tlenek azotu bierze również udział w procesach rozwojowych układu nerwowego zarówno u kręgow-

ców, jak i u bezkręgowców. NO zaangażowany jest w procesie zmniejszania liczby synaps pomiędzy neuronami drogi nerwowej siatkówki-błaszka czworacza w rozwijającym się

układzie wzrokowym u ptaków (WU i współaut. 1994), w powstawanie drogi ciała kolankowate-siatkówka u ssaków, gdzie kontroluje prawidłową segregację komórek zwojowych siatkówki (CRAMER i współaut. 1996), oraz w zależne od aktywności hamowanie synaptyczne w rozwijających się połączeniach nerwowo-mięśniowych u *Xenopus laevis* (WANG i współaut. 1995).

W rozwoju embrionalnym u świerszcza, synaptogeneza skorelowana jest z okresem, w którym komórki nerwowe różnych typów odpowiadają na NO produkcją cGMP (TRUMAN i współaut. 1996). Niektóre z tych komórek to motoneurony, których stożki wzrostu wykazują immunoreaktywność do cGMP i stają się szczególnie wrażliwe na NO po osiągnięciu przez stożek miejsca docelowego, ale przed wytworzeniem wypustek dochodzących do tego miejsca. Ponadto, wiele neuronów sensorycznych i interneuronów staje się szczególnie wrażliwych na NO z chwilą, gdy wzrost aksonalny ustaje, a zaczyna się synaptogeneza i dojrzewanie neuronów, np. rozwijające się fotoreceptory oka złożonego u szarańczy (TRUMAN i współaut. 1996). Zablockowanie NOS w czasie, kiedy rozwijające się komórki są wrażliwe na tlenek azotu powoduje zaburzenie powstawania właściwych połączeń nerwowych w płacie wzrokowym u *D. melanogaster* (GIBBS i TRUMAN 1998). U muszki owocowej NO stabilizuje wzrost komórek fotoreceptorowych i umożliwia tworzenie połączeń synaptycznych

z właściwymi komórkami docelowymi w płycie lamina i medulla (warstwy neuropilu wzrokowego). Zablockowanie NOS w trakcie okresu krytycznego tego procesu (u *D. melanogaster* jest to okres około 40 godzin na początku trzeciego stadium larwalnego), kiedy neurony wrażliwe są na NO, powoduje nadmierny wzrost komórek fotoreceptorowych i wrastanie ich w płytkę medulla i mózg (GIBBS i TRUMAN 1998). Tlenek azotu bierze również udział w utrzymywaniu równowagi pomiędzy procesami podziałów komórkowych a procesami ich różnicowania się w dyskach imaginalnych (skupienia komórek o cechach embrionalnych, z których rozwijają się określone narządy owada dorosłego) u muszki owocowej, w których stwierdzono wysoką ekspresję NOS w trakcie ich intensywnego rozwoju. Zablockowanie NOS w rozwijających się dyskach powoduje przerost struktur ciała, natomiast wzmocniona poprzez manipulacje genetyczne ekspresja NOS, wywołuje efekt przeciwny (KUZIN i współaut. 1996).

Do tej pory większość badań fizjologicznych nad rolą tlenu azotu prowadzona była na ssakach, dlatego też badania na bezkręgowcach dostarczają interesującego uzupełnienia naszej wiedzy, a niejednokrotnie również jej potwierdzenia. Układ nerwowy wielu przedstawicieli bezkręgowców jest dobrze poznany i opisany, a jego prosta budowa pozwala na dokładną analizę funkcji poszczególnych neuronów budujących ten układ.

THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF INSECTS

S u m m a r y

In nerve cells, the permeating short-lived signalling molecule of nitric oxide (NO) is generated by Ca^{2+} -calmodulin-stimulated NO synthase (NOS). Nitric oxide activates soluble guanylate cyclase (sGC) in target cells, leading to the formation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP). Biochemical studies have shown the presence of Ca^{2+} -calmodulin-regulated NO-cGMP signalling mechanism in the nervous system

of insects. Molecular characterization of a *Drosophila* NOS gene has shown its 43% identity with the mammalian neuronal gene of NOS. This paper provides a short review of the cellular organization of nitric oxide signalling in the insect nervous system as well as information on its function in processing of olfactory information, memory formation, and the visual system, as well as in neuronal development.

LITERATURA

- BICKER G., SCHMACHTENBERG O., 1997. *Cytochemical evidence for nitric oxide/cyclic GMP signal transmission in the visual system of the locust*. *Europ. J. Neurosci.* 9, 189-193.
- BREER H., SHEPHERD G. M., 1993. *Implications of the NO/cGMP system for olfaction*. *Trends Neurosci.* 16, 5-9.
- CRAMER K. S., ANGELUCCI A., HAHM J. O., BOGDANOV M. B., SUR M., 1996. *A role for nitric oxide in the development of the ferret retinogeniculate projection*. *J. Neurosci.* 16, 7995-8004.
- GIBBS S. M., TRUMAN J. W., 1998. *Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of Drosophila*. *Neuron* 20, 83-93.

- HILDENRANDT H., MÜLLER U., MENZEL R., 1994. *Chemosensory stimulation and nitric oxide enhances PKA activity in the antennal lobe of the honey bee*. [W:] *Proceedings of the 22nd Göttingen Neurobiology Conference 1994*. ELSNER N., BREER H. (red.). Thieme Verlag, Stuttgart, 653.
- JUUSOLA M., FRENCH A. S., UUSITALO R. O., WECKSTRÖM M., 1996. *Information processing by graded-potential transmission through tonically active synapses*. Trends Neurosci. 19, 292–297.
- KENDRICK K. M., GUEVARA-GUZMAN R., ZORILLA J., HINTON M. R., BROAD K. D., MIMMACK M., OHKURA S., 1997. *Formation of olfactory memories mediated by nitric oxide*. Nature 388, 670–674.
- KISHIMOTO J., KEVERNE E. B., HARDWICK J., EMSON P. C., 1993. *Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: a histochemical, immunological and in situ hybridization study*. Eur. J. Neurosci. 5, 1684–1694.
- KOISTINAHO J., SWANSON R. A., DE VENTE J., SAGAR S. M., 1993. *NADPH diaphorase (nitric oxide synthase)-reactive amacrine cells of rabbit retina: putative target cells and stimulation by light*. Neuroscience 57, 587–597.
- KURENNY D. E., MOROZ L. L., TURNER R. W., SHARKEY K. A., BARNES S., 1994. *Modulation of ion channels in rod photoreceptors by nitric oxide*. Neuron 13, 315–324.
- KUZIN B., ROBERTS I., PEUNOVA N., ENIKOLOPOV G., 1996. *Nitric oxide regulates cell proliferation during Drosophila development*. Cell 87, 639–649.
- LAUGHLIN S. B., 1994. *Matching coding, circuits, cells and molecules to signals: general principles of retinal design in the fly's eye*. Prog. Retinal Eye Res. 13, 165–196.
- MÜLLER U., 1996. *Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, Apis mellifera*. Neuron 16, 541–549.
- MÜLLER U., BUCHNER E., 1993. *Histochemical localization of NADPH-diaphorase in adult Drosophila brain: is nitric oxide a neuronal messenger also in insects?* Naturwissenschaften 80, 524–526.
- MÜLLER U., BICKER G., 1994. *Calcium activated release of nitric oxide and cellular distribution of nitric oxide synthesizing neurons in the nervous system of the locust*. J. Neurosci. 14, 7521–7528.
- MÜLLER U., HILDENRANDT H., 1995. *The nitric oxide/cGMP system in the antennal lobe of Apis mellifera is implicated in integrative processing of chemosensory stimuli*. Europ. J. Neurosci. 7, 2240–2248.
- REGULSKI M., TULLY T., 1995. *Molecular and biochemical characterization of dNOS: a Drosophila Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9072–9076.
- SANDELL J. H., 1985. *NADPH diaphorase cells in the mammalian inner retina*. J. Comp. Neurol. 238, 466–472.
- SCHMACHTENBERG O., BICKER G., 1999. *Nitric oxide and cyclic GMP modulate photoreceptor cell responses in the visual system of the locust*. J. Exp. Biol. 202, 13–20.
- SCHUMAN E. M., MADISON D. V., 1994. *Locally distributed synaptic potentiation in the hippocampus*. Science 263, 532–536.
- STENGL M., ZINTL R., 1996. *NADPH diaphorase activity in the antennae of the hawkmoth Manduca sexta*. J. Exp. Biol. 199, 1063–1072.
- TRUMAN J. W., DE VENTE J., BALL E. E., 1996. *Nitric oxide-sensitive guanylate cyclase activity is associated with the maturational phase of neuronal development in insects*. Development 122, 3949–3958.
- WANG T., XIE Z., LU B., 1995. *Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses*. Nature 374, 262–266.
- WU H. H., WILLIAMS C. V., MCLOON S. C., 1994. *Involvement of nitric oxide in the elimination of a transient retinotectal projection in development*. Science 265, 1593–1596.
- YAMAMOTO R., BREDT D. S., SNYDER S. H., STONE R. A., 1993. *The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia*. Neuroscience 54, 189–200.