

## Teil I

### **3 Stickstoffmonoxid in einem mechanosensorischen System von *Locusta migratoria*: (A) Die räumliche Verteilung der NO-Synthase und Konsequenzen für die Wirkung von NO (B) NO als Modulator der Antworteigenschaften eines windsensitiven Interneurons**

#### **3.1 Einleitung**

Im Jahre 1987 zeigten fast gleichzeitig zwei Arbeitsgruppen, die eine um Ignarro, die andere um Moncada, dass es sich bei einer gefäßerweiternden Substanz, deren Struktur lange Zeit unbekannt war, eine Substanz, die deshalb schlicht EDRF (Endothelium-derived relaxing factor) genannt wurde, eigentlich um ein Gas, nämlich um Stickstoffmonoxid (NO) handelte (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). Sehr schnell avancierte Stickstoffmonoxid zu einem wissenschaftlichen Schwerpunktthema, und heute ist bekannt, dass NO ein wichtiges Signalmolekül vieler, sehr verschiedener physiologischer Prozesse ist; es ist ein Botenstoff bei neuronaler Informationsübertragung und der Blutgefäßregulation, ist beteiligt an der Immunantwort sowie der Pathogenese verschiedener Krankheiten[d1] (Baraño et al., 2001; Boehning und Snyder, 2003). NO war der erste einer völlig neuen Klasse neuronaler Transmitter – sehr kleiner, hoch diffusibler Moleküle – deren Eigenschaften vielen klassischen Konzepten synaptischer Übertragung widersprachen.

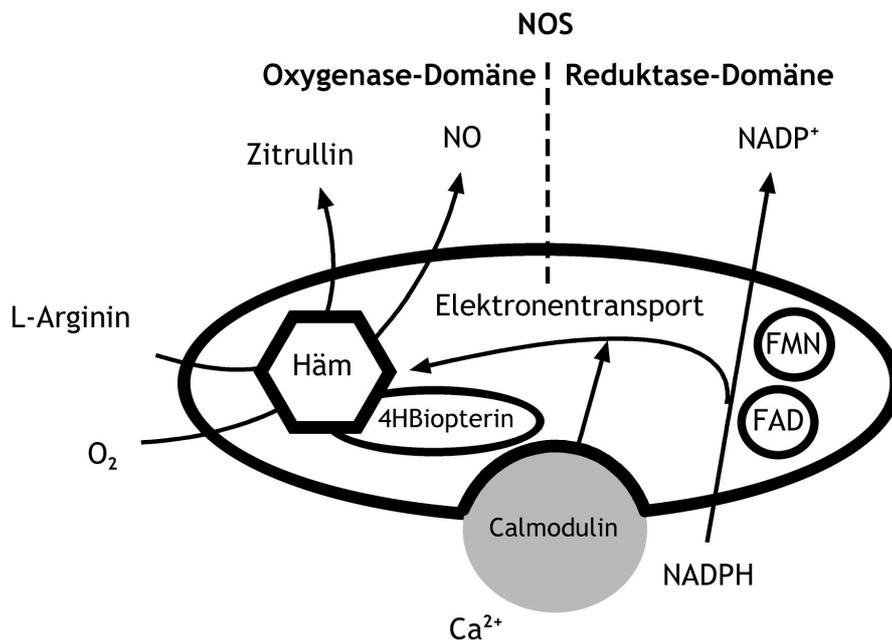
Zwei Merkmale sind es, die NO als Botenstoff einzigartig machen. Einerseits geht es anders als andere Botenstoffe nicht die übliche nichtkovalente Ligand-Rezeptor-Interaktion ein. Andererseits bewirken Unpolarität, geringe Größe und eine äußerst hohe Diffusionskonstante (Malinski et al., 1993), dass NO über weite Strecken diffundieren und sogar die hydrophoben Zellmembranen passieren kann (Lancaster, 1997). Eingeschränkt wird diese, für ein Transmittermolekül außerordentliche Weitreichigkeit lediglich dadurch, dass NO als instabiles, freies Radikal hoch reaktiv ist.

**Die Sender des NO-Signals:** NO-Synthasen (NOS), die Sender des NO-Signals, liegen in verschiedenen Isoformen vor. Benannt wurden sie anfänglich nach dem Gewebe, in dem sie vorkommen: eNOS (endotheliale NOS), nNOS (neuronale NOS) und iNOS (induzierbare,

makrophage NOS). Dem entsprechen die Genklassen von Vertebraten: NOS1: nNOS, NOS2: iNOS und NOS3: eNOS. Andere Klassifikationen unterscheiden anhand des Expressionstyps zwischen konstitutiv vs. induzierbar oder kalziumabhängig vs. kalziumunabhängig. Neuere Untersuchungen deuten hingegen einen komplexeren Charakter an, als es diese Benennungen erscheinen lassen. So können verschiedene NOS-Isoformen, induzierbar oder konstitutiv nebeneinander im selben Gewebe vorkommen (Forstermann et al., 1998).

Die DNA-Sequenz der NO-Synthasen in Insekten zeigt die beste Übereinstimmung mit der Sequenz von NOS1 (nNOS) der Vertebraten. Diese Ähnlichkeit zwischen Insekten-NOS und neuronaler NOS, sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene, legte nahe, dass NOS1, und nicht NOS2 oder -3, das ursprüngliche, also das Stamm-Gen der NOS-Genfamilie ist (Luckhart & Rosenberg, 1999).

NO-Synthese: In einem  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Prozess (Bredt & Snyder, 1990) katalysiert NOS die Synthese von NO und L-Citrullin aus L-Arginin, und  $\text{O}_2$  unter der reduzierenden Wirkung von NADPH (vgl. Schema 1; Bredt & Snyder 1989; Bredt & Snyder 1992).[d2]



Schema 1: Bildung von NO durch den NOS-Enzymkomplex.  $\text{Ca}^{2+}$  bindet an Calmodulin und aktiviert die NO-Synthase (NOS). Die substratbindende Oxygenase-Domäne der NOS katalysiert die Reaktion von L-Arginin und Sauerstoff zu Zitruillin und NO. Sie ist als Dimer aktiv, enthält eine Häm-Gruppe und Tetrahydrobiopterin. Flavin-Mono-Nukleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) sind Kofaktoren der Reduktase-Domäne. an die NADPH bindet.

---

**Die Empfänger des NO-Signals:** Neuronale Erregung führt via NO-Synthese in vielen Teilen zentraler Nervensysteme zur Erhöhung intrazellulärer cGMP Konzentration. Deshalb erschien es wahrscheinlich, dass der hauptsächliche intrazelluläre „Rezeptor“ eine Guanylatzyklase ist. Zwar konnten Schulz et al. (1989) schon früh bestätigen, dass NO tatsächlich an die Hämgruppe der löslichen oder NO-abhängigen Guanylatzyklase (sGC) bindet, dennoch war die Art der Aktivierung der sGC lange Zeit umstritten. Untersuchungen der letzten Jahre favorisieren eine zweistufige Aktivierung durch NO. Dabei bindet NO initial an die Häm-Gruppe der sGC, der zweite Teilprozess aber benötigt weiteres NO als Katalysator der Reaktion (Ballou et al., 2002). Der zweistufige Prozess ist wahrscheinlich auch verantwortlich dafür, dass NO zwei verschiedene Wirkungsmodi entfaltet: einen tonischen mit geringer c-GMP-Synthese und einen akuten mit deutlich gesteigerter Synthese. Im tonischen Modus, bei physiologisch normalen ATP- und GTP-Konzentrationen, ist NO an die Hämgruppe stabil gebunden. Liegt in der Zelle jedoch nur wenig ATP vor, so wird bei Anwesenheit hoher NO-Konzentrationen die Umsatzrate des Enzyms um ein Vielfaches gesteigert (Cary et al., 2005). Die mehr als 100-fache Erhöhung der cGMP-Synthese kann konzentrationsabhängig sehr schnell, das heißt innerhalb von wenigen Millisekunden, erfolgen (Ballou et al., 2002; Bellamy und Garthwaite, 2001).

Das von der sGC gebildete 3',5' – zyklische GMP (cGMP) aktiviert oder inhibiert verschiedene Ziele, darunter cGMP-abhängige Phosphodiesterasen, Ionenkanäle und cGMP-abhängige Proteinkinasen (Vaandrager & de Jonge, 1996). Des Weiteren ist auch eine Kreuzaktivierung (cross-activation) mit cAMP-abhängigen Phosphodiesterasen gezeigt worden (Pfeifer et al. 1999).

In den letzten Jahren konnten verschiedene Studien die Existenz eines zweiten Signalwegs nachweisen, der cGMP-unabhängig ebenfalls die elektrische Aktivität einer Zelle modulieren kann. Diese direkte Wirkung von NO auf Kanalproteine (S-Nitrosylation) erfordert allerdings höhere NO-Konzentrationen und die Aktivierung verläuft hier deutlich langsamer – auf einer Zeitskala im Minutenbereich (Ahern et al., 2002).

**NO in Invertebraten:** Vergleichende physiologische als auch molekularbiologische Untersuchungen legen nahe, dass der Informationstransfer mittels NO-Signalketten ein in der Evolution hoch konservierter Signalweg ist. Folgerichtig fanden sich für alle daraufhin untersuchten Invertebraten vielfältige Belege für eine Funktion von NO als Botenstoff (Colasanti & Venturini, 1998). In *Hydra vulgaris* beispielsweise ist NO an einem geruchsähnlichen Verhalten beteiligt - Süßwasserpolyphen produzieren NO als Reaktion auf

reduziertes Glutathion, dem Auslöser der Futterantwort (feeding response. Colosanti et al., 1997). Bei ebenfalls für das Fressverhalten entscheidenden Neuronen von *Pleurobranchia californica* verstärkt NO einen cAMP abhängigen Kationenstrom, jedoch ohne Beteiligung einer cGMP-Signalkette (Hatcher et al., 2006). In *Hydra vulgaris* beispielsweise ist NO an einem geruchsähnlichen Verhalten beteiligt - Süßwasserpolyphen produzieren NO als Reaktion auf reduziertes Glutathion, dem Aktivator des Fressverhaltens (*feeding response*; Colosanti et al., 1997). In *Sepia officinalis* ist NO beteiligt an der Aktivitätsregulierung der Zellen der Tintendrüse, somit also am Abwehrverhalten des Tieres (Palumbo et al., 1997; Palumbo, 2005). Während der Metamorphose werden im stomatogastrischen System des Hummers (*Homerus americanus*) verschiedene Neurone NO sensitiv. Das und die hohe Dichte von NO-Signalmolekülen deuten auf eine Beteiligung an der Steuerung postembryonaler Wachstumsvorgänge hin (Scholz et al. 1998). Im stomatogastrischen System von *Cancer pagurus* moduliert NO die Netzwerkaktivität, indem es wichtige Rückkopplungsmechanismen beeinflusst (Stein et al., 2005). In *Lymnia stagnalis* ist NO ein notwendiger Kofaktor der Gedächtnisbildung. Die Aktivierung des betreffenden NOS - Gens unterliegt dabei einer präzisen zeitlichen Kontrolle. So wird zu einem genau festgelegten kritischen Zeitpunkt nach der Konditionierung die NOS-Genexpression in einem solchen modulatorischen Neuron hoch reguliert (Korneev et al., 2005), das für die konditionierte *feeding response* wesentlich ist. Auch bei *Aplysia*, einem klassischen Modellorganismus für Lernen und Gedächtnis konnte gezeigt werden, dass NO in einer kritischen Zeitspanne an der Ausbildung dreier verschiedener Formen von Gedächtnis (short term-, intermediate-, long term memory) beteiligt ist. An der Konsolidierung des Gedächtnisses scheint NO dagegen nicht beteiligt (Katzoff et al., 2002).

**NO in Insekten:** Die Existenz eines NO-Signalweg wurde unter allen Invertebraten zuerst für *Schistocerca gregaria* nachgewiesen: Im Gehirn der Wanderheuschrecke, so zeigten Elphick et al. (1993), wird die Aktivität der Guanylatzyklase durch NO reguliert. Das relativ simple Nervensystem von Insekten machte es in der Folge möglich, vielfältige Funktionen von NO nachzuweisen (Bicker, 2001; Davies, 2000), so beispielsweise beim Lernen, bei der Wachstumsregulation, beim Riechen etc. Einige bedeutsame Beispiele sollen hier angeführt werden.

*Entwicklung:* In zwei wesentlichen Zusammenhängen ist die Bedeutung von NO für Entwicklungsvorgänge gezeigt worden. Das sind Zielfindung migrierender Zellen und Synaptogenese.

*Zielfindung:* Die Bedeutung des NO/cGMP-Signalwegs für die Migration postmitotischer Zellen im Heuschreckenembryo zeigen Haase und Bicker (2003). Hier wird die Wanderung von Neuronen des Mitteldarms gehemmt durch das Blockieren einzelner Elemente der NO-Kaskade (NOS, sGC und Proteinkinase G - PKG). NO und cGMP sind also essentiell für die Zellwanderung. Als eine Art Stop-Signal wirkt dagegen eine ebenfalls nachgewiesene cAMP/PKA-Kaskade. Die Autoren geben damit ein Beispiel, wie durch Feinabstimmung positiver und negativer Regulatoren, nämlich NO/cGMP und cAMP, Entwicklungsvorgänge reguliert werden können. Dem ähneln Befunde im Antennallobus von *Manduca sexta*, wo das Ausschalten der NOS zu anomaler Neuropilstruktur führt, weil in Abwesenheit von NO keine Gliawanderung stattfinden kann (Gibson et al.; 2001). Interessant ist, dass zugleich ein verstärktes Dendritenwachstum bei einem bestimmten Neuronentyp zu beobachten war. Dieser Effekt ist zwar wiederum NO-abhängig, scheint jedoch nicht durch cGMP vermittelt, sondern erfolgt über einen alternativen, durch die Ribosylierung von AMP gebahnten NO-Signalweg.

*Synaptogenese:* Im optischen Lobus von *Drosophila* unterliegen synaptische Verschaltung und Neuritenwachstum der Kontrolle durch NO-Signale, basierend darauf, dass Photorezeptorzellen während der ersten Hälfte der Metamorphose NO sensitive sGC exprimieren (Gibbs & Truman, 1998). Auch Motoneurone von Heuschrecken sind nur in einem bestimmten Zeitfenster NO-sensitiv. Dessen Beginn liegt ungefähr um jenen Zeitpunkt herum, wenn die Wachstumskegel ihren Zielort erreichen, jedoch noch bevor die ersten Neuriten erscheinen. Die Empfindlichkeit gegenüber NO endet, wenn die Synaptogenese nahezu abgeschlossen ist. Die Koinzidenz von Synaptogenese und NO-Sensitivität legt eine Beteiligung von NO an Formen synaptischer Plastizität während der Embryonalentwicklung nahe. Dass aber NO ein generelles Schlüsselmolekül für neuronale Plastizität ist, sowohl embryonal, larval, als auch postlarval, deuten Befunde an adulten Tieren an. Einerseits vermittelt NO retrograde synaptische Übertragung (s.u.), andererseits erhöhen sich die Konzentrationen von sGC während Phasen synaptischer Reorganisation, weshalb Truman et al. (1996) formulierten: „die Beziehung von sGC und Synaptogenese ist eine sehr ursprüngliche.“

---

NO in sensorischen Schaltkreisen: Viele Hypothesen zu einer möglichen Funktion von NO in sensorischen Systemen gründen sich auf anatomische Untersuchungen, d.h. auf Nachweisen von NOS in den entsprechenden Gehirn- oder Gangliengebieten. In Insekten nutzte man dafür anfänglich die oxidierende Wirkung von NOS durch Nachweis der NADPH-diaphorase-Aktivität: die bei der Oxidation von NADPH zu NADP frei werdenden Elektronen reduzieren das farblose lösliche Tetrazoliumsalz (NBT) zum unlöslichen blauen NBT-Formazan. Dieser Niederschlag ist lichtmikroskopisch nachzuweisen (bei Vertebraten: Dawson et al., 1991; bei Insekten: Müller & Bicker, 1994; Elphick, 1997; Ott & Elphick, 2003). Die Entwicklung von Antisera gegen NOS-Epitope ermöglichte in jüngerer Zeit auch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (Gibbs & Truman, 1998; Ott & Elphick, 2002; Bullerjahn und Pflüger, 2003). Hierfür steht der polyklonale universal NOS (uNOS) - Antikörper zur Verfügung. Dieser ist gegen die hoch konservierte NOS-Aminosäuresequenz QKRYHEDIFG gerichtet, und - bei Verwendung konfokaler Laserscanningverfahren - ist es nun möglich, sogar Lagebeziehungen von NO-Quelle und Ziel im dreidimensionalen Raum zu studieren.

*Chemosensorische Systeme:* Im Antennallobus der Wanderheuschrecke, dem ersten olfaktorischen Neuropil von Insekten, existiert eine Gruppe von 45-50 Interneuronen, welche NADPHd-, also NOS-Aktivität zeigen (Müller & Bicker 1994). Die Mehrzahl dieser NADPHd positiven lokalen Interneurone zeigt aber ebenfalls eine durch NO induzierte cGMP-Immunoreaktivität. Diese Zellen sind dadurch möglicherweise empfindlich für das von ihnen selbst produzierte NO-Signal. Stickstoffmonoxid könnte deshalb neben der Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen auch innerhalb einer Zelle, also zwischen Zellkompartimenten einen Informationstransfer vermitteln (Bicker et al. 1996). Der Pilzkörper als zweite olfaktorische Verarbeitungsebene ist ein wesentlicher Ort des assoziativen Lernens (*Apis mellifera*: Hammer & Menzel, 1995, Menzel & Müller, 1996) und besitzt eine bemerkenswerte Struktur. Bündel von Kenyonzellen, die selber keine NOS besitzen (Müller & Bicker, 1994) verlaufen in jeweils sechs röhrenförmigen Strängen, in deren zylindrischen Wänden NO produzierende Fasern verzweigen (O'Shea et al. 1998). Diese spezielle räumliche Struktur führt dazu, dass der Zylinderkern, der gar keine NOS enthält, bei Aktivierung der Wandzellen schließlich eine höhere Konzentration von NO aufweist, als die NOS positiven Wände selbst. Eine solche, über die Zeit summierende „Gas-Pipeline“ stellt gewissermaßen eine Zeitspur über die vergangene Aktivität der Wandzellen dar. Besonders im Falle assoziativen Lernens, für das die zeitliche Ordnung von Aktivität

---

entscheidend ist, könnte ein solches integrierendes NO-Volumensignal von entscheidender Bedeutung[d3] sein.

Die Beteiligung von NO an einer Form nichtassoziativen Lernens - der Habituation - zeigen Müller und Hildebrandt (2002). Auf chemosensorische Stimulation der Antennen mit Zuckerwasser antworten Bienen (*Apis mellifera*) indem sie den Proboscis ausstrecken (proboscis extension reflex = PER). Wiederholtes Reizen führt zu einer Antwortverringering, die durch einen dishabituierenden Stimulus wieder aufgehoben werden kann. Interessant ist, dass nur an einem der beiden Prozesse NO beteiligt ist, nämlich an der Verringerung der Antwortwahrscheinlichkeit während der Habituation, einem Prozess der mit einem lang andauernden graduellen Anstieg der Protein-Kinase A einhergeht. An der wesentlich schnelleren Dishabituation hat die NO/cGMP-Kaskade dagegen keinen Anteil.

*Visuelles System:* Für visuelle Schaltkreise wurde nachgewiesen, dass NO eine retrograde Informationsübertragung vermittelt. Das heißt, dass der postsynaptische Kalziumstrom während synaptischer Übertragung durch klassische Transmitter zur NO-Synthese in der postsynaptischen Zelle führt, und dieses NO-Signal dann auf die präsynaptische Zelle zurückwirkt. Die präsynaptische Zelle würde solcherart über die Aktivität der ihr nachgeschalteten Zelle informiert, der Informationsfluss ist hier also bidirektional (Rückkopplung oder *feedback circuit*). Durch immunohistochemische Untersuchungen im optischen Lobus der Wanderheuschrecke fanden sich erste Anzeichen für einen solchen Mechanismus. Während visuelle Rezeptorzellen keine NOS exprimieren, sind 40% der nachgeschalteten monopolaren Zellen NADPHd positiv, synthetisieren also NO (Elphick et al., 1996). Dagegen produzieren Photorezeptorzellen als Antwort auf NO cGMP (Bicker & Schmachtenberg, 1997). Schließlich zeigten auch funktionelle, elektrophysiologische Untersuchungen, dass NO tatsächlich die Empfindlichkeit von Photorezeptorzellen erhöhte, und dass Pharmaka, welche die NO-Konzentration absenken, die Lichtantwort verringerten (Schmachtenberg & Bicker, 1999). Solch ein retrograder Informationstransfer könnte an der Hell-Dunkel-Adaptation beteiligt sein, und tatsächlich stimuliert NO nur im dunkel-, nicht aber im hell - adaptierten Heuschreckenaugen die cGMP Produktion (Jones & Elphick, 1999).

*Sensomotorik:* Auch in mechanosensorischen Schaltkreisen ist die Anpassung der Empfindlichkeit mittels Adaptation und Habituation von großer Bedeutung, weil beispielsweise unter stark wandelbaren Umweltbedingungen auch kleinste Veränderungen registriert werden müssen. Die Beteiligung von NO an solchen Prozessen

---

mechanosensorischer Informationsverarbeitung wurde schon früher vermutet, aufgrund der Gegenwart von NADPHd-IR in mechanosensorischen Projektionsgebieten thorakaler und abdominaler Ganglien von Wanderheuschrecken (Ott & Burrows, 1999; Bullerjahn und Pflüger, 2003). Besonders exterozeptive, taktile Afferenzen liegen in einem dichten Netzwerk NADPHd-positiver Fasern von intersegmentalen Interneuronen (Ott & Burrows, 1998). Als mögliche neuronale Ziele von NO wurden sowohl Motoneurone als auch thorakale Extero- und Propriozeptoren, auditorische und chemosensorische Rezeptorzellen identifiziert, da diese durch Backfill-Färbungen zu identifizierende Zellen immunoreaktiv für die  $\alpha$ -Untereinheit der NO-sensitiven sGC waren. Die Beteiligung von NO an wechselseitigen Adaptationsprozessen (cross adaptation) zwischen benachbarten sensorischen Kanälen wurde deshalb vermutet (Ott et al., 2000).

Die Verknüpfung von NO-Signalketten mit sensomotorischen Schaltkreisen - Rezeptorzellen, Interneurone, Motoneurone – scheint nicht auf Wanderheuschrecken beschränkt, sondern stellt eine prinzipielle Eigenschaft vieler Insektenspezies dar, so von Heuschrecken, Grillen und Schaben (Ott & Burrows, 1999; Ott & Elphick, 2002). Bemerkenswert ist des Weiteren, dass ein auch für Säugetiere bekannter Koregulationsprozess der sGC sowohl bei *Periplaneta americana* als auch bei *Locusta migratoria* aktiv ist (Ott et al., 2004). YC-1 (3-(5'-Hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl-indazol) führt durch allosterische Aktivierung einer NO-unabhängigen Untereinheit zu einer Sensitivierung der Insekten-sGC, also zu einer vermehrten Produktion von cGMP. Das heißt, in einer evolutionär hoch konservierten Weise regulieren zwei parallele Prozesse, einer NO-abhängig, einer NO-unabhängig, synergistisch die sGC/cGMP-Signalkaskade.

Die Wirkung von NO auf neuromuskuläre Synapsen (*neuromuscular junction*, NMJ) wurde für *Drosophila melanogaster* nachgewiesen. Hier ist ein retrograder Signalweg an der Regulation der präsynaptischen Vesikelfreisetzung beteiligt. Dabei stimuliert das von postsynaptischen Muskelfasern generierte NO eine kalziumunabhängige Vesikelfreisetzung an präsynaptischen Fasern der NMJ (Wildemann & Bicker, 1999).

***NO-Signalübertragung und Geometrie:*** Wie einleitend erwähnt, kann das neutrale Radikal NO relativ ungehindert zwischen Zellen, als auch durch deren Lipidmembranen diffundieren. Aber auch für das potentielle Ziel, die sGC, wurde angenommen, dass sie im Unterschied zu klassischen Synapsenkonzepten, nicht an einen bestimmten Ort der Zellmembran gebunden ist. Diese Eigenschaften führten schon früh mehrfach zu der These, dass NO nicht lokal eng umgrenzt wirkt, sondern ein Volumensignal für größere Zellverbände darstellt. Es könnte

---

damit als ‚master-Signal‘ wirken, eine Art übergeordnetes Signal, das Informationseinheiten zusammen bindet<sup>1</sup>. Trotz dieser scheinbar nahe liegenden und attraktiven These, wird die Frage äußerst kontrovers diskutiert, ob NO nun tatsächlich ein Volumensignal darstellt oder ob es doch eher einer klassischen synaptischen ‚Verdrahtung‘ (*wiring*) vergleichbar wirkt. Die Untersuchung geometrischer Beziehung zwischen NO-Donor und seinem Ziel ist deshalb von immensem Interesse, um so die prinzipielle Natur dieses Signalwegs aufklären zu können.

*Distanz zwischen Sender und Empfänger:* Die effektive Wirkdistanz von NO ist nach Meinung verschiedener Autoren recht hoch und liegt im Bereich von 100 bis mehrere 100  $\mu\text{m}$  (Dawson & Snyder 1994; Lancaster, 1996; Jacoby et al., 2001).

Das von einem Buccal-Motoneuron (in *Lymnea stagnalis*) synthetisierte NO depolarisiert ein ‚Empfänger‘-Motoneuron sogar noch, wenn beide in Zellkultur vereinzelt Motoneurone 50  $\mu\text{m}$  voneinander entfernt sind (Park et al. 1998). Im Cortex von Ratten ist kein Punkt weiter als 25  $\mu\text{m}$  von einer NO synthetisierenden Faser entfernt (Moro et al., 1995). Aufgrund der hohen Dichte von NOS einerseits und der relativ großen Wirkdistanz von NO andererseits würde die Wirkung von NO demnach eher durch die Antwortcharakteristik einer Zielzelle gegenüber NO bestimmt, als durch räumliche Parameter der NO-Verteilung.

Die Wirkdistanz von NO wird aber nicht nur durch dessen schnelle und weit reichende Diffusionsfähigkeit festgelegt. Dieser wirkt nämlich gewissermaßen die hohe Reaktivität des Radikals NO entgegen. Das führt nach Meinung anderer Autoren nun dazu, dass NO sehr schnell mit dem Gewebe reagiert und dieses ‚Abfangen‘ von NO würde die Diffusionsstrecke stark einschränken. Im Hippocampus beispielsweise wirkt das von CA1-Pyramidenzellen freigesetzte NO wahrscheinlich als retrograder Botenstoff, dessen Übertragungsbereich ausschließlich auf einen engen synaptischen Umkreis beschränkt ist. Synaptische Plastizität ist hier nicht, wie für ein frei diffusibles Gas zu vermuten, diffus, sondern quasi homosynaptisch von hoher räumlicher Präzision. So zeigen elektronenmikroskopische Studien, dass NOS-IR innerhalb der postsynaptischen Membran lokalisiert. Der ‚NO-Rezeptor‘ sGC ist dagegen eng mit der Präsynapse assoziiert (Burette et al., 2002). Während auch biochemische Daten belegen, dass NOS1 an das postsynaptische Protein PSD95 bindet (Christopherson et al., 1999, in Ratte), konnte für Insekten eine funktionelle Kopplung von nikotinischer Acetylcholin- und NO-Signalkette nachgewiesen

---

<sup>1</sup> Solche, die Aktivität einer ganzen Neuronenpopulation beeinflussenden Signale bilden einen Kontrast zu Cajals Neuronendoktrin. Die vielfältigen Implikationen sind in Bullock et al. (2005) thesenartig zusammengefasst.

---

werden (Zayas et al., 2002, in *Manduca sexta*). Letztgenannte Autoren fanden auch, dass NO synthetisierende Zellen und NO empfindliche Motoneurone räumlich fast überlappten (Zayas et al., 2000).

*Geometrie der NOS-Verteilung und NO-Signal:* NO signalisiert in den drei räumlichen Dimensionen, aber auch in der Zeit. Das bedingt eine komplexe Struktur von Konzentrationsgradienten, denen die einfache Annahme von NO produzierenden Strukturen als Punkt-Quelle nicht gerecht werden kann (Philippides et al., 2000).

Zwei bemerkenswerte Beispiele illustrieren, wie die geometrische Untersuchung von NO produzierenden Strukturen vordergründige Paradoxa der NO-Verteilung aufklären kann. Einerseits ist, wie vorher dargestellt, die konzentrische, ringförmige Anordnung der NOS dafür verantwortlich, dass die NO-Konzentration im Zentrum des Pilzkörpers der Wanderheuschrecke höher ist als in den Wänden, obwohl nur die Wände NOS enthalten (O'Shea et al. 1998). Andererseits zeigen vergleichende Studien bei Vertebraten als auch bei Invertebraten, dass NOS-IR positive Fasern meist extrem dünn sind. Das überrascht, wenn man bedenkt, dass Größe ein stark limitierender Faktor für die Synthese ist, und dass die betreffenden Neuritendurchmesser gerade groß genug sind, um die essentiellen Organellen zu beherbergen (Philipides et al., 2005). Die dünnen, NO produzierenden Fasern aber sind in vielen Systemen als ein extrem feines, raumgreifendes Maschennetz (Plexus) angeordnet. Im Gegensatz zu einer einzelnen, aber sehr effizienten, punktförmigen Quelle, deren Signal sich distanzabhängig verringert, könnte die kooperative Wirkung einzeln wenig effizienter Fasern dazu führen, dass ein räumlich homogenes Signal generiert würde (Philipides et al., 2005).

Vergleichende Studien zur NOS-Dichte und Verteilung an verschiedenartigen Tiersystemen könnten auch zur Aufklärung eines zu Tage tretenden Paradoxons beitragen, das auftaucht, wenn man Literaturwerte über NO-Wirkdistanzen auf das Nervensystem von Insekten überträgt. Wie schon erwähnt, halten viele Autoren eine Wirkdistanz von 100  $\mu\text{m}$  und mehr im neuronalen Gewebe verschiedener Tiere für wahrscheinlich (Lancaster, 1997). Dem steht nun aber die relativ geringe Größe der Neuropile kleiner Insekten gegenüber. So sind Thorakalganglien der noch vergleichsweise großen Wanderheuschrecke nur etwa 400  $\mu\text{m}$  hoch (ventral-dorsale Achse), 1000  $\mu\text{m}$  breit und messen von anterior nach posterior etwa 600-1500  $\mu\text{m}$ .<sup>2</sup> Wie viele Neurone je Ganglion in vivo tatsächlich NO produzieren, kann nur

---

<sup>2</sup> Der kürzere Wert zählt für das Prothorakalganglion, der längere Wert für das aus mehreren Neuromeren verschmolzene Metathorakalganglion. Die Werte variieren bei adulten Tieren interindividuell

---

annähernd beschrieben werden und dürfte sich etwa aus der Zahl der dort nachzuweisenden NOS-positiven Zellkörper und dazu, der im Ganglion verzweigenden NOS-positiven intersegmentalen Neurone ergeben. Das Metathorakalganglion nun ist hinsichtlich der darin befindlichen Zahl NOS positiver Zellkörper gut untersucht. Bullerjahn (2002) gibt eine Höchstzahl von 90-100 NADPHd-positiven Somata an, davon konnte die Mehrzahl - das sind 50-60 Somata - in 80% der untersuchten Präparate wieder aufgefunden werden. Ott & Burrows (1998) geben für alle thorakalen Ganglien einen Wert von 70-100 Neuronen NADPHd positiven Somata an. Das heißt, etwa 50-100 potentiell NO-synthetisierende Neurone sind vorhanden in einem Ganglion, dass in allen drei Raumdimensionen nur etwa 2 bis höchstens sechs Mal größer ist<sup>3</sup> als der putative Wirkbereich einer einzelnen, genügend effizienten NO-Quelle[d4]. Abgesehen von Unsicherheiten hinsichtlich der Effizienz der NO-Produktion einer Quelle und auch hinsichtlich deren Geometrie (Faser- oder Punktquelle, Philippides et al., 2000), so illustrieren diese Zahlen dennoch ein deutliches Missverhältnis; denn derart große Signaldistanzen könnten dazu führen, dass die Signale verschiedener NO-Quellen, welche in unterschiedlichen Funktionszusammenhängen stehen, überlagert würden. Damit wäre das Signal nicht mehr eindeutig einer Information zuzuordnen. Das alle Sender einem Funktionszusammenhang zuzuordnen sind, alle Sender also ein „gleich lautendes“ Signal tragen, kann zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch zeigen Ott & Burrows (1998), dass NOS positive Neurone sehr verschiedenen Zellpopulationen angehören. Die Existenz einer so großen Zahl verschiedener NO-Quellen, also verschiedener Sendern, je Ganglion ist deshalb unter Annahme solch großer Signaldistanzen kaum verständlich.

Die Unterscheidung zwischen Signalen verschiedener NO-Quellen könnte theoretisch auch durch einen zeitlichen Code geschehen. Vorstellbar ist, dass Neuronen periodische NO-Signale mit verschiedenen Frequenzen generieren, deren unterschiedliche Zeitstruktur dann ausgelesen wird. Ob ein zeitlicher Code tatsächlich realisiert wird, ist aber unklar. Zwar kann die Aktivierung von NOS und sGC im Millisekundenbereich erfolgen (vgl. Ballou et al., 2002; Bellamy und John Garthwaite, 2001), die längeren Zeitkonstanten anderer Faktoren aber würden die Zeitstruktur eventuell verwischen. Die Angaben über Halbwertszeiten von NO sind oft im Sekundenbereich, variieren aber stark (5 bis 15 s bei Lancaster, 1997; 90 ms bis 2s bei Thomas et al., 2001, vgl. auch Philippides et al., 2005), und auch die Inaktivierung des „NO-Rezeptors“, der sGC, kann zwar sehr schnell erfolgen (Bellamy und Garthwaite,

---

<sup>3</sup> Ein diffusibles Volumensignal sollte in sich gleichermaßen in alle Richtungen ausbreiten; auf einer Achse von der Quelle aus gesehen also 100 µm in die eine und 100 µm in die jeweils entgegengesetzte Richtung.

2001) ist aber von verschiedenartigen Faktoren abhängig und für verschiedene Gewebe schwer vorhersagbar (vgl. Ballou et al, 2002).

### **Ein sensomotorischer Schaltkreis für die Verarbeitung von Luftströmung und Flugsteuerung: Das A4I1-System:**

Wie die bisherigen Ausführungen klar demonstrierten, steht bei NO, viel mehr noch als bei klassischen Neurotransmittern, die Wechselsbeziehung von Geometrie und Signalübertragung im Fokus wissenschaftlichen Interesses.

Im Gegensatz zu Vertebraten, wo meist ein ganzer Neuronenverband eine bestimmte Funktion übernimmt, finden sich in vielen Invertebratensystemen je Körperseite einfach angelegte Neurone, die einerseits eine von anderen Neuronen klar abzugrenzende Funktion übernehmen, andererseits identifizierbar und oft experimentell gut zugänglich sind. Gerade im Kontext solcher identifizierter Einzelzellen sollten sich die räumlichen Beziehungen von NO-Signalquelle und einem einzelnen Signalempfänger in seinem natürlichen Zellverband ausgezeichnet studieren lassen.

Drei Fakten bilden Motivationspunkte der hier vorliegenden Arbeit zu anatomischen und physiologischen Aspekten der NO-Signalkette am Beispiel eines mechanosensorischen Systems der Wanderheuschrecke: (1) Eine hinsichtlich der an ihr wirksamen klassischen Transmitter sehr detailliert untersuchte Synapse ist die zwischen windsensitiven Rezeptorzellen und einem Projektionsinterneuron (A4I1) (Gauglitz & Pflüger, 2001). (2) In sensorischen Systemen ist oft eine Vielzahl modulatorischer Prozesse und Botenstoffe aktiv, um Konstanzleistungen gegenüber variablen Umweltverhältnissen zu bewirken (z. B. um ein „Übersteuern“ des Systems bei starker Reizung zu verhindern). Nur eine umfassende Aufklärung der beteiligten Elemente kann die komplexe Signaltransduktion von Reiz in Reizantwort unter verschiedenen Umweltbedingungen befriedigend beschreiben. (3) Mechanosensorische Neuropile von Wanderheuschrecken weisen eine hohe Dichte NO synthetisierender Fasern auf (Ott & Burrows, 1998; Bullerjahn & Pflüger 2003). Wegen (2) und (3) wurde eine Beteiligung von NO an Prozessen funktioneller Plastizität vermutet (S. Ott et al. 2000).

Das A4I1 ist ein Projektionsinterneuron, von dem im Bauchmark zwei bilaterale Homologe angelegt sind. Die Zellkörper jedes der beiden A4I1 liegen im vierten Abdominalganglion, deren Axone steigen bis ins Gehirn auf (Pflüger, 1984). Während im vierten Abdominalganglion nur Eingangssynapsen nachgewiesen wurden, sind für die drei thorakalen

---

Ganglien sowohl Eingangs- als auch Ausgangssynapsen gezeigt worden (Watson & Pflüger, 1984). Das A4I1 besitzt mindestens zwei Spike-initiierende Zonen: Durch Stimulation cercaler Afferenzen können im vierten Abdominalganglion Aktionspotentiale ausgelöst werden. Jedoch befindet sich die Haupteingangsregion des A4I1 im Prothorakalganglion. Hier konstituiert sich das rezeptive Feld eines adulten A4I1 aus etwa 150 windsensitiven Rezeptorzellen des Prosternums, dazu kommen Rezeptorzellen des Pronotums und Kopfes. Die prosternalen Rezeptorzellen innervieren lange filiforme Haare auf der Kutikula, deren Schaftlängen bis zu 750  $\mu\text{m}$  betragen. Die Rezeptorzellen sind äußerst empfindlich, schon Windgeschwindigkeiten von 30 mm/s (Pflüger & Tautz, 1982) und eine Auslenkung von  $1^\circ$  (Klee & Thurm, 1986) erregen die Afferenzen maximal. Die Rezeptorzellen verschalten wahrscheinlich monosynaptisch mit den ventralen Ästen des A4I1, welche im Prothorakalganglion ausgesprochen weit verzweigen. Sowohl licht- als auch elektronenmikroskopische Befunde weisen diese ventralen Neuriten als rein dendritisch aus. Die dorsalen prothorakalen A4I1-Verzweigungen dagegen tragen hauptsächlich Ausgangssynapsen, sind also vorwiegend axonal. Bemerkenswert ist, dass auch auf den afferenten Axonkolateralen Eingangs- und Ausgangssynapsen vorhanden und beide oft nahe beieinander lokalisiert sind (Watson & Pflüger 1984).

Sowohl die Verbindung des A4I1 mit meso- und metathorakalen pleuroaxillaren Flugsteuerermotoneuronen (Burrows & Pflüger, 1992; Bucher & Pflüger, 2000), als auch die richtungsabhängige Antwortstärke deuten auf eine Funktion bei der Richtungsverarbeitung des über Prosternum, Pronotum und Kopf ziehenden Luftstromes hin. Die Antwort des A4I1 auf Wind ist phasisch-tonisch, sie habituiert bei dauerhafter Stimulation und kann durch Änderung von Stimulusrichtung und -stärke dishabituert werden. Die beiden streng unilateralen A4I1 zeigen untereinander keinerlei funktionale, also synaptische Kopplung (Pflüger, 1984). Verhaltenspharmakologische Untersuchungen legen nahe, dass die schnelle Windantwort des A4I1 über nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren (AChRs) vermittelt wird (Gauglitz & Pflüger, 2001). Modulierende und inhibitorische Einflüsse wirken über muscarinische AChRs und GABA- und Glutamat-Rezeptoren.

Das Verschaltungsmuster von A4I1 und Rezeptoraxonen im Prothorakalganglion ist bemerkenswert: Während die lateralen – proepisternalen - Rezeptorpopulationen mit dem ipsilateralen A4I1 Kontakt machen, projizieren viele der medianen – probasisternalen - Rezeptorpopulation ausschließlich auf das kontralaterale A4I1 (Pflüger & Tautz, 1982; Pflüger, 1984; Mentel, 1999). Dabei ist die Synapsenstärke abhängig vom Alter der Rezeptorzelle. Im adulten A4I1 lösen die ältesten, also die schon in der ersten Larve

---

angelegten Rezeptorzellen die größten EPSPs aus. Dagegen ist der synaptische Kontakt des A4I1 mit jüngeren, d.h. später hinzu gekommenen Rezeptorzellen, deutlich schwächer (Burrows & Pflüger, 1990).

Die Entstehung des Verschaltungsmusters während der postembryonalen Entwicklung wird begleitet von einer etwa zehnfachen Zunahme der Zahl prosternaler, windsensitiver Rezeptorzellen und einer auffälligen Struktur Dynamik von deren Axonen. So projizieren probasisternale Rezeptorafferenzen der ersten beiden Larvenstadien ursprünglich bilateral im Ganglion - vom anterioren Hauptaxon ausgehend ziehen Axone in beiden medianen, ventralen Trakten (MVTs) nach posterior. Eine Rezeptorzelle verschaltet also auf beide A4I1. Im Verlauf der Entwicklung jedoch werden aufgrund kompetitiver Interaktion die ipsilateralen Terminale abgebaut und die synaptische Effizienz der verbliebenen, kontralateralen Projektionen wird verstärkt (Pflüger et al., 1994).

Weil die Wanderheuschrecke als hemimetaboles Insekt erst als Imago flugfähig ist, und weil das A4I1-System als Teil des Flugsteuersystems angesehen wird, mag es überraschen, dass die A4I1-Antwort schon in der ersten Larve eine deutliche Richtungspräferenz für Luftströmungen zeigt. Die Genauigkeit der Richtungsverarbeitung wird aber im Verlauf der o.g. dramatischen Umbauprozesse kontinuierlich erhöht (Bucher, 1996; Bucher & Pflüger, 2000). Weitere bemerkenswerte Aspekte postembryonaler Veränderungen betreffen die efferenten Elemente des Flugsteuerapparates. So degenerieren bestimmte Teile eines Flugmuskels erst kurz nach der Häutung zum adulten Tier in einer hormonabhängigen Weise (Meuser und Pflüger, 1998). Der Zentrale Mustergenerator für Flug ist schon in Larven pharmakologisch auszulösen (Stevenson & Kutsch, 1988), wogegen die sensorische Stimulation noch nicht zu rhythmischer Aktivität in den Flugmuskeln von Larven führt (Kutsch & Hemmer, 1994). Dies ist insofern erstaunlich, als die synaptische Verbindung des A4I1 mit Motoneuronen zum mesothorakalen, pleuroaxillaren Muskel (M85) schon in der fünften Larve etabliert ist (Bucher & Pflüger, 2000).

Mit dem A4I1-System der Wanderheuschrecke verfügt man über ein Tiermodell, das hinsichtlich der Topologie seiner Ein- und Ausgangssynapsen, der an ihm wirksamen Transmitter, seines besonderen Entwicklungsmodus und auch bezüglich der Verschaltung mit prä- und postsynaptischen Elementen umfassend untersucht ist. Wegen der Möglichkeit, an einer einzelnen, identifizierbaren Zielzelle geometrische Merkmale und funktionelle Mechanismen der NO-Wirkung beschreiben zu können, ist es Ziel der hier vorgelegten Studie, ein System zu etablieren, an dem sich eben diese Mechanismen untersuchen lassen.

Im ersten Teil werden anatomische Indizien gezeigt, die NO als wirksamen Transmitter wahrscheinlich machen. Darüber hinaus erlaubten neue dreidimensionale Rekonstruktionsverfahren, die NOS-Verteilung in verschiedenen räumlichen Entfernungen von einem Hauptneuriten des A4I1-Neuriten zu untersuchen. Ob ein Botenstoff homogen verteilt oder nur an lokalen, eng umgrenzten Spots im Umkreis eines Neurons auftritt, kann von großer Bedeutung für die räumliche Integration von Signalen sein. Diese dringliche Frage der NO-Forschung wird hier exemplarisch behandelt, indem eine neuartige Möglichkeit demonstriert wird, wie für verschiedene Distanzen bezüglich einer einzelnen Zielzelle (A4I1) geometrische Merkmale der NOS-Verteilung in einem Neuronenverband mit hoher NOS-Dichte analysiert werden können.

Den zweiten Schwerpunkt bilden physiologische Untersuchungen zur Wirkung von NO. Einerseits zeigt der Einsatz eines NO-Donors direkte Effekte auf Spikeantwort und Membranpotential des A4I1. Besonders hervorzuheben ist jedoch, dass das Blockieren der NO-Signalkette zu einer Modulation der (bei starker Reizung einsetzenden) Habituation führt, eine Wirkung, die frühere Hypothesen zur Beteiligung von NO an synaptischer Plastizität in mechanosensorischen Schaltkreisen der Wanderheuschrecke bestätigt. Der Befund legt darüber hinaus einen Mechanismus nahe, der es ermöglicht die Windantwort des sensorischen Schaltkreises anzupassen, je nach – bei Flug und Ruhe - stark variierendem Reizstatus.

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Anatomische Indizien für NO als Transmitter/Modulator des A4I1-Systems

Thorakale mechanosensorische Neuropile von Wanderheuschrecken weisen eine hohe Dichte von NO synthetisierenden Fasern auf (S. Ott et al. 2000, Bullerjahn & Pflüger 2003). Um aber anatomische Hinweise darüber zu erhalten, ob NO tatsächlich in einem bestimmten Schaltkreis als Botenstoff genutzt werden könnte, müssen die räumlichen Beziehungen zwischen der NO-Synthase (NOS) und den betreffenden Neuronen selbst, also potentiellen Empfängern des NO-Signals geprüft werden. Die folgenden Kapitel untersuchen deshalb die räumliche Verteilung der NOS im Umkreis des A4I1-Interneurons als auch im Umkreis windsensitiver Rezeptorzellen. In unterschiedlichen Entfernungen zu Neuriten wurde die uNOS-Immunoreaktivität (uNOS-IR) qualitativ analysiert. Für Entfernungen von 0,5-5 $\mu$ m wurde die Verteilung von uNOS-IR nahe dendritischen Verzweigungen des A4I1 quantitativ erfasst. Die Konsequenzen für die Weitreichigkeit des Volumensignals NO werden diskutiert. In insgesamt 12 Präparaten wurde die NOS im mechanosensorischen Neuropil des prothorakalen Ganglions immunozytochemisch markiert. Die Färbungen gelangen zuverlässig. Konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass jeweils die gleichen Neuropilgebiete intensiv markiert waren (vgl. nächster Abschnitt). Die Eindringtiefe des uNOS-Antikörpers war hoch (>150  $\mu$ m) und im Gegensatz zu Tests mit anderen Antikörpern nicht limitierend für das Prothorakalganglion (vgl. 6.1.3). In drei Experimenten wurden A4I1-Interneuron und NOS doppelmarkiert.

#### 3.2.1.1 Nachweis von NOS in Neuropilbereichen des verzweigenden A4I1

Abbildung 3.1 zeigt anhand einer Doppelmarkierung von NOS (grün) und A4I1 (weiß), in welchen prothorakalen Verzweigungsgebieten des A4I1 auch NOS nachweisbar war.

A4I1-Morphologie: Von posterior kommend zieht das intersegmentale Hauptaxon des A4I1 über das Konnektiv ins Ganglion ein. Von dort läuft es im VIT (*ventral intermediate tract*), verlässt das VIT im mittleren Gangliendrittel und, sich mehr nach ventral orientierend (vgl. Abb. 3.1 C), verläuft das Axon nun im MVT (*median ventral tract*). In diesem Bereich zweigt die Mehrzahl von an der Basis sehr breiten Neuriten (Durchmesser ca. 10  $\mu$ m) vom intersegmentalen Axon ab. Ein solcher Neurit teilt sich in einen nach ventral median und

einen nach dorsal median orientierten Zweig (I in Abb. 3.1 A)<sup>4</sup>. Anterior davon spalten die meisten Neuriten von einem gemeinsamen Ursprung auf dem intersegmentalen Axon ab (II in Abb. 3.1 A). Diese Dendriten ziehen sämtlich nach ventral und verzweigen vielfach in den VACs (VAC = ventral association centre)<sup>5</sup>.

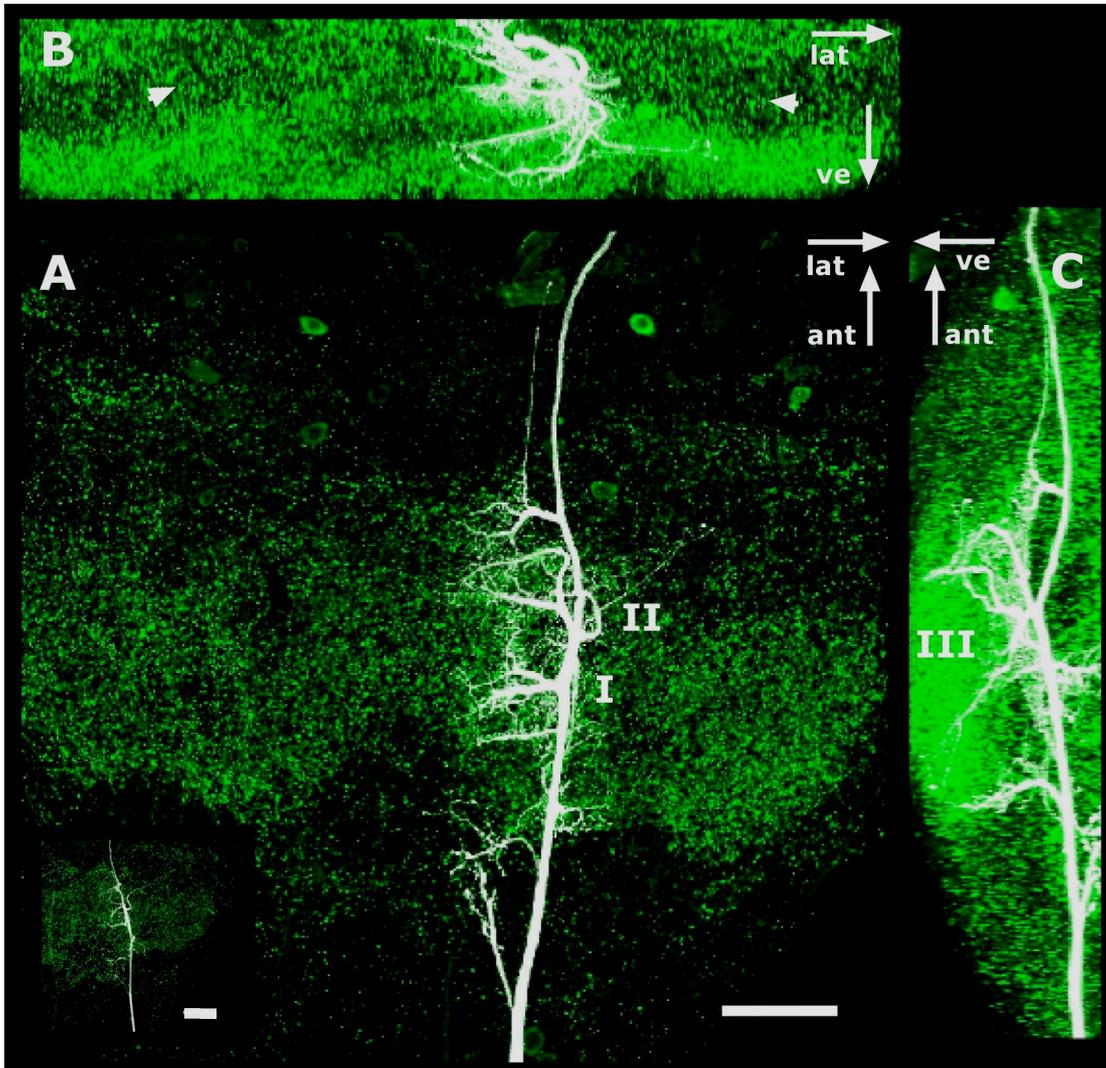


Abb. 3.1: Das A4II-Interneuron verzweigte in prothorakalen Neuropilgebieten, welche eine hohe Dichte an uNOS-Immunoreaktivität (uNOS-IR) aufwiesen. Konfokale Aufnahme einer Doppelmarkierung von A4II (weiß;

<sup>4</sup> Die aufgrund licht- und elektronenmikroskopischer Befunde vorgenommene Klassifizierung von Pflüger & Watson (1989) wird im Folgenden angewendet werden: dorsale A4II-Neuriten werden als vorwiegend axonal, ventrale Neuriten als vorwiegend dendritisch benannt.

<sup>5</sup> Da es sich bei den hier besprochenen anatomischen Darstellungen um Projektionsansichten von Fluoreszenzmarkierungen handelt, können Gewebsstrukturen wie Trakte, Kommissuren etc. nicht mit vollständiger Sicherheit benannt werden. Das vielfältig gegliederte VAC (aVAC, vVAC, IVAC und davon noch am leichtesten abzutrennen: das mVAC) wird hier deshalb lediglich als VAC besprochen.

---

Markierung mit Neurobiotin/Streptavidin-CY2) und NOS (grün; Markierung rabbit-<sub>-</sub>uNOS/<sub>-</sub>rabbit-CY5) bei niedriger Auflösung mit einem 20x-Öl Objektiv. Projektionsansichten von ventral (**A**, ein zweites Tier im Einschaltbild), von anterior (**B**) und von lateral (**C**). Die höchste Dichte an uNOS-IR fand sich in den ventralen Gebieten, nahe dendritischen Verzweigungen des A4I1 (III in C). ve=ventral. lat=lateral. ant=anterior. Skalierungsbalken: 100 µm. Für I, II und Pfeilspitzen vergleiche Text.

Besonders die ventrale Ansicht (großes Bild und Einschaltbild in Abb. 3.1 A) zeigt, dass NOS-Markierungen in hoher Dichte im gesamten prothorakalen Neuropil zu finden waren (vgl. Abb. 3.1 A). Die auffällig höchste Dichte von uNOS-IR war für die ventralen Neuropilbereiche (VACs; vgl. Abb.3.1 C III) festzustellen. Farbeunterschiede innerhalb des gesamten Neuropils spiegeln in einigen Fällen vermutlich die Gewebsstruktur des Ganglions wider. So zeigt die Ansicht von anterior bilateralsymmetrische Schichten mit geringer Färbedichte - wahrscheinlich im Bereich von Traktbereichen, nämlich von MVT und VMT (Pfeilspitzen in Abb. 3.1 B).

Innerhalb der peripher gelegenen Somaregion fanden sich wenige, und nur noch vereinzelte uNOS-IR positive Strukturen. Des Weiteren markierte der uNOS-Antikörper hier, im anterioren Bereich, ebenfalls Somata.

Wenngleich es schwierig ist, anhand zweidimensionaler Projektionsansichten Kollokalisierung oder räumliche Nähe zweier Strukturen festzustellen, so lassen sich doch schon einige Aussagen über Lagebeziehungen von uNOS-IR und Interneuron treffen. Erstens kann für keines der von A4I1-Neuriten durchzogenen Neuropilgebiete NOS in der Nachbarschaft des A4I1 ausgeschlossen werden. Zweitens lässt die hohe Dichte von uNOS-IR im ventralen Neuropilbereich (VAC, vgl. 3.1 A, C) mit hoher Wahrscheinlichkeit NO-Synthesorte nahe ventraler, vorwiegend dendritischer Neuriten des A4I1 erwarten.

Die Fusionierung verschiedener Ebenen kompliziert die Interpretation von Projektionsansichten bezüglich der Intensitätsverteilung in verschiedenen Tiefen. Deshalb zeigt Abbildung 3.2 anhand der Projektion von jeweils nur 10 µm tiefen Bildstapeln die Verteilung von uNOS-IR um ventrale Dendriten des A4I1. Die obere Reihe in Abbildung 3.2 zeigt uNOS-IR positive Profile in drei verschiedenen Tiefenebenen. In allen drei Bildern ist die Intensität der hellsten Markierungen jeweils etwa gleich. Das zeigt, dass die Färbeintensität nicht methodisch, also diffusions- und tiefenbedingt vermindert war, und dass somit eine Vergleichbarkeit der uNOS-IR für die verschiedenen Ebenen gegeben ist. Anhand der Abbildung 3.2 E lassen sich darüber hinaus Charakteristika der äußeren Form der Markierungen erkennen, die in Abb. 3.1 so nicht festzustellen waren: Neben distinkten Einzelpunkten erschien die uNOS-IR auch als perlschnurartige Reihe von Punkten, was auf

die Existenz NO synthetisierender Fasern hindeutet (Pfeilspitzen in Abb. 3.2 E; vgl. Philippides et al., 2005).

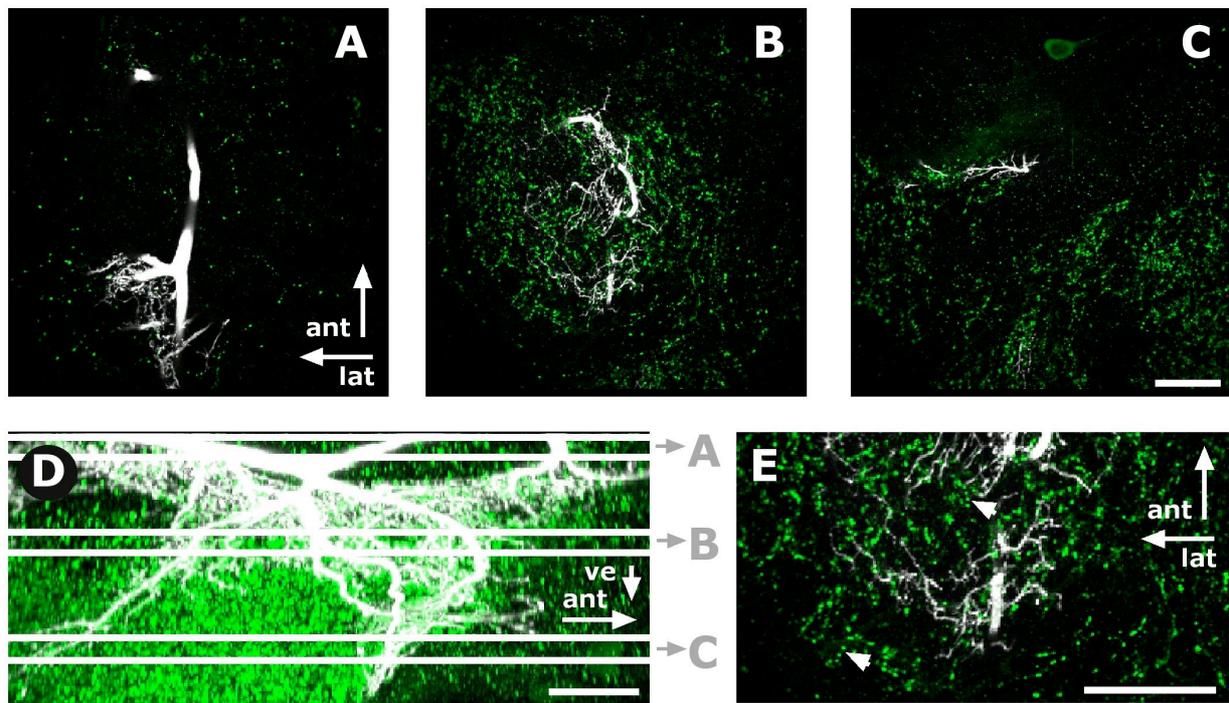


Abb. 3.2: *Kolokalisierung von uNOS-IR und A411 in verschiedenen Tiefen (z-Ebenen): u-NOS-IR vor allem nahe ventraler, vorwiegend dendritischer Äste des A411. Doppelmarkierung von A411 und NOS (wie für Abb. 3.1 beschrieben). Konfokale Aufnahme mit 50x-Öl-Objektiv. D: Projektionsansicht als z-Schnitt (laterale Aufsicht) zur Verdeutlichung der z-Dimensionen der für A,B und C verwendeten Bildstapel. A, B, C: Projektionsansichten jeweils 10  $\mu\text{m}$  tiefer Bildstapel. Ventrale Aufsicht. z-Dimensionen: C 20-30  $\mu\text{m}$ / B 70-80  $\mu\text{m}$ / A 110-120  $\mu\text{m}$  (ausgehend von der am meisten ventralen Verzweigung des A411. Diese befindet sich etwa 5-10  $\mu\text{m}$  unterhalb der ventralen Ganglionoberfläche). E: Ausschnitt aus B zeigt u-NOS-IR als distinkte Einzelpunkte oder mit perlschnurartiger Erscheinung (Pfeilspitzen). ve=ventral. lat=lateral. Skalierungsbalken: 50  $\mu\text{m}$ .*

In einer Tiefe von 70-80  $\mu\text{m}$  verzweigte das A411 sehr weiträumig (Abb. 3.2 B). Ebenso hatte der Bereich mit dichten NOS-Markierungen hier die größte Ausdehnung. In der Projektionsansicht erscheinen Markierungen in unmittelbarer Nähe sowohl von breiten als auch sehr feinen A411-Dendriten. Abbildung 3.2 C zeigt eine lokale Häufung von uNOS-IR nahe dem am meisten ventralen Dendritenabschnitt. Abbildung 3.2 A zeigt das intersegmentale Hauptaxon des A411 (vgl. I in Abb. 3.1 A) etwa im Bereich des VIT, in Tiefenebenen von 110-120  $\mu\text{m}$ . Generell fanden sich hier deutlich weniger NOS-Markierungen als in den weiter ventral gelegenen Projektionsansichten (B & C). Einige NOS-

Markierungen traten dennoch nahe A4I1-Neuriten auf. Nahe dem Hauptaxon und mithin im Traktbereich war fast keine Färbung festzustellen.

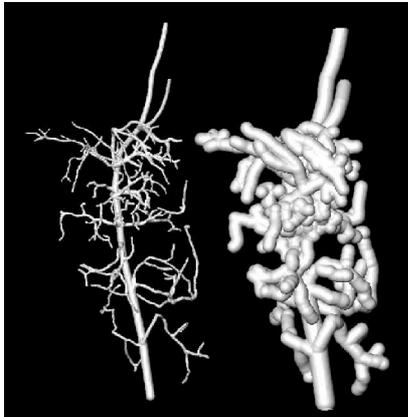


Abb. 3.3: Darstellung des für Abbildung 3.4 verwendeten Rekonstruktions- und Kartierungsverfahrens. Links: Repräsentative Neuriten des A4I1 wurden rekonstruiert und deren Radien angepasst. Rechts: Um die rekonstruierten Neuritenoberflächen (links) wurde ein Distanzvolumen errechnet, dessen Oberfläche 10  $\mu\text{m}$  von der rekonstruierten A4I1-Oberfläche entfernt ist (rechts). Im Distanzvolumen wurden die jeweils maximalen uNOS-IR-Intensitätswerte erfasst und einem Punkt auf der A4I1-Oberfläche (links) zugeordnet (vgl. auch Kapitel 3.4)

Gegenstand der Untersuchungen ist die Verteilung von NOS in solchen Neuropilgebieten, in denen auch A4I1-Neuriten verzweigen. Um jedoch eine erschöpfende und weitgehend fehlerfreie, alle prothorakalen Verzweigungsgebiete beschreibende Darstellungsform zu wählen, müssten bei herkömmlicher Präsentationsform nicht die Projektionsansichten konfokaler Bilddaten, sondern jeder optische Einzelschnitt eines Bilderstapels gezeigt werden.

Abbildung 3.3 illustriert die Methode zur Herstellung einer alternativen Darstellungsform von uNOS-IR in der Nähe des A4I1. Um die Ausdehnung des prothorakalen Verzweigungsgebietes zu umschreiben, wurden repräsentative A4I1-Neuriten einer konfokalmikroskopischen Aufnahme (20x-Öl Objektiv) rekonstruiert (Abb. 3.3 links). In einer Entfernung von 10  $\mu\text{m}$  zu jedem Punkt der rekonstruierten Oberfläche wurde ein Volumen generiert (Abb. 3.3 rechts), das sämtliche prothorakalen Verzweigungen des A4I1 umhüllt. In diesem Volumen wurde die maximale Intensität der uNOS-IR bestimmt und auf den entsprechenden Oberflächenpunkt der rekonstruierten Neuriten (Abb. 3.3 links) projiziert (Abb. 3.4; vgl. Kapitel 6.1.4). Dabei werden in der Falschfarbendarstellung hohe IR-Intensitäten als warme Rottöne, und geringe Intensitäten als kalte Blautöne kodiert.

Markierungen hoher und mittlerer Intensität (rot, gelb, grün) für die NOS fanden sich in hoher Dichte an ventralen, vorwiegend dendritischen Neuriten des A4I1 (Abb. 3.4; Pfeilspitzen mit \* und \*\*). Dieser Befund bestätigt die Annahmen zu Abbildung 3.1 C, welche NOS in der Nachbarschaft sowohl einer eher anterioren (Pfeilspitzen mit \*) als auch einer mehr

posterioren Population (\*\*) ventraler Neuriten vermuten ließ (vgl. I und II in Abb. 3.1 A). Besonders für Letztere fiel die großflächige Verteilung von uNOS-IR mit hoher Intensität auf (vgl. Abb. 3.4 D).

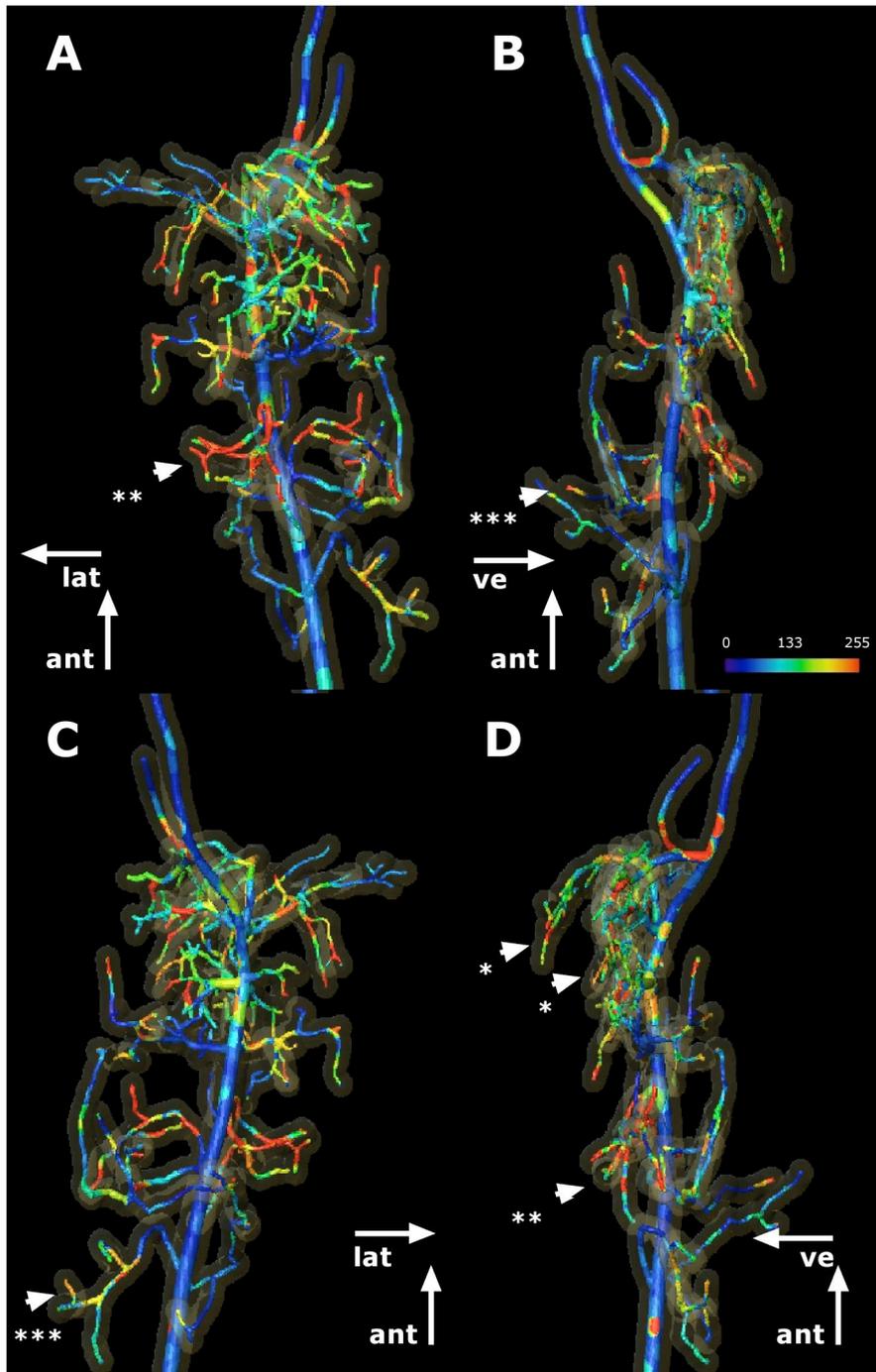


Abb. 3.4: Sowohl anterior ventrale als auch median dorsale Neuriten des A4I1 wiesen in ihrer Nähe uNOS-IR hoher Intensität auf. Verteilung von Intensitäten der uNOS-IR innerhalb einer 10  $\mu\text{m}$  Entfernung zur Oberfläche prothorakaler Verzweigungen des A4I1. A bis D: Ansichten von ventral/ lateral/ dorsal/ median. uNOS-IR

Kartierung anhand niedrig auflösender konfokaler Daten (20x-Öl Objektiv) In der Falschfarbdarstellung kodieren warme Rottöne für sehr hohe, kalte Blautöne für sehr niedrige Intensitäten der uNOS-IR. Blau bis Rot skalieren mit 0...255 relativer Färbintensität (vgl. Farbskalierung in B). Die helle Schattierung beschreibt das 10 µm-Distanzvolumen. ve=ventral. ant=anterior. lat=lateral. (Für Pfeilspitzen vgl. Text.)

Im Gegensatz zu Abbildung 3.1 betrachtet Abbildung 3.4 auch die Gebiete um die dorsalen A4I1-Neuriten. Zunächst ist festzuhalten, dass auch in der Nähe von dorsalen axonalen Neuriten uNOS-IR-Profile mittlerer bis hoher Intensität nachzuweisen waren (Abb. 3.4; Pfeilspitzen mit \*\*\*). Jedoch waren bei diesen Neuriten solche Bereiche oft unterbrochen von langen Segmentabschnitten, für die sich kein Hinweis auf NOS in deren Nachbarschaft finden ließ.

Im Vergleich zu den bereits besprochenen Ganglienbereichen nahe ventralen und dorsalen Neuriten, war in der Nähe des intersegmentalen Axons nur selten NOS nachzuweisen. In der Darstellung bleibt es die meiste Strecke unmarkiert. Lediglich an abzweigenden Neuriten, wie im Gebiet des VIT und nahe dem am meisten anterioren Neuriten konnte uNOS-IR in - dem Hauptaxon nahen - Bereichen gezeigt werden.

### **3.2.1.2 Hochauflösende konfokale Daten zeigen NOS auch in Submikrometer-Nähe zum A4I1**

In der Literatur finden sich für NO sehr unterschiedliche Angaben über maximale Wirkdistanzen, teilweise von mehr als 100 µm (Lancaster, 1997). Demgegenüber halten andere Autoren eine Wirkung von NO nahe der Zellmembran bzw. in unmittelbarer Synapsennähe für plausibel (Burette et al., 2002; Dreyer et al. 2005). Letzteres kann auch für das A4I1-System nicht ausgeschlossen werden. Deshalb muss das Vorkommen von NO-Synthese auch in Mikro- bzw. sogar in Submikrometernähe zum A4I1 untersucht werden. Nur so können auch im Falle einer Nahwirkung aussagekräftige anatomische Hinweise auf NO-Transmitterwirkung für das A4I1 erbracht werden.

Deshalb zeigt Abbildung 3.5 hochauflösende optische Einzelschnitte für drei verschiedene Gebiete ventraler A4I1-Verzweigungen (vgl. I & II in Abb. 3.1). Die meist punktförmige Erscheinung der uNOS-IR war hier besonders deutlich (vgl. Abb. 3.5 B & C), die Größe der Profile variierte zwischen weniger als 1 µm bis zu wenigen Mikrometern. Zahlreiche dieser Profile waren tatsächlich unmittelbar an A4I1-Neuriten lokalisiert (Pfeilspitzen in Abb. 3.5 C & D). Teils lag die Signalüberlappung beider Kanäle sogar unterhalb des optischen

Auflösungsvermögens, was theoretisch auch das A4I1 als Syntheseort für NO denkbar macht. Bei Durchsicht der kompletten Bilderstapel jedoch fanden sich keine deutlichen Beispiele für uNOS-IR-Profile, die vollständig in der A4I1-Färbung einbeschrieben wären. Vielmehr war ein Überlappen der Signale fast immer nur partiell (vgl. Diskussion).

### 3.2.1.3 Dichteverteilung der NOS in verschiedener räumlicher Nähe zu einem ventralen A4I-Neuriten

Dieses Kapitel untersucht die Verteilung von uNOS-IR in verschiedenen definierten Distanzvolumina im Umkreis eines A4I1-Neuriten um Hinweise auf globale oder eine eher lokale Wirkung von NO geben zu können.

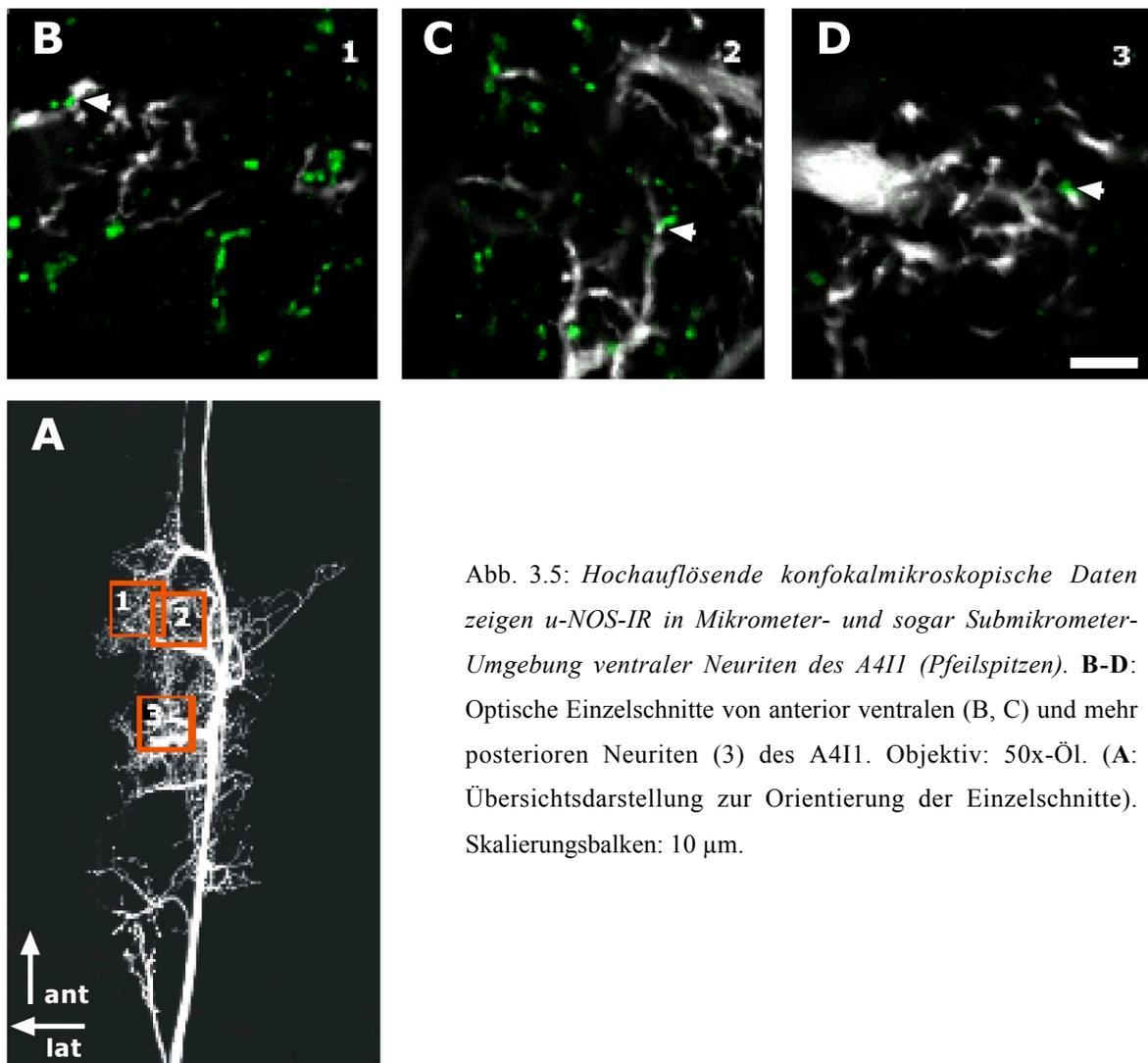
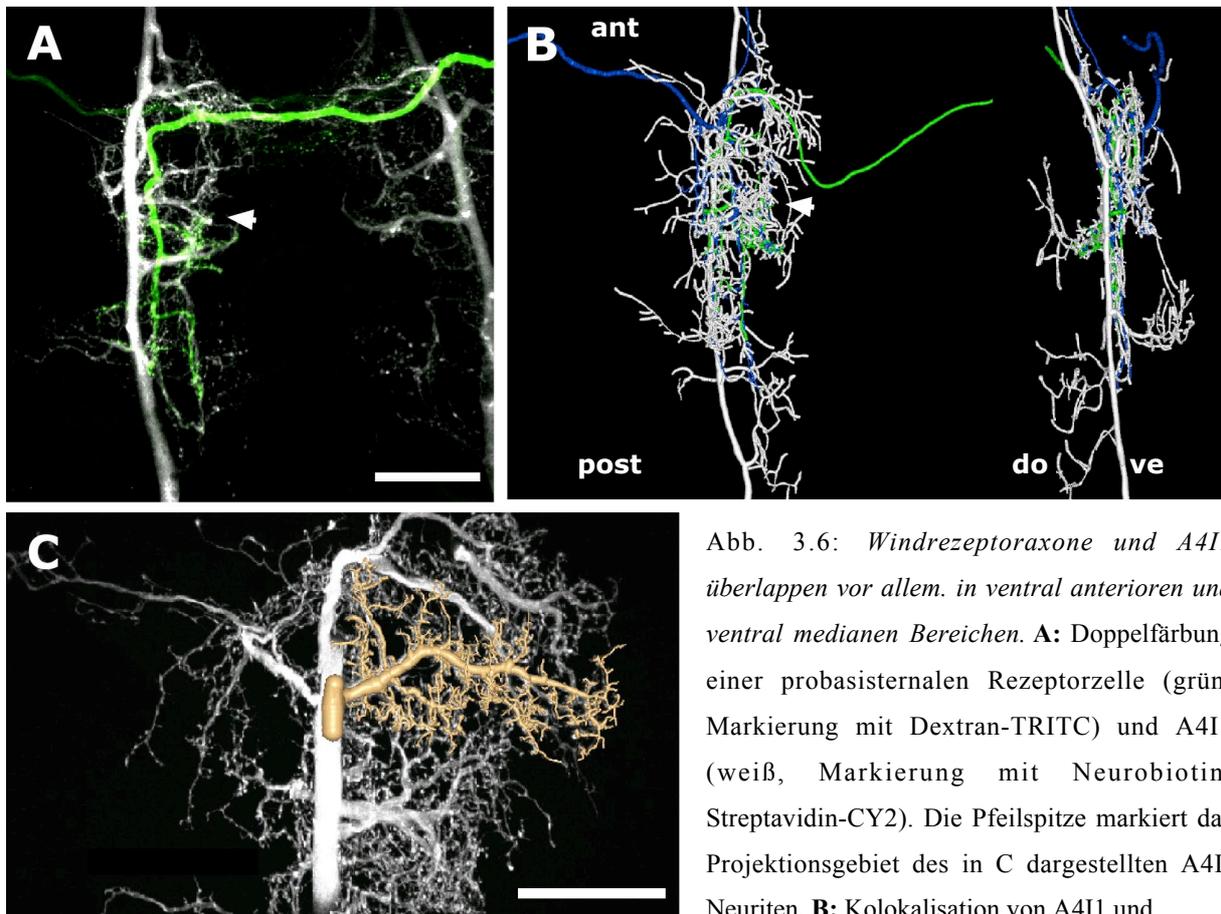


Abb. 3.5: Hochauflösende konfokalmikroskopische Daten zeigen u-NOS-IR in Mikrometer- und sogar Submikrometer-Umgebung ventraler Neuriten des A4I1 (Pfeilspitzen). **B-D**: Optische Einzelschnitte von anterior ventralen (B, C) und mehr posterioren Neuriten (3) des A4I1. Objektiv: 50x-Öl. (A: Übersichtsdarstellung zur Orientierung der Einzelschnitte). Skalierungsbalken: 10  $\mu$ m.

Für die Analyse wurde ein solcher anteriorer Neurit detailliert rekonstruiert (Abb. 3.6 C), der einerseits in jenem ventralen Neuropilbereich (VAC) verzweigt, für den die höchste Dichte

von uNOS-IR festgestellt wurde (vgl. II in Abb. 3.1), der aber auch andererseits im Projektionsgebiet prothorakaler Windrezeptorafferenzen verzweigt (Pfeilspitzen in Abb. 3.6 A & B). Zur Überprüfung gemeinsamer Projektionsgebiete von A4I1 und Rezeptoraxonen wurden Mehrfachmarkierungen der entsprechenden Neurone im Prothorakalganglion angefertigt (n=15 Präparate).



Rezeptorzellen. Schematische Lagebeziehung anhand von Rekonstruktionen einer Dreifachmarkierung von A4I1 (weiß) und präsynaptischen Windrezeptoraxonen (blau: proepisternaler, grün: probasisternaler Rezeptor). **C:** Lage des für Abbildung 3.7 rekonstruierten anterior ventralen A4I1-Neuriten. Skalierungsbalken: 50  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 3.6 A zeigt eine Doppelmarkierung von A4I1 (weiß) und einer probasisternalen Rezeptorzelle (grün). Abbildung 3.6 B zeigt anhand von rekonstruierten Neuriten Überlappungen der Projektionen von A4I1 (weiß) sowie probasisternalen (grün) und proepisternalen Rezeptorzellen (blau). Die Afferenzen überlappten weiträumig mit ventralen Neuriten des A4I1 (Pfeilspitzen in Abb. 3.6 A & B) als auch mit mehr dorsalen Verzweigungen (B, rechts). Die uNOS-IR-Verteilung um den rekonstruierten A4I1-Neuriten (Abb. 3.6 C) betrachtet somit die Verteilung von NOS im dendritischen Integrationsgebiet nahe putativer Synapsen von Interneuron und Rezeptorzellen.

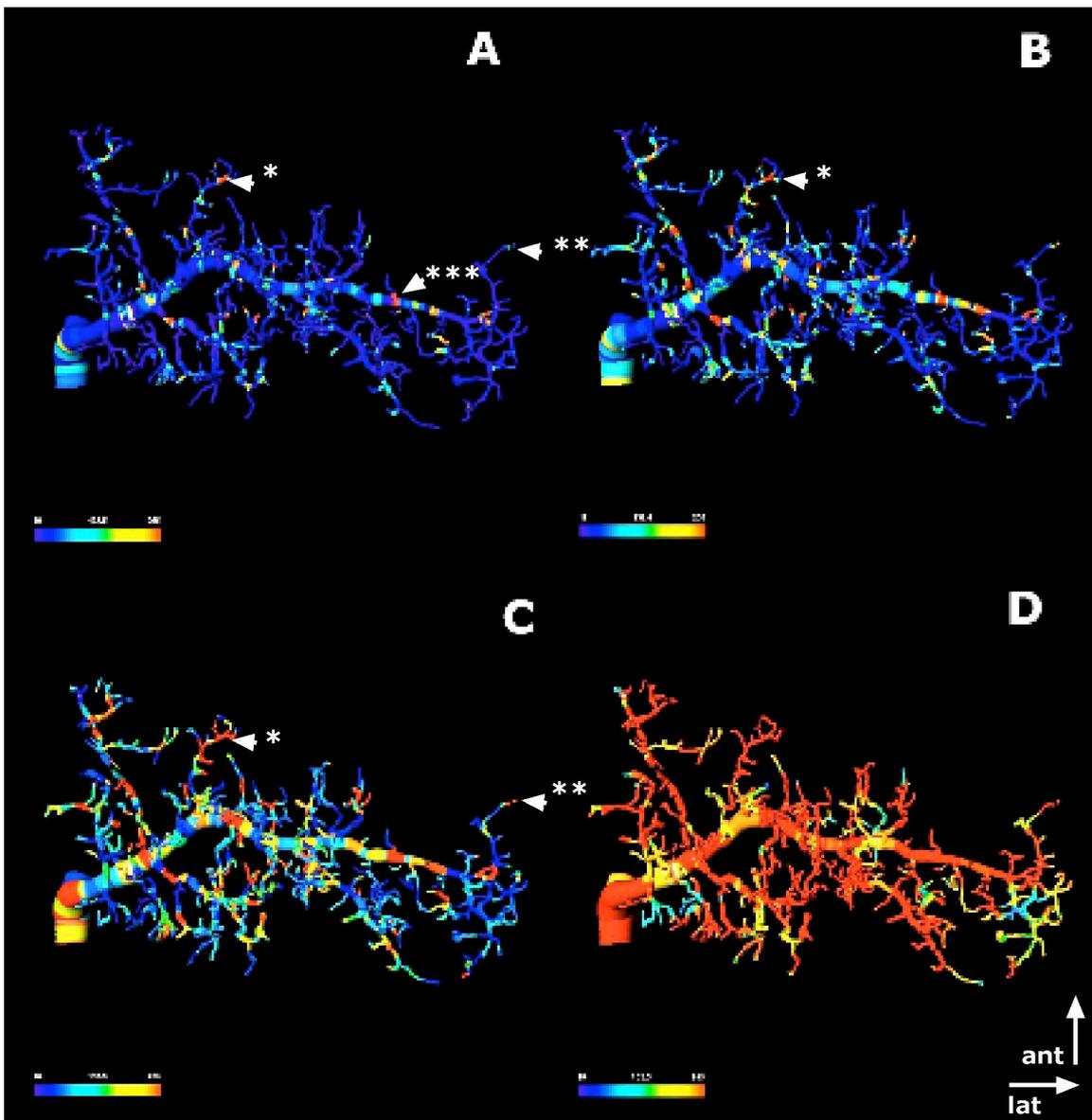


Abb. 3.7: Verteilung von uNOS-IR in verschiedener Entfernung zu einem anterior ventralen A41-Hauptneuriten: Vereinzelte, sehr lokale uNOS-IR in 0,5  $\mu\text{m}$  Distanz (A). Dagegen weist in 5  $\mu\text{m}$  Nachbarschaft nahezu jeder Punkt der Neuritenoberfläche uNOS-IR hoher Intensität auf (D). uNOS-IR Projektionen auf einen vollständig rekonstruierten A41I Neuriten auf der Grundlage hochauflösender konfokaler Aufnahmen (50x-Öl Objektiv). Bestimmung der uNOS-IR in Volumina mit folgenden Distanzen zur A41I Oberfläche: A 0,5  $\mu\text{m}$ , B 1  $\mu\text{m}$ , C 2  $\mu\text{m}$  und D 5  $\mu\text{m}$ . In der Falschfarbdarstellung kodieren warme Rottöne für sehr hohe, kalte Blautöne für sehr niedrige Intensitäten der NOS-IR. Für Pfeilspitzen vgl. Text.

Abbildung 3.7 zeigt Intensität und Verteilung der uNOS-IR für vier verschiedene Distanzen im Umkreis der rekonstruierten Neuritenoberfläche (A/B/C/D in Abb. 3.7 = 0,5/1/2/5  $\mu\text{m}$ ). Für 0,5  $\mu\text{m}$  Entfernung fanden sich nur sehr wenige uNOS-IR-Markierungen hoher Intensität (rot). Diese waren räumlich stark fokussiert (\* in Abb. 3.7 A) und waren lokalisiert sowohl an

---

dem breiten Abzweig erster Ordnung vom intersegmentalen Hauptaxon (\*\*\*) in Abb. 3.7 A) als auch an Verzweigungen höherer Ordnung (\* in Abb. 3.7 A). Vergrößerte man das Suchvolumen auf ein Gebiet von 2  $\mu\text{m}$  Entfernung um die rekonstruierte Neuritenoberfläche herum (Abb. 3.7 C), so waren zum einen auch die bei 0,5  $\mu\text{m}$  Distanz vorhandenen Markierungen für höchste IR-Intensität vergrößert (\* in Abb. 3.7 C vs. A). Der nahe liegende Grund hierfür ist das ebenfalls vergrößerte Projektionsvolumens jeder einzelnen uNOS-IR Markierung (vgl. Diskussion). Andererseits traten aber auch neue Markierungen höchster Intensität hinzu (\*\* in Abb. 3.7 C vs. A).

Der deutlichste Unterschied zwischen zwei Distanzvolumen fand sich bei Entfernungen von 2 und 5  $\mu\text{m}$ . Im Gegensatz zu den Darstellung A, B und C in Abbildung 3.7, die alle noch distinkte Markierungen für uNOS-IR zeigten, wies nahezu die gesamte Neuritenoberfläche in einer 5  $\mu\text{m}$  Umgebung eine uNOS-IR hoher Intensität bei vergleichsweise homogener Verteilung auf.

Ein wichtiger Vorzug der Darstellungsform ist, dass sie Voraussagen darüber erlaubt, wie viel Neuritenoberfläche bei verschiedenen hypothetischen Wirkdistanzen das NO-Signal rezipieren könnte. Die Kartierung von uNOS-IR in verschiedenen Distanzvolumen auf einem Neurit ist deshalb in Abbildung 3.8 quantitativ erfasst. Wie schon für Abbildung 3.7 festgestellt, fällt für alle in Abbildung 3.8 A gezeigten Grafen ein prägnanter Anstieg von uNOS-IR positiver Segmentlänge auf, wenn der Distanzwert von 2 auf 5  $\mu\text{m}$  erhöht wurde (nähere Erläuterungen zur Darstellungsform der Grafen s.u.).

Neben diesem korrelativen Trend zeigt Abbildung 3.8 für jeden Distanzwert auch, wie hoch der Anteil von solchen Neuritenabschnitten ist, welche innerhalb einer bestimmten Entfernung (0,5 – 5  $\mu\text{m}$ ) uNOS-IR aufweisen. Im Gegensatz zu den im Allgemeinen recht homogenen Zellfärbungen mit Neurobiotinkomplexen variieren aber die Intensitäten von Antikörpermarkierungen gegen Gewebsproteine (hier NOS) im selben Präparat zum Teil erheblich. Dieser Umstand kompliziert die Unterscheidung zwischen Signal und Rauschen (z.B. Autofluoreszenz, vgl. Diskussion). Deshalb zeigt Abbildung 3.8 vier Kurven für vier verschiedene Intensitäts-Schwellenwerte, für welche die uNOS-IR als positiv, d.h. als Signal gewertet wurde.

Die untere Kurve in Abbildung 3.8 A für eine Schwellenintensität von 100% zählt je Distanzwert alle Segmentlängen, die in Abbildung 3.7 tief rot dargestellt sind (vgl. Farbskalierungsbalken in Abb. 3.7). Die Kurve für 50% zählt alle grün, gelb bis rot markierten Segmentlängen und weist deshalb höhere Prozentwerte auf. Am meisten verschieden von allen anderen Kurven war jene für 25% Schwellenintensität, für eine

Intensität also, bei welcher mit der vergleichsweise höchsten Wahrscheinlichkeit sowohl uNOS-IR-Signale als auch Voxel mit Hintergrundrauschen ausgezählt wurden.

Wegen theoretischer Überlegungen zur Ähnlichkeit der Kurvenverläufe erscheint ein Wert von etwa 50% maximaler Färbeintensität als Schwelle zur Unterscheidung zwischen uNOS-IR - Signal und Rauschen als vernünftiger Näherungswert (für nähere Erläuterungen siehe Diskussion). In diesem Fall wiesen nur 5,0 % der Neuritenlänge innerhalb einer 0,5  $\mu\text{m}$  Entfernung uNOS-IR positive Voxel auf, in 1  $\mu\text{m}$  Nähe waren es 12,5 % der Gesamtlänge, in 2  $\mu\text{m}$  Nähe schon 34,7 % und in einem Umkreis von 5  $\mu\text{m}$  um die Neuritenoberfläche fand sich für 91,5 % der Gesamtlänge eine uNOS-IR positive Markierung.

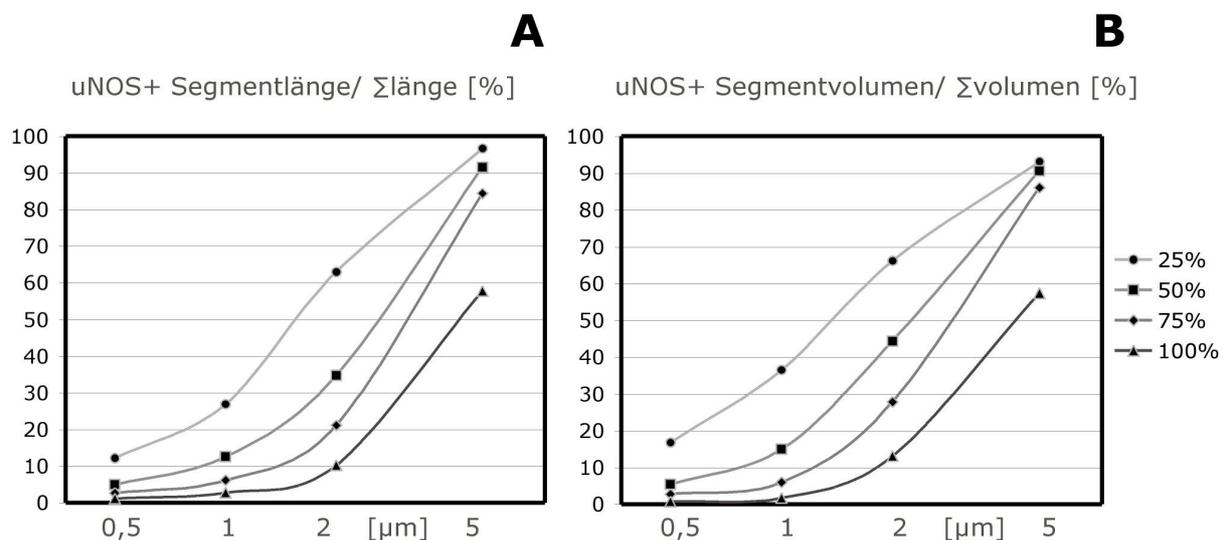


Abb. 3.8: Quantitative Erfassung des Anteils von A411-Neuritenabschnitten, die in verschiedener Distanz uNOS-IR aufweisen (Grundlage der Analyse ist der Neurit aus Abb. 3.7). **A** Anteil der Neuritenlänge mit uNOS-IR positiven Voxeln in ihrer Nachbarschaft an der Gesamtlänge des Neuriten. Analyse für verschiedene Schwellenkriterien, bei denen die uNOS-IR als positiv gewertet wird (siehe rechte Legende) **B** Anteil des Neuritenvolumens mit uNOS-IR positiven Voxeln in ihrer Nachbarschaft am Gesamtvolumen.

Das heißt, innerhalb einer Distanz von 0,5  $\mu\text{m}$  um den ventralen Neuriten war also kaum NOS lokalisiert. Die wenigen uNOS-IR-Profile kamen dann auch in räumlich distinkter Verteilung vor (vgl. Abb. 3.7). Suchte man dagegen einen um nur 4,5  $\mu\text{m}$  weiteren Bereich um das Neuron herum nach uNOS-IR ab, fand sich nahezu auf der gesamten Länge für jeden Neuritenpunkt ein höchstens 5  $\mu\text{m}$  entferntes uNOS-IR positives Profil.

Da NO ein diffusibles Signal ist, dessen Rezeptor, die sGC im Zellvolumen beweglich sein kann, betrachtet Abbildung 3.8 statt der Segmentlängen auch die Volumina solcher Neuritenabschnitte, die uNOS-IR in ihrer Nachbarschaft aufwiesen. Hinsichtlich des Anstiegs

---

des Anteils uNOS-IR positiver Neuritenabschnitte bei Vergrößerung des Distanzvolumens, aber auch hinsichtlich der maximal erreichten uNOS-IR positiven Volumina bei 5 µm und auch hinsichtlich der Ähnlichkeit der Kurven bei 50 und 75 %- Schwellenwerten fanden sich keine auffallenden Unterschiede zwischen den Grafen in Abbildung 3.8 A und B. Lediglich fiel auf, dass bei 2 µm Distanz besonders für 50 und 75 % Schwellenintensität der Volumenanteil mit benachbarter uNOS-IR (B: Volumenanteil = 44,3 / 27,8 % bei Schwelle = 50 / 75%) größer war als der Längenanteil (A: Längenanteil= 34,8 / 21,1% bei Schwelle = 50 / 75%).

### **3.2.1.2 NOS in der Nähe prothorakaler Axonkolaterale von Windrezeptorzellen**

Neben der Lokalisierung von NOS in der Umgebung des A4I1-Interneurons war ebenfalls von Interesse, ob NOS in räumlicher Nähe auch zu Axonen von Afferenzen nachzuweisen ist – als Hinweis darauf, dass NO schon auf Synapsen erster Ordnung (zwischen Rezeptorzellen und Interneuronen) wirken könnte. Dafür zeigt Abbildung 3.9 die Doppelmarkierung von zahlreichen proepisternalen windsensitiven Rezeptorzellen und NOS im Prothorakalganglion als hochauflösende konfokale Aufnahmen.

Für optische Einzelschnitte in verschiedenen Tiefen und an verschiedenen Orten entlang der anterior-posterioren Achse (vgl. Abb. 3.9 A) trat uNOS-IR in unmittelbarer Nähe zu anterioren (B & C) als auch posterioren (D & E) Axonkolateralen der Rezeptorzellen auf, teils in Submikrometerdistanz (Pfeilspitzen in Abb. 3.9 C & D). Einzelne uNOS-IR Markierungen, die vollständig in die Zellfärbung einbeschrieben wären, fanden sich jedoch nur ausnahmsweise.

Man beachte auch, dass in den Abbildungen 3.9 C & D die einander jeweils nächsten NOS-IR Markierungen selten mehr als 10 µm voneinander entfernt sind: Das deutet darauf hin, dass die mittlere Entfernung benachbarter NOS-Quellen in diesem ventralen Neuropilgebiet weniger als 10 µm betragen sollte.

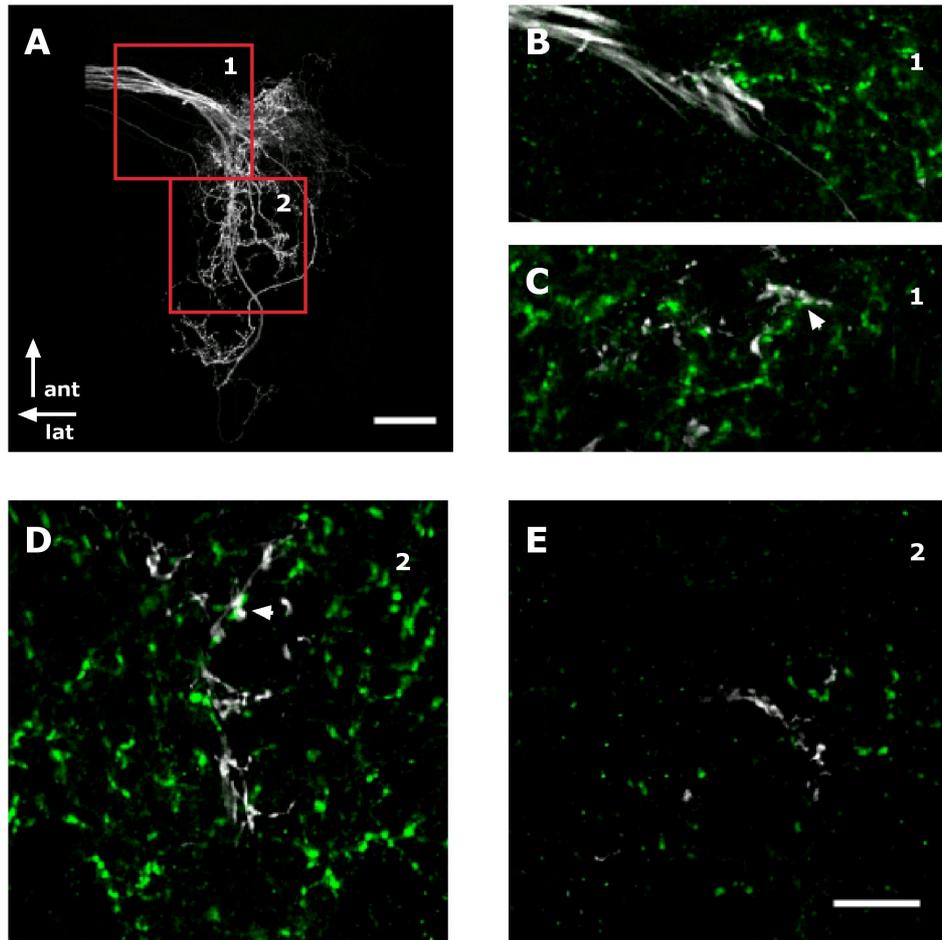


Abb. 3.9: Hochauflösende konfokale Daten zeigen u-NOS-IR in Mikrometer- und sogar Submikrometer-Umgebung (Pfeilspitzen) ventraler Axonkolaterale prothoracaler Windrezeptorzellen. **A:** Backfill proepisternaler Rezeptorzellen (Markierung: Neurobiotin/Streptavidin CY2). Übersichtsdarstellung zur Orientierung der Einzelschnitte. **B-E:** Optische Einzelschnitte der Doppelmarkierung (weiß: Rezeptoraxone, grün: uNOS-IR; Markierungen wie oben). Objektiv: 50x-Öl. Skalierungsbalken: A 50  $\mu\text{m}$ ; Skalierungsbalken in E für B-E: 10  $\mu\text{m}$ .

Es ist bekannt, dass viele Eigenschaften des Flugsteuernetzwerks der Wanderheuschrecke schon larval angelegt sind. In fünf Präparaten wurden uNOS-Antikörpermarkierungen für Larvenstadien durchgeführt. Abbildung 3.10 zeigt anhand einer Doppelmarkierung von Windrezeptorzelle und NOS, dass auch schon in der vierten Larve uNOS-IR in unmittelbarer Nähe zu Axonkolaterale nachzuweisen war. Wiederum fand sich uNOS-IR sowohl nahe anterioren (B) als auch posterioren Verzweigungen (Pfeilspitze in D). Hier nicht gezeigte Aufnahmen für Larve 3 führten zu dem gleichen Resultat.

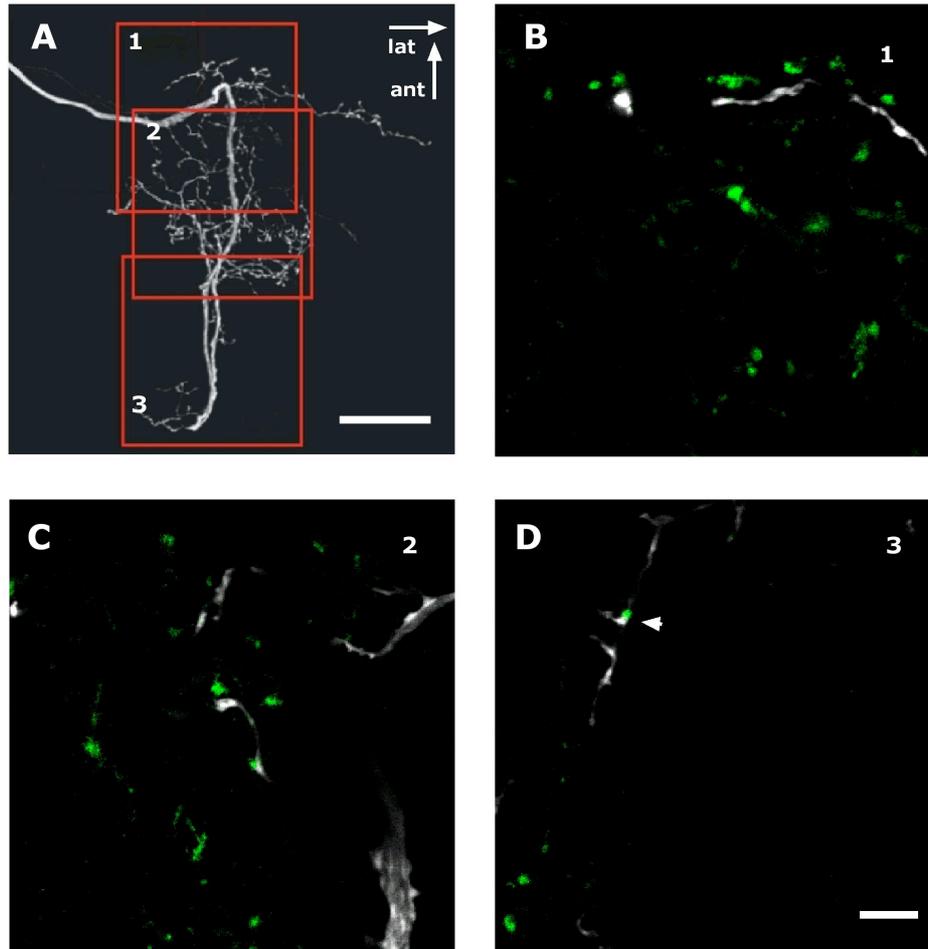


Abb. 3.10: *u-NOS-IR* in Submikrometer-Umgebung ventraler Axonkolaterale einer windsensitiven Rezeptorzelle in Larve 4. **A:** Übersichtsdarstellung der prothorakalen Projektionen der Rezeptorzelle zur Orientierung der Einzelschnitte. **B-D:** Optische Einzelschnitte aus Positionen der roten Quadrate der Übersichtsdarstellung (von oben nach unten). Weiß: Rezeptoraxone. Grün: *uNOS-IR*. Objektiv: 40x-Öl. Skalierungsbalken in A: 50  $\mu\text{m}$ . Skalierungsbalken in D für B-D: 10  $\mu\text{m}$ . Markierungen wie oben.

### 3.2.2 NO moduliert die Antworteigenschaften des A4I1 – Physiologische Befunde

Um über die anatomischen Hinweise hinaus eine Funktion von NO im A4I1-System nachzuweisen, wurden an einem isolierten Kutikula-Ganglienpräparat physiologische Experimente vorgenommen. Das die filiformen Haare tragende Prosternum, sowie sensorische Neurone und das Prothorakalganglion, als Sitz dendritischer Areale des A4I1, waren die wesentlichen Komponenten des Präparates (vgl. 2.2). Zwei verschiedene, für die NO-Signalkaskade spezifisch wirksame Pharmaka wurden eingesetzt (DEA; ODQ).

#### 3.2.2.1 Der NO-Donor DEA ruft eine Verringerung AP-Antwort des A4I1 hervor

Gibt es überhaupt einen NO-Effekt auf die Windantwort des A4I1, und wenn ja, in welcher Weise ändert NO die Reizantwort? Diese beiden Fragen waren Gegenstand der ersten Gruppe physiologischer Versuche. Um direkte NO-Effekte nachzuweisen wurde der NO-Donor DEA (Diethylammonium(Z)-1-(N,N-diethylamino) diazen-1-ium-1,2-diolat) verwendet.

Über das Haarrezeptorfeld des Prosternums wurden fortlaufend Windpulse konstanter Periode und Dauer geleitet. Die A4I1-Antwort, gemessen als Zahl der APs je Puls, wurde meist extrazellulär, teils aber auch intrazellulär aufgezeichnet. Um Habituationseffekte auszuschließen, wurde der Duty-Cycle<sup>6</sup> der Pulsreihe vor Versuchsbeginn so eingestellt, dass in einem fünfminütigen Kontrollzeitraum keine Verringerung der Antwort festzustellen war. Im Regelfall wurden 300 ms lange Pulse mit einer Frequenz von etwa 0,7 Hz ausgegeben.

Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 600s (vgl. Abb 3.11 A): Nach der einleitenden Ringer-Perfusion von 120s, wurde für 240 s der NO-Donor DEA (300  $\mu$ M in Ringer) in das Bad eingespült. Während der sich anschließenden Auswaschung der DEA-Lösung wurde die A4I1-Antwort noch für weitere 240s aufgezeichnet.

Abbildung 3.11 B zeigt exemplarisch die durch DEA hervorgerufene Veränderung der A4I1-Antwort: Gegenüber dem vorangehenden Kontrollzeitraum (*Pre*), beantwortete das A4I1 unter DEA Windpulse mit weniger Aktionspotentialen. Die typische Antwort des A4I1 auf Windpulse ist phasisch-tonisch, ein kurzer hochfrequenter AP-Burst am Beginn wird gefolgt von einem tonischen, zweiten Teil. Dieses duale Antwortmuster blieb unbeeinflusst von der DEA-Applikation, die AP-Rate erscheint in beiden Teilen etwa gleichermaßen verringert.

---

<sup>6</sup> Verhältnis von Pulsdauer zur Pulsperiode

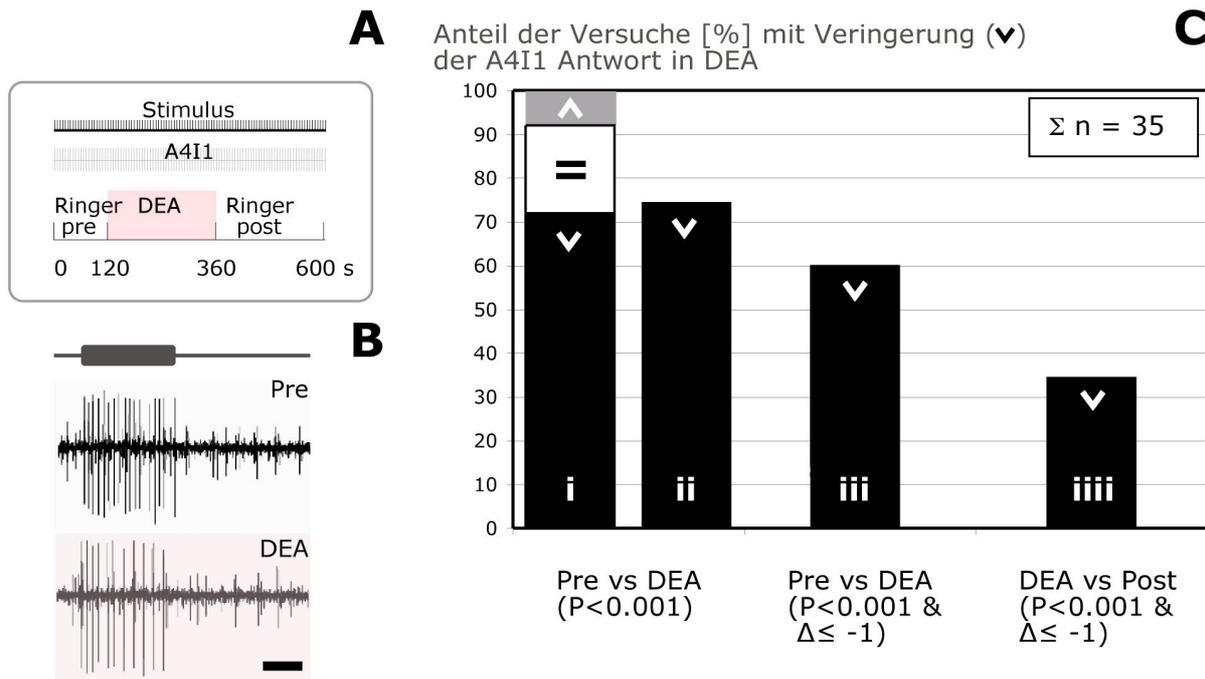


Abb. 3.11: Der NO-Donor DEA verminderte die Spike-Antwort des A4I1 auf Windpulse. **A** Schema für Reizregime und DEA-Applikation. Windpulse (in der Regel 0,7 Hz bei 300 ms Dauer) wurden vom A4I1 jeweils mit Bursts beantwortet. **B** Exemplarische extrazelluläre Antworten des A4I1 zeigen Verringerung der Spikezahl während der DEA-Applikation ([DEA] = 300  $\mu$ M; rosa unterlegt) gegenüber dem vorangehenden Kontrollzeitraum (Pre). Skalierungsbalken = 100 ms. **C** Da eine deutliche DEA vermittelte Hemmung nicht bei allen Präparaten zu beobachten war, wird der Anteil von Versuchen mit DEA-Effekt gezeigt. Für die Festlegung, ob ein Effekt auftrat, wurden verschieden scharfe Kriterien angewendet (vgl. Text). Bei mehr als 70 % (i, ii), bzw. 60 % (iii) der getesteten Präparate verringerte sich die A4I1-Antwort bei DEA Einwaschung signifikant ([DEA] = 300  $\mu$ M). Pre vs DEA: Wilcoxon-Tests für die APs/Puls in DEA gegenüber Pre. i: Getestet gegeneinander wurden alle APs/Puls aus Pre und der letzten 120 s aus DEA.  $\wedge/\neq/v$  bedeuten: APs/Puls signifikant erhöht/ ohne Unterschied/ signifikant verringert in DEA gegenüber Pre. ii: Getestet gegeneinander wurden jeweils nur die Mittel der 20 Antworten mit den wenigsten APs/Puls aus beiden Zeiträumen. Beide Testverfahren führten zu vergleichbaren Resultaten. Pre vs DEA (iii): wie ii jedoch mit schärferem Kriterium für Hemmung. Zusätzlich für die Festlegung „Verringerung“ aus ii musste in iii auch die mittlere AP-Zahl/Puls in DEA gegenüber Pre um mindestens 1 AP verringert worden sein. DEA vs Post (iiii): Nur etwa 1/3 der Präparate zeigte eine Verringerung der AP-Zahl/Puls nach DEA-Auswaschung. Die gleichen Kriterien wie iii wurden hier auf DEA und Post angewendet.

Eine durch DEA hervorgerufene Antwortverringering war sowohl bei isolierten Prosternum-Ganglien-Präparaten als auch in Vorversuchen am ventral geöffneten Tier festzustellen. Am geöffneten Tier, bei der die Ganglienhülle nicht partiell entfernt wurde, trat der Effekt allerdings deutlich seltener auf, und auch am Prosternum-Ganglien-Präparat bewirkte DEA nicht in allen Fällen eine Verringerung. Das deutet darauf hin, dass die Diffusion von DEA

---

bzw. des hoch reaktiven NO selbst ein kritischer Parameter für pharmakologische Untersuchungen am weitgehend intakten Nervengewebe von *Locusta* ist (vgl. 6.2). Abbildung 3.11 C zeigt deshalb den Anteil von Versuchen mit Antwortverringering unter DEA [300 µM] an der Gesamtzahl der 35 getesteten Präparate.

Für i (Abb. 3.11 C) wurden alle APs/Puls aus dem Kontrollzeitraum (*Pre*, Dauer 120 s) und die Antworten der letzten 120 s aus *DEA* betrachtet<sup>7</sup>. Bei einer deutlichen Mehrzahl der Versuche von 71% verringerten sich die AP-Zahlen während der Applikation des NO-Donors signifikant ( $P < 0,001$ , Wilcoxon-Test). Bei 20% der Präparate zeigte sich dagegen kein signifikanter Effekt, bei nur 9% stiegen die AP-Antworten in *DEA*. Dieser Anstieg war jedoch sehr gering und immer kleiner als 1 AP/Puls.

**Zeitverläufe der A4I1-Antwort bei DEA-Appikation:** Bei den Präparaten, die eine durch DEA vermittelte Antwortverringering zeigten, war der zeitliche Verlauf während beginnender Applikation des NO-Donors ähnlich: etwa 80 s nach Einwaschen begann die Zahl der APs/Puls zu sinken, und diese Verringerung setzte sich während der Applikation fort. Während des Auswaschvorgangs waren allerdings Unterschiede im Zeitverlauf festzustellen.

Die globale Applikation von exogenem NO auf einen Gewebeverband kann verschiedene, evtl. gegensätzliche Wirkungen in einem Schaltkreis hervorrufen. Um das Wirkungsspektrum umfassend zu protokollieren, wurde der Datensatz deshalb hinsichtlich prägnanter Effekte im Zeitverlauf untersucht. Verschiedene Zeitverläufe wurden in Klassen eingeteilt und deren Anteil an der Gesamtzahl der Experimente immer angemerkt (Abb. 3.11 C & Tabelle 3.1). Weil das Betrachten von 120s dauernden Zeitfenstern (i in Abb. 3.11 C) kurzfristige Veränderungen unterrepräsentieren würde, werden im Folgenden je Zeitfenster (*Pre*, *DEA*, *Post* in Abb. 3.11 A) nur die 20 Antworten mit den wenigsten APs/Puls betrachtet. Um das Verfahren zu legitimieren, zeigen i und ii in Abb. 3.11 C die Testergebnisse auf Verringerung unter DEA für beide Methoden (beide mit Wilcoxon-Test): Das Betrachten von 120s Zeitfenstern (i) und der jeweils nur minimalen 20 Antworten (ii) pro Zeitraum führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Eine signifikante Verringerung der AP-Zahl/Puls ( $P < 0,001$ ) wurde in 71 (i) bzw. 74% (ii) der Experimente festgestellt.

---

<sup>7</sup> Die durch den Einwaschvorgang in das Bad bedingte Latenz betrug lediglich 20s. Der durch das Einwaschen bedingten Latenz wurde Rechnung getragen, indem nur Antworten ab 20s nach Fluss-Umstellung berücksichtigt wurden. *Pre* 0...120s/ *DEA* 240...360 s/ *Post* 380...500s. Vgl. Abb. 3.9 A

Tabelle 3.1 zeigt für Abbildungen 3.12 und 3.13 die gebildeten Kategorien und die Experimentenzahlen, welche die jeweilige Wirkung zeigten. Eine signifikante Antwortverringering in *DEA* gegenüber dem Kontrollzeitraum (*Pre*) war in 26 der getesteten 35 Präparate festzustellen (ii in Abb. 3.9 C). Wird als weitere Einschränkung gefordert, dass eine Verringerung um mindestens 1 Aktionspotential eintreten muss<sup>8</sup>, waren 21 Experimente “DEA-Effekt-positiv“ (60% in Abb. 3.11 C, iii).

	<b>DEA Effekt ii (P&lt;0,001)</b>	<b>DEA Effekt iii (P&lt;0,001 &amp; Δ Min APs/Puls ≤ -1)</b>		<b>Post DEA Effekt iiii (P&lt;0,001 &amp; Δ Min APs/Puls ≤ -1)</b>
<b>gesamt</b>	n=26	n=21		
		<b>rev</b>	<b>irrev</b>	n=12
		n=11	n=10	

Tabelle 3.1: Übersicht über die tatsächliche Anzahl der Versuche, die unter Anwendung verschiedener Kriterien einen DEA-Effekt zeigten. Alle Versuche bei DEA [300 μM]. ii: Verglichen wurden die 20 minimalen AP-Zahlen/Puls aus den Zeiträumen *DEA* und *Pre*. iii: Zusätzliches Kriterium gegenüber ii war, dass die 20 minimalen APs/Puls im Mittel um mindestens 1 verringert waren in *DEA* gegenüber *Pre*. iiiii: Wie Effekt 2, jedoch für die Zeiträume *Post* vs. *DEA*.

Schon die visuelle Beurteilung der AP-Antworten über die Zeit offenbarte zwei verschiedene Muster der durch den NO-Donor hervorgerufenen Hemmung:

- (1) In einem Teil der Versuche führte die Auswaschung des NO-Donors zu einem Anstieg der vorher durch DEA verringerten AP-Antwort des A4I1. Die Hemmung war also eher reversibel.
- (2) In anderen Experimenten blieben die Spikezahlen auch nach der Auswaschung etwa auf dem durch DEA hervorgerufenen abgesenkten Niveau. Die Hemmung wurde also beibehalten.

<sup>8</sup> Da es nicht möglich ist zu entscheiden, welcher Antwortunterschied etwa für eine dem A4I1 nachgeschaltete Zelle detektierbar ist, welcher NO-Effekt mithin im Schaltkreis manifest würde, wurden verschiedene Kriterien für eine Antwortverringering während *DEA* getestet und das schärfere Kriterium (Wilcoxon-Test & Differenz der APs/Puls aus *DEA* vs *Pre* < -1) für die folgenden Grafiken verwendet.

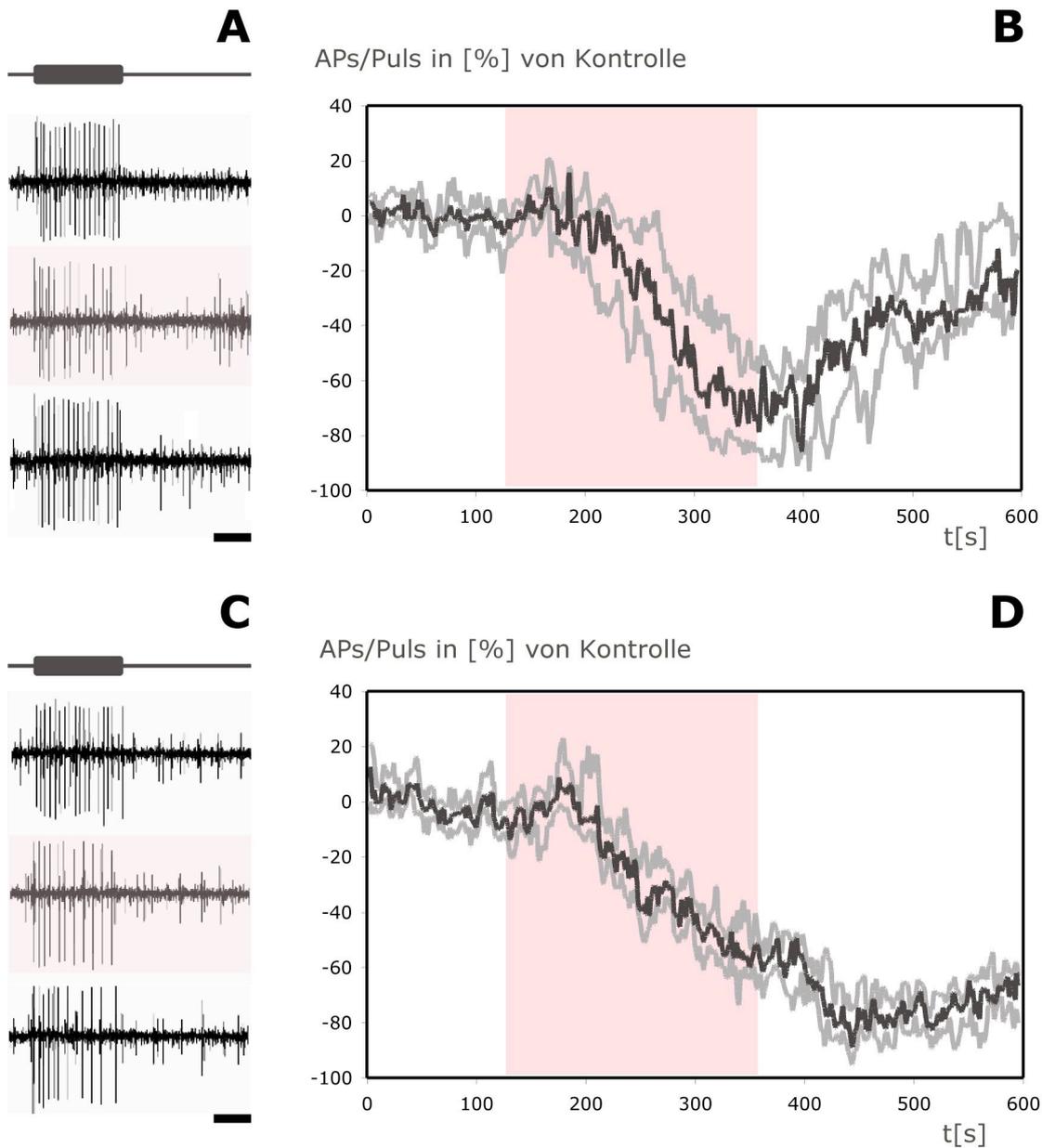


Abbildung 3.12: Verschiedene Zeitverläufe DEA-vermittelter Inhibition. **A&C** Exemplarische extrazelluläre Ableitungen aus den Intervallen (Pre), (DEA)=rosa und (Post) für als reversibel (A) bzw. irreversibel (C) gewertete Experimente (vgl. Text; Skalierungsbalken = 100 ms). **B&C** Gezeigt sind der Verlauf von Medianen (schwarz) sowie oberen und unteren Quartilen (grau) der AP-Antworten je Puls (vgl. <sup>9</sup> auf S. 44). Altrosa markiert den Zeitraum der DEA-Applikation. Für B wurden n=11, für D n=10 Tests zusammengefasst

Für die Darstellung dieser Unterschiede in Abbildung 3.12 wurden alle Experimente mit DEA-Effekt (n=21; iii in Tabelle 3.1) zwei Klassen zugeordnet und deren Daten anschließend getrennt prozessiert. Die AP-Zahlen bei maximal erreichter Hemmung wurden als -100% definiert, um für Unterschiede der absoluten AP-Zahlen zu normieren (s.u.). Der Klasse „Reversibel“ wurden jene Experimente zugeordnet, bei denen die Antwort während des

---

Auswaschens um wenigstens 40% anstieg (n=11; vgl. Abb. 3.11 B; APs/Puls [%]: -60% bis 0%). Der Klasse „Irreversibel“ wurden Experimente zugeordnet, deren Antwort während des Auswaschens nicht um wenigstens 40 % anstieg (n=10; Abb. 3.9 D; APs/Puls [%]: -100% bis -60%).

Abbildungen 3.12 B & D zeigen die normierten Zeitverläufe der Hemmung für beide Klassen<sup>9</sup>. Dargestellt sind Mediane und Quartile der Antworten über die Zeit als APs/Puls in [%]. Sowohl bei reversiblen als auch bei irreversiblen Verlauf setzte die Inhibition etwa 80s nach Beginn des Einwaschens von DEA ein. Bemerkenswert war eine vorübergehende, geringe Erhöhung der AP-Zahlen vor Beginn der Inhibition (vgl. Abb. 3.12 D). Nach etwa 100-120 Sekunden anhaltender Verringerung der A4I1-Antwort erreichten beide Zeitverläufe das Maximum der Hemmung, bei reversiblen Verläufen kurz vor (vgl. Abb. 3.12 B), bei irreversiblen Verläufen etwa zu Ende der DEA-Applikation (vgl. Abb. 3.12 D).

Die Betrachtung der Zeitverläufe zeigt ein Phänomen, welches besonders bei irreversiblen Verlauf deutlich wird: nach einem etwa 30 s andauerndem lokalen Antwortminimum kam es während des Auswaschens zu einer erneuten Verringerung der A4I1-Antwort (Abb. 3.12 D). Die Entfernung des NO-Donors bewirkte in 12 der 35 Tiere (34 %; iiiii in Abb. 3.9 C; Vergleich von *DEA* vs. *Post*) eine Verringerung der A4I1-Antwort.

***Vermittelt NO einander entgegen gerichtete Effekte?*** Markant war das komplexe Wirkschema des NO-Donors, der also möglicherweise nicht nur bei Einwaschung, sondern auch bei Auswaschung eine Hemmung vermittelte (vgl. Abb. 3.12 D und Abb. 3.13).

Das Balkendiagramm (iiii) in Abbildung 3.11 C zeigt, dass - vergleicht man die Zeiträume *DEA* und *Post* – sich in einem Drittel aller getesteten Präparate die A4I1-Antwort auch bei DEA-Auswaschung signifikant verringerte. Dies ließe sich auch als Folge verzögerter Konzentrationsänderungen in der Badlösung erklären – als Konsequenz könnte die DEA-Inhibition in den Zeitraum *Post* hinüberreichen und zu einer auch im letzten Intervall fortdauernden Antwortverringern führen. Allerdings unterstützen die Darstellungen in Abb. 3.13 eine alternative Hypothese.

---

<sup>9</sup> Um trotz deutlicher Unterschiede der Inhibitionsamplitude die Zeitverläufe verschiedener Experimente zusammenfassen zu können, erwies sich eine Normierung auf maximale Inhibition als sinnvoll: Der Wert „0%“ entspricht dem Mittelwert der je Puls gebildeten APs im Kontrollzeitraum (0...120s). „-100%“ entspricht der Antwort mit den wenigsten APs/Puls des gesamten, sich daran anschließenden Zeitraumes (120...600s).

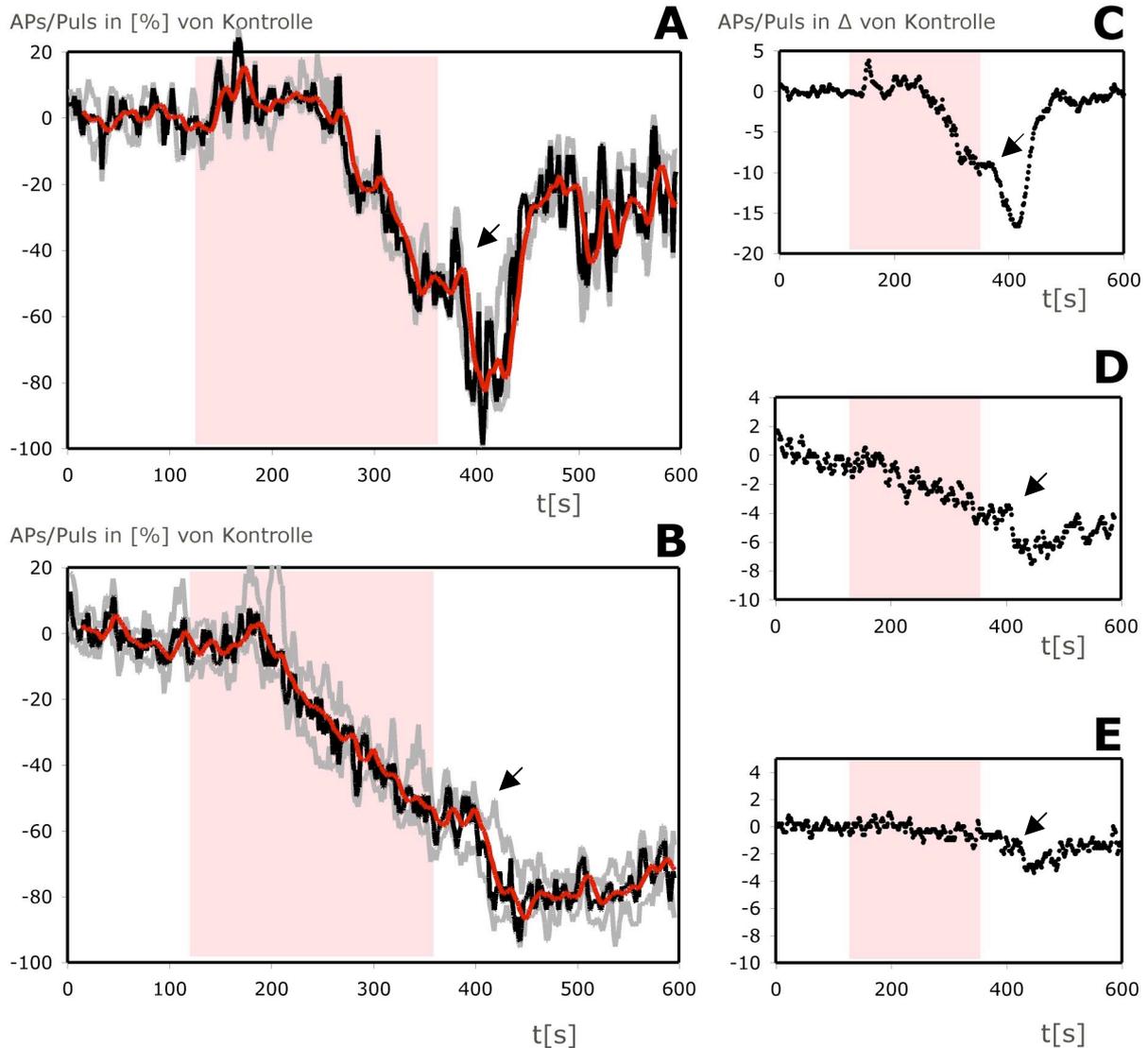


Abb. 3.13: Bei DEA Auswaschung einsetzende Inhibition (Pfeilspitzen). **A, B** Zeitverläufe der normierten AP-Antworten für alle Experimente mit signifikanter Hemmung während der DEA-Applikation **UND** signifikanter Verringerung der Antwort während des Auswaschens. **A**: reversibel,  $n=3$ . **B**: irreversibel,  $n=7$ . Gezeigt sind Mediane (schwarz), Quartile (grau) und zur besseren Visualisierung in rot auch die gleitenden Mittel jeweils über 9 Median-Werte. **C, D, E** zeigen Einzelbeispiele für im Auswaschen einsetzende Inhibitionen bei als reversibel (**C**), irreversibel (**D**) und *kein* Effekt (**E**) während DEA-Applikation gewerteten Tests.

Abbildungen 3.13 C, D & E zeigen beispielhafte Antwortkurven für die drei Fälle aus Tabelle 3.1.: *reversibler* und *irreversibler*, sowie *kein* DEA-Effekt. Allen drei Darstellungen ist gemein, dass 30-40 Sekunden nach Beginn des Auswaschens das Gefälle der Antwortkurven zunimmt (Pfeilspitzen in C & D), bzw. erst eine Hemmung in diesem Zeitraum einsetzt (E). Abbildungen 3.13 A & B zeigen das Phänomen gleichermaßen, jedoch zusammengefasst für eine größere Zahl von Tests. Hierfür wurden solche Experimente aus Abbildung 3.10 B und D zusammengefasst, die neben der durch DEA vermittelten Inhibition auch eine signifikante Antwort-Verringerung beim Auswaschen zeigten (Dies entspricht der Schnittmenge der

Elemente von iii und iiiii in Abb. 3.11 C). Diese Post-DEA-Inhibition trat nur bei 27 % (n = 3/11) der als reversibel klassifizierten, jedoch bei 70 % der als irreversibel klassifizierten Experimente auf. Für beide Fälle aber wird deutlich, dass die Antwortkurven schon lokale Minima – Tiefplateaus - erreicht hatten, bevor während der Auswaschung eine erneute Hemmung einsetzte (Pfeilspitzen in Abb. 3.13 A & B).

Vorläufig lassen sich diese Ergebnisse wie folgt zusammenfassen: Der NO-Donor DEA hemmt die Antwort des A4I1 auf Windpulse. Jedoch deuten die durch NO-Donor Auswaschung vermittelte sekundäre Inhibition, auf gleichzeitig oder verzögert wirkende exzitatorische oder kompensatorische NO-Effekte hin, welche durch die primäre Hemmung möglicherweise maskiert wurden (vgl. 3.3).

**Die Amplitude der Hemmung:** Auch die Stärke der durch DEA vermittelten Hemmung war unterschiedlich. Dieses Kapitel soll zeigen, dass dennoch in der Mehrzahl der Versuche<sup>10</sup> die Hemmung von physiologisch relevanter Größenordnung war. Deshalb zeigt Abbildung 3.14 neben absoluten Zahlen für eine Verringerung der pro Puls gebildeten APs (vgl. Abb. 3.14A) auch die prozentuale Verringerung der AP-Antwort (vgl. Abb. 3.14 B).

Dem stufenweisen, zweigeteilten Verlauf der Inhibition wird Rechnung getragen, indem die Amplitude ausschließlich für den Zeitraum der DEA-Applikation (vgl. Abb. 3.14 A *DEA* vs. *Pre*, hellgrau), daneben aber auch für die gesamte Dauer aus *DEA* UND *Post* berechnet wurde (vgl. Abb. 3.11 A *DEA* und *Post* vs. *Pre*, dunkelgrau). Letzteres ist als Summe der oben beschrieben zwei sukzessiven Inhibitionen zu verstehen und stellt damit ein Maß für die Gesamtheit DEA vermittelter Effekte dar.

Fasst man alle 21 Tests mit signifikanter Antwortverringerng aus Tabelle 3.1 (ii) zusammen, verringerte sich die AP-Zahl während DEA Einwaschens im Mittel um 3,0 Aktionspotentiale (Mittelwert über hellgrauem Boxplot in Abb. 3.14 A). Betrachtet man den Gesamtzeitraum aus *DEA* und *Post* betrug der Rückgang sogar 4,4 APs (Mittelwert über dunkelgrauem Boxplot). Betrachtet man die Mediane der prozentualen Verringerung (hellgrau in Abb. 3.14 B), zeigt sich eine Hemmung der AP-Antworten in *DEA* um ca. 15%, in *DEA* UND *Post* gegenüber *Pre* um fast 27 % (dunkelgrau in Abb. 3.14 B). Aussagekräftig hinsichtlich der größten erreichten Hemmungen sind hier auch die unteren Quartilen: In jeweils einem Viertel

---

<sup>10</sup> Aufgrund der Auswahl wird nicht erfragt, wie groß der DEA Effekt in der Gesamtzahl der Versuche war, sondern wird die Amplitude der Hemmung nur in den Experimenten untersucht, für deren Zeitverläufe ein erkennbarer DEA-Effekt gezeigt wurde.

der betrachteten Experimente wurde die AP-Zahl um mehr als 25% (*DEA*), bzw. sogar 41% (*DEA* UND *Post* vs. *Pre*) abgesenkt.

In beiden Abbildungen fällt auf, dass in *DEA* die stärksten Hemmungen bei reversiblen Verläufen gemessen wurden (vgl. Abb. 3.14 B, hellgraue Boxplots für rev und irrev). Betrachtet man allerdings den Gesamtzeitraum aus *DEA* UND *Post* (dunkelgraue Boxplots), so ist der Unterschied zwischen reversiblen und irreversiblen Verläufen geringer, oder sogar umgekehrt (vgl. Abb. 3.14 A, dunkelgraue Balken für rev und irrev). Bemerkenswert war, dass sich bei einem Viertel der reversiblen Verläufe die Antwort sogar um mehr als 50 % verringerte (unteres Quartil in Abb. 3.14 B, reversibel).

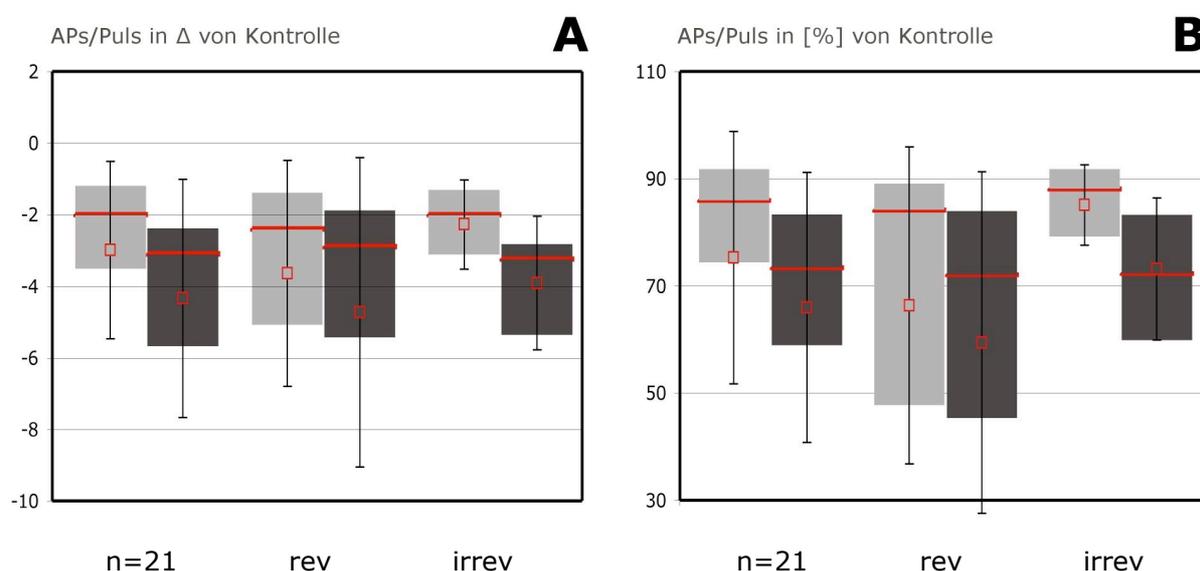


Abb. 3.14: Amplitude der Inhibition bei Versuchen mit signifikanter Hemmung unter  $[DEA]=300\mu M$  (Abb 3.11 C, iii, n=21), sowie bei reversiblen (n=11) und irreversiblen Verläufen (n=10). Hellgrau markiert AP-Differenzen (A) bzw. %-Verhältnisse (B) aus den Intervallen *Pre* versus *DEA*. Dunkelgrau markiert Vergleiche der Intervalle *Pre* versus *DEA* UND *Post*. Zum besseren Vergleich von A und B zeigen beide Abbildungen jeweils Mediane mit Quartilen (rote Querstriche und Box-Plots) und Mittelwerte mit Standardabweichungen (rote Quadrate mit Fehlerbalken).

***DEA-Effekte bei geringeren Konzentrationen:*** In Vorversuchen wurden DEA-Konzentrationen von 3 bis 600  $\mu M$  am geöffneten Tier und später am isolierten Prosterneum-Ganglien-Präparat getestet um eine effektive Konzentration für die Betrachtung der Zeitverläufe zu bestimmen. Bei sukzessiver Erhöhung der Konzentrationen bis einschließlich 50  $\mu M$  [DEA] wurde keine Hemmung festgestellt. Eine Konzentration von 100  $\mu M$  DEA dagegen führte in einigen Fällen ebenfalls zu einer Hemmung der A411-Antwort, ähnlich wie oben beschrieben. Die bereits für 300  $\mu M$  DEA-Lösungen gezeigten

Antwortunterschiede lassen einfache Dosis-Wirkungs-Kurven bei der gewählten Applikationsart des NO-Donors wenig sinnvoll erscheinen (vgl. Diskussion). Deshalb sollen hier lediglich zwei Beispiele für die Konzentration von  $100\ \mu\text{M}$  gezeigt werden (Abb. 3.11). Man beachte, dass in einem der beiden Fälle zu Beginn der Applikation die Zahl der pro Puls gebildeten Aktionspotentiale vorübergehend anstieg (Pfeilspitze in Abb. 3.15) und erst danach die Inhibition dominant wurde (vgl. auch Abb. 3.13 C).

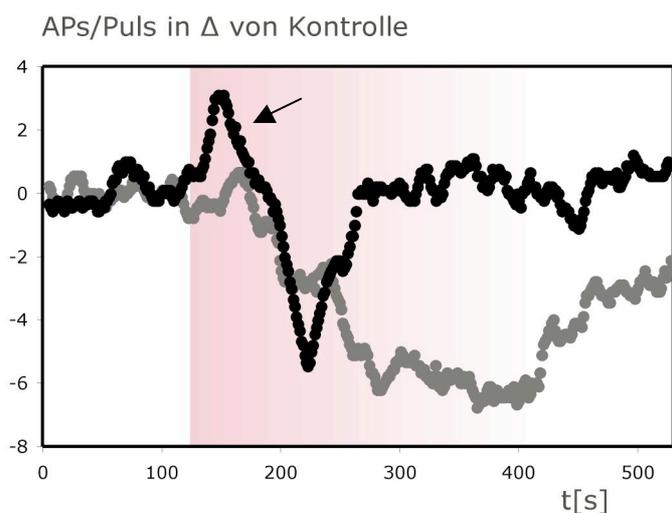


Abb. 3.15: Zwei Beispiele für NO vermittelte Inhibition bei einer Konzentration von  $100\ \mu\text{M}$  DEA. Beginn der Applikation in dunklem Rosa. DEA wurde hier mit einer Pipette auf das Ganglion (dunkel rosa) appliziert und im Bad belassen. Mögliches Abdiffundieren von DEA von der Applikationsstelle ist schematisch durch Ausbleichen dargestellt.

**Intrazelluläre Ableitungen im A4I1 - Wo wirkt DEA?** Als ein durch DEA beeinflusster Parameter ist bislang lediglich die AP-Zahl der A4I1-Antwort besprochen worden. Zum einen ist dies methodisch bedingt, da wegen der langen Dauer des Einzelexperiments und der benötigten Zahl von Tests extrazelluläres Ableiten am Konnektiv die Methode der Wahl darstellte. Ein Nachteil dieses Vorgehens ist jedoch, dass man solcherart das System gewissermaßen nur an der Ausgangsseite des A4I1 betrachtet. Stellt man hier eine Hemmung fest, so ist nicht zu entscheiden, auf welcher Ebene DEA die Hemmung bewirkte: ob NO auf Rezeptor- oder A4I1-Ebene angreift, oder ob es über unbekannte, zwischen Rezeptor und A4I1 eingeschaltete Neurone wirkt. Um die Möglichkeiten einzugrenzen und eventuelle Wirkmechanismen offenzulegen, wurde das A4I1 mit scharfen Elektroden nahe seiner prothorakalen spikegenerierenden Zone intrazellulär abgeleitet. In den Ableitungen waren EPSPs (max. 5-10 mV) und APs ( $> 60\ \text{mV}$ ) gleichermaßen zu detektieren. Als entscheidender Parameter wurde das Membranpotential während der Veränderung der Badlösung

aufgezeichnet. In drei Fällen gelang es, Ableitungen genügender Güte und ausreichender Dauer zu erlangen (Abb. 3.16<sup>11</sup>).

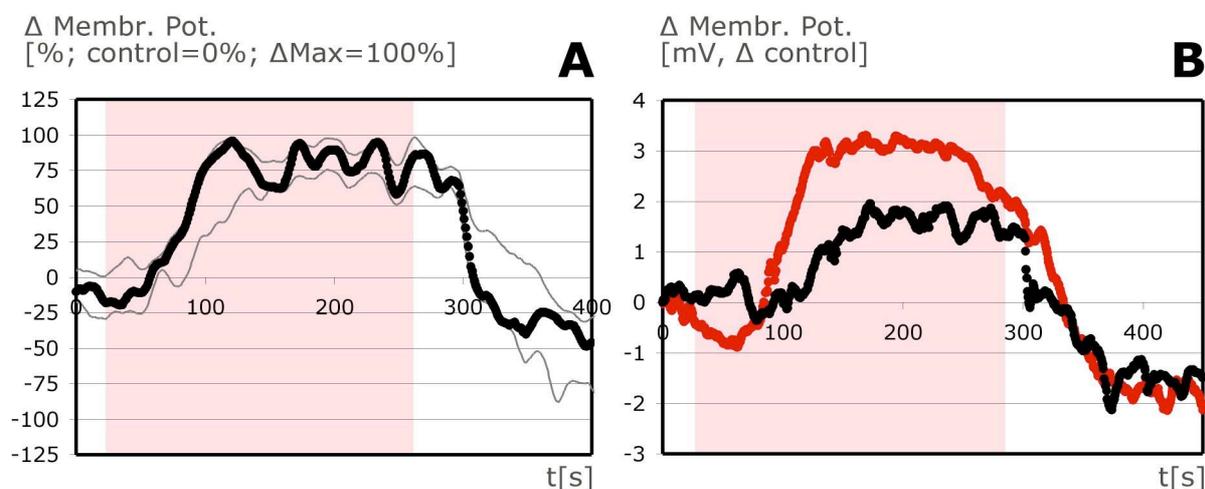


Abb. 3.16: DEA führte eine Depolarisierung im A411 herbei. **A** Mediane (schwarz) und Quartile (grau) normierter Potentialverläufe während DEA-Applikation (rosa). Normierung der Potentiale: Potential in *Pre* = 0%; maximale Differenz in *DEA* zu *Pre* = 100%). Zahl der Präparate: n=3. **B** Membranpotentialverläufe unter Hyperpolarisierung (rot) und ohne Stromapplikation (schwarz) für ein Tier. Normierte Potentiale als x-Achse. Um die unter DEA gemessenen Membranpotentialänderungen beurteilen zu können, zeigt **Bi** AP-Antworten auf Windpulse im Präparat aus B vor Hyperpolarisation (verschiedene Spuren in Superposition). Die AP-Amplituden betragen > 80 mV.

Abbildung 3.16 A zeigt die zusammengefassten Membranpotential-Verläufe dreier normierter Spuren, wiederum bezogen auf maximale Amplituden. Nach Einwaschung des 300  $\mu$ M-en NO-Donors stieg das Membranpotential an, so lange bis ca. 100 s nach Testbeginn eine maximale Depolarisierung erreicht war. Da der Einwaschvorgang bei 20s begann und die durch die Perfusionsschläuche bedingte Latenz weitere 20s betrug, erreichte der Potentialverlauf sein Maximum mithin schon 60 s nachdem die DEA-Flüssigkeitssäule in die Badlösung einzufließen begann (vgl. Abb. 3.11 A). Hervorzuheben ist hier nicht nur das schnelle Erreichen des Maximums, sondern vor allem die Tatsache, dass für mehr als 150 s (vgl. Abb. 3.16: t [100...270 s]), also für weit mehr als die halbe Dauer der DEA-Applikation

<sup>11</sup> Verschiedene Kontrollen und Maßnahmen zum Ausschluß anderer Einflussfaktoren wurden vorgenommen: Die Temperatur der verschiedenen Badlösungen wurde vor Versuchsbeginn auf exakt gleiche Werte eingestellt. Da die DEA-Stammlösungen alkalisch sind, wurden auch die durch Verdünnung resultierenden NaOH-Lösungen ohne DEA getestet. Ein pH-bedingter Effekt auf das Membranpotential konnte dadurch ebenfalls ausgeschlossen werden.

das erreichte Potential auf einem etwa konstant hohen Plateau gehalten wurde, deutlich verschieden zu der sich über die meiste Zeit kontinuierlich verringernden und danach nur für kurze Zeit gleich gehaltenen AP-Antwort in extrazellulären Ableitungen (vgl. Abb. 3.12).

Der schließlich bei DEA-Auswaschung einsetzende Abfall des Membranpotentials bewirkte hier einen etwa reversiblen Potentialverlauf.

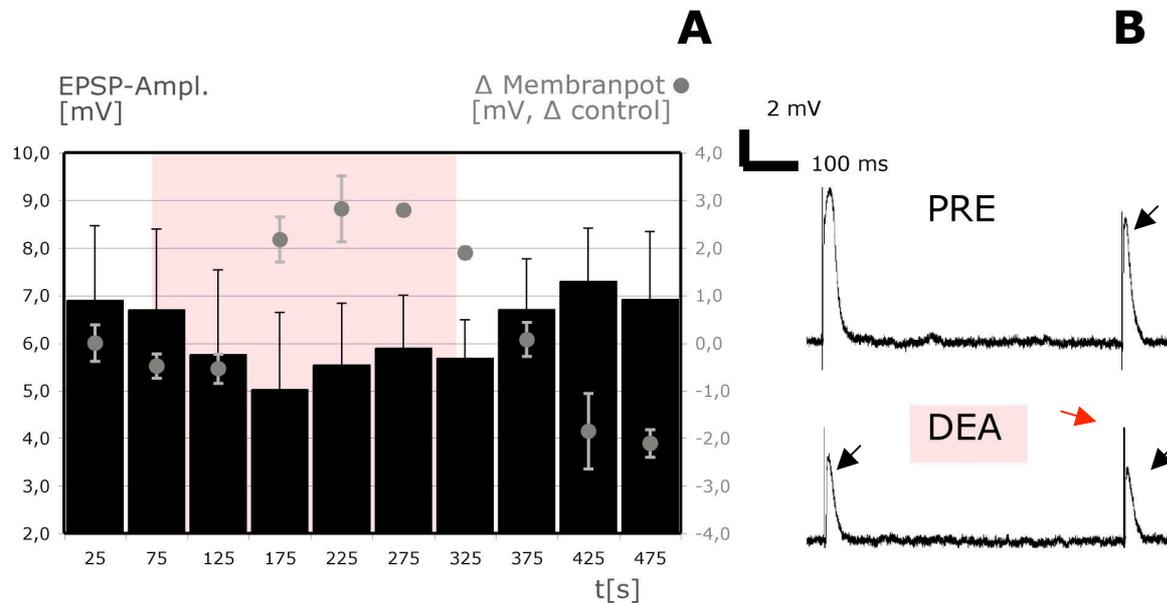


Abb. 3.17: Verringerung der EPSP-Amplitude unter DEA-Applikation [300  $\mu$ M] bei gleichzeitiger Depolarisierung. **A** Verlauf von EPSP-Amplitude (Balken) und normiertem Membranpotential (graue Kreise). Gezeigt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen über Intervalle von 50 s. Mittleres Potential für [0...50 s] wurde als 0 mV definiert. Um AP-Potentiale zu unterdrücken war die Membran durch Strominjektion leicht hyperpolarisiert. **B** Intrazelluläre Ableitbeispiele aus den Zeiträumen vor (oben) und während DEA-Applikation (unten). Schwarze Pfeile markieren EPSP-Spitzenpotentiale. Der rote Pfeil markiert den Artefakt der elektrischen Reizung.

Bemerkenswert war die Richtung der gemessenen Veränderung - während bei AP-Verläufen eine Inhibition unter DEA-Applikation dominant war, beobachtete man bei intrazellulären Ableitungen eine Depolarisierung (vgl. 3.3).

Abbildung 3.16 B zeigt die absolut gemessenen Potentialänderungen für ein Präparat, einmal ohne (schwarze Spur), einmal mit konstant hyperpolarisierender Stromapplikation (rote Spur).

Da sich die Güte einer Ableitung und mithin die Aussagekraft über die tatsächliche Größe von Potentialveränderungen am Ableitort recht verlässlich anhand der AP-Amplitude abschätzen lässt, zeigt Abbildung 3.16 (Bi) AP-Antworten des Präparats aus Abbildung 3.14 B. Die AP-Amplituden von etwa 85 mV entsprechen Angaben aus der Literatur zu axonalen Ableitungen des A4I1 im Konnektiv posterior des Prothorakalganglions (Pflüger, 1984).

---

Demgegenüber wurden die hier gezeigten Aufnahmen lediglich näher am Prothorakalganglion abgeleitet, mithin näher an der Spike-initiierenden Zone des A4I1.

Legt man die beschriebenen Anhaltspunkte zugrunde, lässt sich folgern, dass der NO-Donor DEA an einem Ableitort nahe der dendritischen Bereiche des A4I1 eine Depolarisierung induziert, und dass das gemessene Umkehrpotential des oder der betreffenden Ströme ca. 2 mV über dem Ruhemembranpotential des Interneurons liegt (Abb. 3.16 B, schwarze Spur). Da beide Potentiale recht nahe beieinander lagen, und um den Effekt deutlicher zu machen, wurde durch Strominjektion die Membran hyperolarisiert (vgl. Abb. 3.16 B, rote Spur). Der größere Abstand von Haltepotential und DEA-induziertem Umkehrpotential bewirkte hierbei eine größere Amplitude ( $> 3$  mV) der Spannungsänderung im Versuch.

Weiterführende Versuche, die durch sukzessive Depolarisation das Umkehrpotential des durch NO induzierten Stromes zeigen könnten, waren nicht erfolgreich.<sup>12</sup> Auch lediglich in einem Präparat gelang es Veränderungen der EPSP-Amplituden während des gesamten Versuchsverlaufes zu untersuchen. Durch elektrische Stimulation eines einzelnen prosternalen Haares wurden EPSPs im A4I1 ausgelöst. Dies ermöglichte den Vergleich der Verläufe von Ruhemembranpotential und EPSP-Amplitude, dargestellt in Abbildung 3.17 als Mittelwerte von 50s dauernden Intervallen. Von anfänglich 7 mV verringerte sich die Höhe postsynaptischer Potentiale bei DEA-Applikation auf ca. 5 mV. Bei Auswaschung erreichten die Werte etwa wieder das Niveau wie vor DEA-Applikation, wiederum Zeichen eines etwa reversiblen Versuchsverlaufs. Wenngleich die großen Standardabweichungen anzeigen, dass die EPSP-Amplituden weitaus stärker variierten als das Ruhemembranpotential (vgl. Abb. 3.16 B), zeigt Abbildung 3.17 A dennoch, dass sich die Beträge von EPSP-Amplitude und Membranpotentialänderung unterschieden: Vergleicht man die Zeitintervalle um 25 s (Pre: 0...50s) und um 225 s (DEA: 200...250) depolarisierte das Membranpotentials um 2,8 mV, die Amplitude der EPSPs sank lediglich um 1,4 mV.

### **3.2.2.1 NO als Modulator der Habituation**

NO ist eine Schlüsselsubstanz bei der Modulation von Signalkaskaden und Prozessen funktioneller Plastizität. So ist NO beteiligt an der Adaptation visueller Schaltkreise (Retina

---

<sup>12</sup> Teils war das auf Schwierigkeiten zurückzuführen, die daher rührten, dass es nur in Ausnahmefällen gelang, die axonalen Ableitungen über 500 s Dauer so stabil zu halten, dass keine durch die am Präparat verbliebenen Muskeln oder andere Störfaktoren hervorgerufenen Potentialsprünge auftraten. Teils waren die Probleme auch durch Unzulänglichkeiten der Messapparatur bedingt, weshalb nur sehr schwer definierte Spannungssprünge zu generieren waren.

der Schildkröte: Levy et. al. 2004; Photorezeptorzellen von *Locusta*: Jones & Elphick, 1999) und vermittelt via PKA-Signalkette die Habituation des *proboscis extension reflex* (PER) in der Honigbiene (Müller & Hildebrandt, 2002). Auch aufgrund hoher Dichte von NOS und sGC in der Nähe mechanosensorischer, thorakaler Projektionsgebiete von Wanderheuschrecken wurde eine Rolle von NO bei der Modulierung der Empfindlichkeit mechanosensorischer Elemente vermutet (S. Ott et al. 2000).

Da in den bislang vorgestellten Versuchen am A4I1 mit dem NO-Donor DEA ausschließlich nicht-habituierende Reize verwendet wurden, soll im Folgenden die Beteiligung einer möglichen NO-Signalkaskade an Formen funktioneller Plastizität untersucht werden.

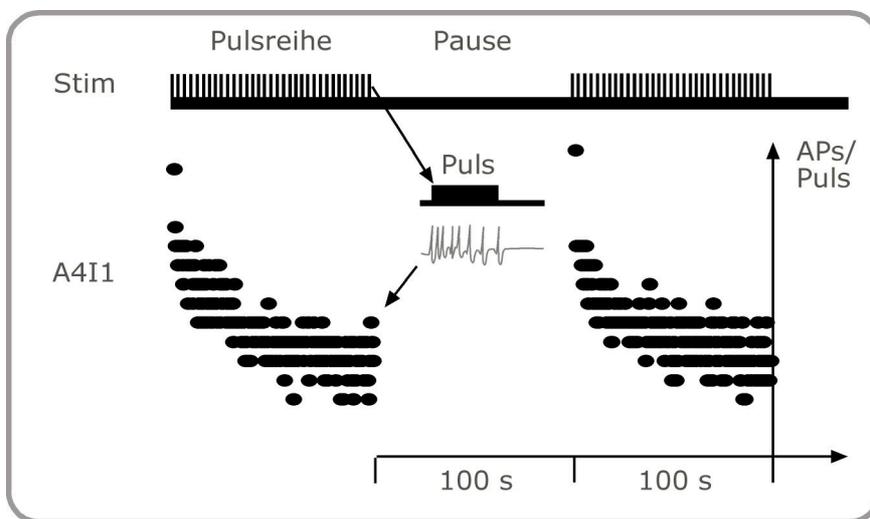


Abb. 3.18: Reizschema für Versuche mit hochfrequenter, habituierender Reizung. Windpulse von ca. 300 ms Länge wurden in schneller Folge ( $> 1$  Hz) über das Prosternum geleitet. Während 100 s dauernder Pulsreihen wurden die Antworten als AP-Zahl/Puls ausgewertet (großes Bild).

Abbildung 3.18 zeigt das verwendete Reizschema und eine exemplarische A4I1-Antwort. Wiederum wurden Windpulse über das Prosternum geleitet, dieses Mal in schnellerer Folge als es bei den DEA-Versuchen der Fall war, um hier eine Habituation zu erreichen. Die Einzelpulse waren ca. 300 ms lang und wurden mit Frequenzen von  $> 1$  Hz für 100 s ausgegeben. Die resultierenden Pulsreihen waren 100 s lang und wurden von jeweils von 100 s dauernden Pausen gefolgt. Abbildung 3.18 zeigt die Antwort des A4I1 für zwei Pulsreihen. Während der 100 s dauernden Pulsreihe verringerte sich die AP-Antwort (APs/Puls) anfänglich sehr deutlich um dann, zum Ende des 100 s Intervalls, bei etwa 80 s ein etwa konstant niedriges Antwortniveau zu erreichen. Am Beginn der folgenden Pulsreihe, nach

einer Stimuluspause von 100s, war die Antwort wieder ebenso hoch wie am Beginn der vorherigen Pulsreihe um dann erneut zu habituierten.

Bei gleichen Zeitparametern der Stimuli variierten die Antworten interindividuell. Im Vorfeld eines jeden Versuches wurde die Frequenz der Einzelpulse deshalb auf solche Werte eingestellt, dass die Antwort am Ende der 100s dauernden Pulsreihe gegenüber dessen Beginn um etwa 50 % verringert war.

Jedem Versuch wurde eine 20 min dauernde Phase starker Stimulation vorangestellt, einerseits um den physiologischen Status der Präparate anzugleichen, andererseits um durch Belastung des Systems die Synthese möglicherweise endogen gebildeten NOS zu forcieren (vgl. Diskussion). Während dieser 20 min waren die Pulsreihen nicht durch 100 s dauernde Pausen unterbrochen. Der Duty cycle (DC=Pulsdauer/Pulsperiode) der konstant ausgegebenen Einzelpulse wurde so eingestellt, dass jeder Puls nach erfolgter Habituation des A4I1 mit nur etwa 5 APs beantwortet wurde (DC etwa 0,5, d.h. 300 ms Einzelpuls/ etwa 300 ms Pause). Daraufhin wurden die Habituationsreize erneut justiert (s.o.) und die pharmakologischen Tests wurden mit den oben beschriebenen Pulsreihen durchgeführt, die jetzt durch jeweils 100 s dauernde Pausen unterbrochen waren<sup>13</sup>.

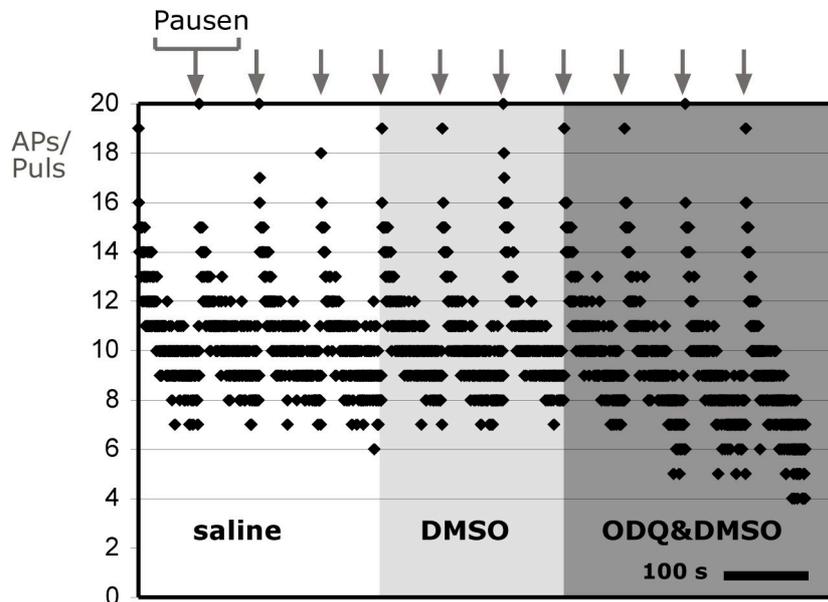


Abb. 3.19: Das Blockieren der NO-abhängigen Guanylatcyclase durch ODQ ([100  $\mu$ M]; 0,5 % DMSO in Ringer) führte zu einer stärkeren Habituation der AP-Antwort während hochfrequenter Reizung (dunkelgrau vs. hellgrau markierte Intervalle). Das Einwaschen des für ODQ-Applikation notwendigen Lösungsmittels DMSO (0,5 % in Ringer) allein hatte hingegen keinen erkennbaren Effekt (hellgrau vs. weiß). 100 s dauernde Pausen

<sup>13</sup> Um initiale Effekte auszuschließen wurde die erste 100s Pulsreihe nicht berücksichtigt.

zwischen den Pulsreihen sind über dem Diagramm markiert. Dargestellt ist der vollständige Verlauf eines Versuchsdurchganges für 1 Tier.

Abbildung 3.19 zeigt einen typischen Versuchsablauf unter Blockierung der sGC. Wurde das Ganglion mit Ringer perfundiert, sank innerhalb des 100s dauernden Habituationsintervalls die A411-Antwort von anfänglich etwa 20 APs je Puls auf mindestens etwa 8 APs am Ende einer Reihe (Streuung der APs/Puls um etwa 9-10; vgl. Abb. 3.19; saline, weiß unterlegt). Wurde als Kontrolle das Lösungsmittel DMSO (0,5 % in Ringer) perfundiert, ergaben sich keine deutlichen Veränderungen hinsichtlich Anfangs- und Endwerts der AP-Antworten (vgl. Abb. 3.19, DMSO, hellgrau unterlegt). Das zusätzliche Einwaschen des sGC-Hemmers ODQ (100  $\mu$ M/0,5%DMSO in Ringer) dagegen führte zu einer drastischen Verstärkung der Habituation. Immer noch wurden die jeweils ersten Pulse der Reihe mit 18-20 Aktionspotentialen beantwortet. Während der 100s dauernden Pulsreihen aber sank die Antwort nun auf Werte von 6, in der letzten Reihe sogar auf nur 4-5 APs/Puls (Streuung um etwa 5-6 APs/Puls).

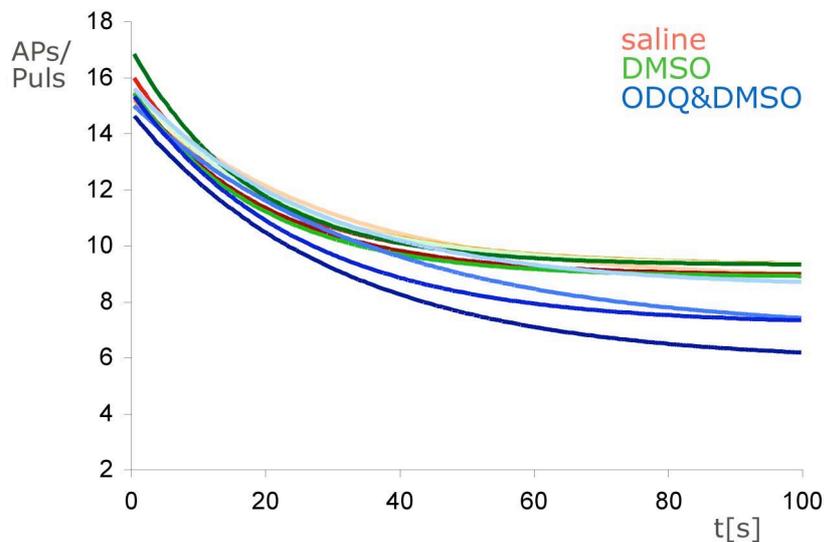


Abb. 3.20 Während ODQ-Applikation hielt der Prozess der Antwortverringering länger an und sank schließlich auf ein tieferes Niveau als in den Kontrollzeiträumen (Ringer, DMSO). Gezeigt sind exponentielle Fits für die einzelnen Stimulus-Antwort-Kurven aus Abb. 3.19. Rottöne: nur Ringer im Bad. Grüntöne: 0,5 % DMSO in Ringer. Blautöne: ODQ [100  $\mu$ M] und 0,5 % DMSO in Ringer. Jeweils die hellsten Farbtöne markieren für die erste, die dunkelsten Töne markieren für die letzte Antwortkurve je Substanz.

Zur besseren Visualisierung und wegen der Streuung der Daten in den entsprechenden Zeitfenstern zeigt Abbildung 3.20 anhand exponentieller Anpassungen den Zeitverlauf der

einzelnen Habituationszyklen für das Beispiel aus Abbildung 3.20. Antwortreihen unter Ringer (rötlich) und DMSO (grünlich) bildeten eine in sich einheitliche Gruppe. Die Antworten näherten sich asymptotisch Werten von etwa 10APs/Puls. Dem gegenüber fielen pro 100 s Zeitverlauf die Kurven während ODQ-DMSO-Einwaschung (Blautöne) deutlich stärker ab, auf Werte von 8-6 APs/Puls. Während hier die erste, hellblaue Kurve denen von Ringer und DMSO noch vergleichbar war, zeigte die dunkelblaue letzte AP-Antwortkurve während Blockergabe die stärkste Habituation.

In allen 7 solchermaßen getesteten Tieren zeigte sich ein vergleichbares Verhalten während der Blockierung der NO-Signalkette. Abbildung 3.21 zeigt die Antwort-Werte aller Tiere, sowie Mediane und Quartile der normierten, prozentualen Verringerung in ODQ/DMSO gegenüber DMSO-Kontroll-Applikation.

Abbildung 3.21 A betrachtet je Tier die Mittelwerte der habituierten AP-Antworten für die letzten 10 s einer Pulsreihe (vgl. Einschaltbild in Abb. 3.21 A, schwarze Punkte in Diagramm). Wie im vorher gezeigten Einzelbeispiel (Abb. 3.19) verringerten sich sowohl die Antwortwerte je Tier (schwarze Punkte), als auch der über alle Tiere gebildete Mediane der prozentualen habituierten AP-Antworten (rote Quadrate) bei Applikation von ODQ/DMSO (dunkelgrau unterlegt), nicht aber bei Einwaschung von DMSO allein (hellgrau unterlegt).

Bei Vergleich der in Abb. 3.21 gezeigten habituierten Antworten in Ringer ( $t = 600s$ ) mit denen in DMSO<sup>14</sup> ( $t = 1200s$ ) zeigte sich keine signifikante Verringerung (ANOVA/repeated measurement/Newman Keuls post hoc:  $P > 0,5$ ). Der Vergleich der habituierten Antworten in DMSO mit denen in ODQ/DMSO<sup>15</sup> ( $t = 1800 s$ ) enthüllt dagegen eine signifikante Verringerung der habituierten Antworten bei Blockieren der NO-Signalkette (ANOVA wie oben  $P < 0,05$ ; für Habituationsreihe bei  $t = 2000$  (ODQ) vs.  $t = 1200 s$  (DMSO)  $P < 0,005$ ).

Der Antwortmedian der letzten Habituationsreihe betrug 71 % des Kontrollwertes, d.h. bei Betrachtung aller Tiere führte ODQ im betrachteten Zeitraum nach Einwaschung zu einer etwa 30%-igen Verringerung der habituierten AP-Antwort.

Abbildung 3.21 B zeigt die theoretisch angenäherten Endwerte der Habituation für exponentielle Fits (vgl. Abb. 3.20; vgl. Einschaltbild in Abb. 3.21 B). Für alle Tiere waren die C vor ODQ-Einwaschung größer als 9. Die Mittel der tatsächlich gemessenen, habituierten

---

<sup>14</sup> 3. Habituationsreihe, beginnend bei 500s nach DMSO Einwaschung.

<sup>15</sup> 3. Habituationsreihe, beginnend bei 500s nach ODQ/DMSO Einwaschung. Ein Vergleich der jeweils ersten und zweiten Gruppen/Perfusionsmittel erschien nicht sinnvoll, da über den gesamten 2000s Zeitraum keine kontinuierliche Konzentrationsänderung erfolgte, sondern die Konzentrationen von DMSO und ODQ/DMSO durch sukzessive Sättigungskurven zu beschreiben sind.

AP-Zahlen aus Abb. 3.21 A und die theoretisch angenäherten C aus Abb. 3.21 B wiesen etwa vergleichbare Werte auf. Das bedeutet, die am Ende der 100 s Pulsreihe gemessenen AP-Zahlen unter Ringer als auch unter ODQ/DMSO stellen etwa die Antwort bei vollständiger Habituation dar, da keine weitere Verringerung über 100 s hinaus zu erwarten ist.

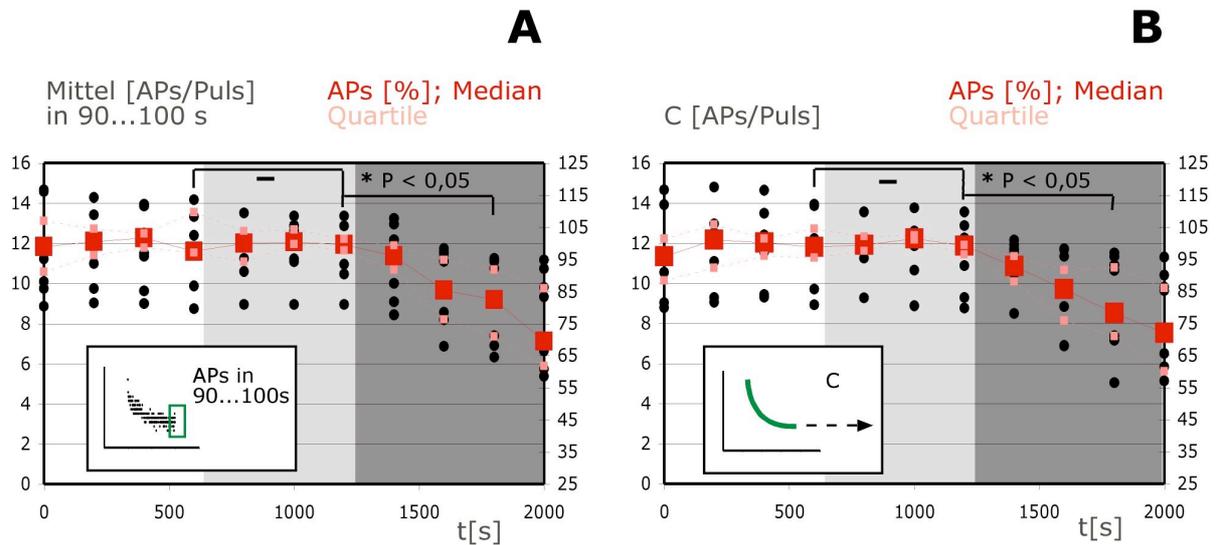


Abb. 3.21: A411-Antworten am Ende hochfrequenter Reizung waren unter ODQ-DMSO-Applikation (dunkelgrau) signifikant verringert gegenüber Habituationsreihen ohne ODQ in der Badlösung ( $n = 7$  Tiere). Das Lösungsmittel DMSO (hellgrau) bewirkte keinen signifikanten Effekt gegenüber Ringer (weiß). **A** Auswertung für Antwortmittel der letzten 10 s pro Reihe (Einschaltbild). Linke Ordinate für originale Werte aus den 7 Einzelversuchen (schwarze Kreise). Rechte Ordinate für Mediane und Quartile der normierten Werte (Werte bei letzter DMSO-Reihe wurden als 100% definiert.) **B** Wie A, jedoch wurden hier die aus den exponentiellen Fits (vgl. Abb. 3.20) abgeleiteten, bei Verlängerung der Stimulusreihen theoretisch angenäherten Antworten ausgewertet.

Die C für DMSO vs. Ringer waren nicht signifikant verschieden (ANOVA wie oben  $P > 0,5$ ). Die C unter ODQ/DMSO vs. DMSO verringerten sich dagegen signifikant (Abb. 3.21 B) um mehr als 25 % (ANOVA wie oben  $P < 0,05$  für  $t = 1800$  s (ODQ) vs.  $t = 1200$  s (DMSO);  $P < 0,01$  für Habituationsreihe bei  $t = 2000$  (ODQ) vs.  $t = 1200$  s (DMSO)). Auch unter ODQ/DMSO waren die Werte für C mit ca. 5-12 APs/Puls deutlich verschieden von 0.

Bislang wurde nur die Antwort am Ende der habituierten Reize betrachtet. Um aber zeigen zu können, dass es unter ODQ nicht zu einer generellen Antwortverringering kommt, dass also durch ODQ vor allem die Tiefe der Habituation, nicht aber die nicht-habituierte Antwort zu Beginn einer jeden 100 s dauernden Pulsreihe verändert wird, zeigt Abbildung 3.22 die Antworten je 1. Puls (siehe Abb. 3.22 A, Einschaltbild).

Vergleicht man die gemessene Zahl der pro erstem Puls generierten Spikes (Abb. 3.22 A, gefüllte schwarze Kreise) lassen sich zwischen Ringer-, DMSO- und ODQ/DMSO-Applikation keine signifikanten Unterschiede feststellen.

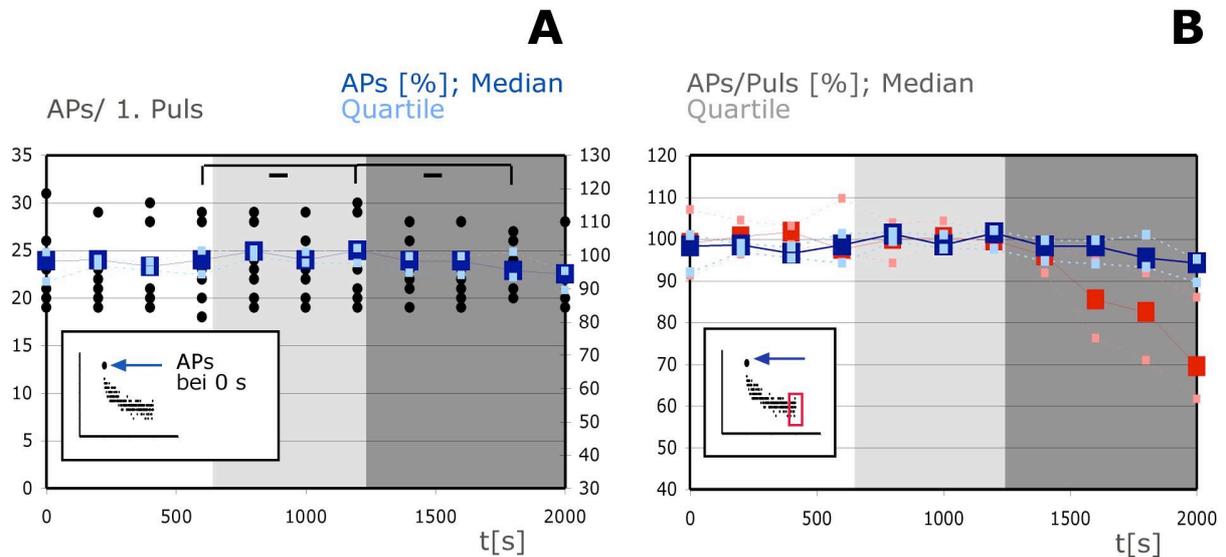


Abb.3.22: Im Gegensatz zum Antwortverhalten am Ende hochfrequenter Reizung hatte ODQ keinen signifikanten Einfluss auf die Antworten zu Beginn der Reizung. **A** Darstellungsschema wie in Abb. 3.19, jedoch sind hier die Einzelwerte (schwarze Kreise) die auf den ersten Puls pro Reihe generierten AP-Zahlen. **B** Vergleich der ODQ vermittelten Effekte auf das Antwortverhalten zu Beginn (blau) und Ende (rot) der Pulsreihen. Medianverlauf der normierten Mittelwerte aus Antworten der letzten 10 s je Pulsreihe aus Abb. 3.19 A.

Abbildung 3.22 B zeigt im direkten Vergleich noch einmal die Mediane und Quartilen der AP-Antworten zu Anfang und Ende der hundertsekündigen Habituationsreihen. Während in beiden Fällen unter DMSO keine Antwortverringering auftritt, führt das Einwaschen von ODQ nur bei habituierten Antworten (gefüllte rote Quadrate) zu einer deutlichen, maximal etwa 30%-igen Verringerung der AP-Zahlen/Puls. Demgegenüber zeigten die nicht-habituieren Antworten am Reizbeginn (blaue Quadrate) kaum Veränderungen bei Einsatz des sGC-Hemmers. Das bedeutet, das Blockieren der NO-Signalkette bewirkte:

- (1) keine generelle Hemmung der A4I1-Antwort.
- (2) Stattdessen aber wurde die Habituationstiefe moduliert, hin zu stärkerer Verringerung der AP-Antwort bei hochfrequenter Reizung.

### 3.3 Diskussion

Die geometrischen Besonderheiten der Wirkung des hoch diffusiblen Botenstoffes Stickstoffmonoxid werden gegenwärtig sehr kontrovers diskutiert. Präzise Untersuchungen räumlicher Aspekte der NO-Verteilung an Sender-Empfängersystemen mit bekannter Funktion sind deshalb dringend erforderlich. In der hier vorliegenden Arbeit wurde mittels genauer anatomischer 3D-Analysen die NO-Synthaseverteilung in der Nähe von Neuronen des Flugsteuernetzwerks der Wanderheuschrecke analysiert. Für ein auch physiologisch untersuchtes Neuron, das A4I1-Interneuron, legen pharmakologische Befunde nahe, dass NO eine wichtige modulatorische Funktion erfüllt, eine Funktion, die essentiell ist für die Anpassung mechanosensorischer Systeme an variable Reizbedingungen.

### Anatomie

**Neurone des A4I1-Schaltkreises als Empfänger eines NO-Signals:** Die Resultate der anatomischen Untersuchungen zeigen eine unterschiedliche räumliche Verteilung von NOS innerhalb des Prothorakalganglions der Wanderheuschrecke. Wie auch schon bei Ott und Burrows (1998, vgl. auch Bullerjahn und Pflüger, 2003) gezeigt, wiesen ventrale Bereiche die vergleichsweise höchste NOS-Dichte auf, darunter das VAC - ein wichtiges neuronales Integrationszentrum mechanosensorischer Information. In eben jenen ventralen Bereichen verzweigen sowohl prosternale, windempfindliche Rezeptorzellen, das A4I1, aber auch andere, bislang unbekannte Interneurone dieses Schaltkreises (vgl. Teil III).

Weil die tatsächliche Wirkdistanz von NO im Gangliengewebe von *Locusta* unbekannt ist (vgl. Philippides, 2005), wurde das Vorhandensein von NOS für verschiedene Distanzen zu den Neuronen verifiziert. uNOS positive Markierungen waren bei Rezeptorzellen und A4I1 sogar im Submikrometerbereich um verschiedene Neuriten festzustellen. Die Doppelmarkierungen von NOS-Epitopen und Neuronen weisen deshalb sowohl windsensitive Rezeptorzellen als auch das A4I1 als potentielle Ziele von NO-Signalen aus. Im folgenden vierten Kapitel werden bislang unbekannte Interneurone des prosternalen Flugsteuernetzwerks vorgestellt. Da die Projektionsgebiete dieser Neurone in weiten Bereichen mit denen von A4I1 und Rezeptorzellen überein stimmten, und die Neuriten in den selben Trakten in unmittelbarer Nachbarschaft verliefen, ist eine NO-Wirkung auch für diese Schaltkreisneurone vorstellbar (s.u. Methodische Erläuterungen zur Anwendung der uNOS-IR).

A4I1 und prosternalen Afferenzen sind sehr wahrscheinlich monosynaptisch miteinander verschaltet (Pflüger; 1984). Die Lokalisation von NOS sogar in Submikrometer-Nähe sowohl zum A4I1 als auch zu Axonkolateralen windsensitiver Rezeptorzellen lässt deshalb eine direkte Wirkung von NO auf diese Synapse erster Ordnung möglich erscheinen (Burette et al., 2002; vgl. Abbildungen 3.5, 3.7 und 3.9).

NOS-IR war auch in der Umgebung von Rezeptorzellen der Larvenstadien 3 und 4 festzustellen (vgl. Abb. 3.10 für L4). Das deckt sich mit anderen Befunden, die belegen, dass bestimmte funktionale und anatomische Charakteristika dieses Flugsteuernetzwerks nicht erst im adulten, flugfähigen Tier angelegt werden (Bucher & Pflüger, 2000).

Wer ist der Sender des NO-Signals? Unklar ist jedoch die Identität der NOS exprimierenden Zelle/n selbst. Die anatomischen Daten jedenfalls weisen aus folgenden Gründen nicht auf Rezeptorzellen (A) oder A4I1 (B) als NO-Quelle hin:

(A) Im hier untersuchten Prothorakalganglion (Abb. 3.1) fand sich keinerlei Hinweis auf NOS-IR positive Fasern in solchen Traktgebieten, in denen die jeweils ca. 150 prosternalen Rezeptorzellen ins Ganglion einziehen.

(B) Auch das A4I1 selbst scheint keine NOS zu exprimieren. Zwar fanden sich für dieses Interneuron optische Überlappungen von NOS-IR und Zellfärbungen (vgl. Abb. 3.5), diese aber waren nur partiell, wobei jeweils ein deutlicher Anteil der Markierung außerhalb der Zellfärbung lag. Die Überlappung ist deshalb wahrscheinlich auf die begrenzte optische Auflösung zurückzuführen. Mehr noch, der breite A4I1-Hauptneurit (Durchmesser > 10 µm) war als Faser in der NOS-IR nicht markiert (vgl. auch Kartierung in Abb. 3.7) und auch im Abdominalganglion 4 (A4) von *Locusta migratoria* findet sich nahe der Somapositionen der beiden A4I1 nur ein Paar NOS-IR positiver Zellkörper. Das Verzweigungsmuster dieser Zellen entspricht jedoch nicht dem des A4I1 (Bullerjahn und Pflüger, 2002).

Hinweise auf mögliche NOS-Quellen für das prothorakale A4I1-System lassen sich in Ott & Burrows (1998) finden. Im vVAC, dem axonalen Verzweigungsgebiet v.a. junger prosternaler Rezeptorzellen (entstanden in Larve3-Larve5) verzweigen auffällige NADPHd positive intersegmentale Interneurone. Jedoch scheint fraglich, warum solche, in allen thorakalen Ganglien gleichermaßen verzweigende Neurone ausschließlich im prothorakalen Integrationsgebiet des A4I1-Schaltkreises wirken sollten. Bemerkenswert ist deshalb der Befund, dass sich die Verteilung der NADPHd positiven Fasern deutlich zwischen den drei thorakalen Ganglien unterscheidet, ein Umstand, der evtl. verschiedene segmentspezifische Funktionen widerspiegelt. Zwei anteriore Cluster von NOS-IR positiven Somata sind typisch

für das Prothorakalganglion. Dass Neurone beider Cluster auch im Projektionsgebiet des A4I1 (vgl. Pflüger, 1984 und Ott & Burrows, 1998), prosternaler Windrezeptorzellen sowie anderer Interneurone des Netzwerks verzweigen (vgl. Teil III) macht sie zu potentiellen NO-Signal-Sendern dieses Schaltkreises, ebenso wie die vielen anderen hier verzweigenden NOS-IR positiven Fasern, deren geringe Fasergröße und entsprechend schwache Färbung eine Identifikation unmöglich machte (Ott & Burrows, 1998).

**Kartierung der NOS:** Anliegen der Kartierung von NO-Synthase war, die Dichte und Verteilung von NO-Quellen exemplarisch an einem solchen Interneuron zu untersuchen, das in einem mechanosensorischen Integrationszentrum (Burrows, 1996) mit höchster NOS-Dichte verzweigt. Die hier vorgestellte Kartierung von NOS-IR erbringt dabei wichtige quantitative Daten für die NO-Verteilung in definierten Distanzvolumina um einen weiträumig verzweigenden Neuriten. Bei der hier verwendeten Methode wurden die jeweils maximalen Intensitäten in einer bestimmten Umgebung auf den betreffenden Neuritenabschnitt projiziert (vgl. 2.4). Um die dabei gewonnenen Daten jedoch richtig deuten zu können, liegt ein Schwerpunkt der folgenden Ausführungen auch in theoretischen Überlegungen zur Interpretation solcher Resultate.

Schon bei visueller Beurteilung der NOS-Verteilung im Umfeld eines A4I1 Hauptneuriten zeigte sich (vgl. Abb. 3.7), dass in einer Entfernung von 0,5  $\mu\text{m}$  nur wenige NOS-IR Markierungen hoher Intensität (rot) auftraten. Dagegen fand sich zu nahezu jedem Punkt auf der Neuritenoberfläche bereits in einer 5  $\mu\text{m}$  Distanz eine NOS-Markierung höchster Intensität.

Interpretation der Kartierungsdaten: Wie kommen die Verteilungsunterschiede zwischen kleinen und großen Distanzen zustande? Zwei Gründe sind vorstellbar:

(A) Einerseits verursachen allein schon größere Distanzwerte großflächigere Markierungen auf dem Neuriten: (Beispielsweise wird ein *direkt auf der Neuritenoberfläche* befindlicher NOS-IR positiver Voxel in einer 0,5  $\mu\text{m}$  Distanz alle Neuritenoberfläche bis zu einer Entfernung von 0,5  $\mu\text{m}$  um ihn selbst markieren. Im Falle eines *geraden* Neuritensegments wäre bei 0,5  $\mu\text{m}$  also  $2 * 0,5 \mu\text{m} = 1 \mu\text{m}$  Segmentlänge, bei 5  $\mu\text{m}$  Distanzwert schon  $2 * 5 \mu\text{m} = 10 \mu\text{m}$  Segmentlänge markiert.) Das größere Projektionsvolumen der schon bei 0,5 und 1  $\mu\text{m}$  Distanz vorhandenen Markierungen erklärt aber nicht allein die Verteilungsunterschiede zwischen den verschiedenen Entfernungswerten.

(B) Wie Abb. 3.7 C & D zeigen, traten auch Markierungen durch NOS-IR Profile mit höchster Intensität hinzu, Markierungen, die bei 0,5  $\mu\text{m}$  noch nicht im Distanzvolumen lagen.

Zwar könnte man einwenden, dass die bei größeren Distanzen (2-5  $\mu\text{m}$ ) rot markierten Bereiche, bei 0,5 und 1  $\mu\text{m}$  schon durch warme Markierungen (hellblau, grün bis gelb) etwa angedeutet werden (Abb. 3.7, \*\* in A vs. C). Das würde bedeuten, dass Teile einer NOS-IR Markierung scheinbar bereits in einer 0,5 – 1  $\mu\text{m}$  Entfernung nachweisbar sind. Jedoch ist zu bedenken, dass eine punktförmige Lichtquelle auch konfokal-mikroskopisch nicht als Punkt abgebildet wird, sondern – beschrieben durch eine point spread function (PSF) – in allen Raumdimensionen verschmiert (Agard et al., 1989; Keller, 1995, für PSF im Gewebe: Bucher, 2000). Dabei ist die „vergrößerte“ Abbildung am Rand weniger intensiv als im Zentrum. Nebenmaxima einer entfernt liegenden, hellen NOS-Markierung ( $\geq 2 \mu\text{m}$ ) würden deshalb schon in geringerer Entfernung zur Neuronenoberfläche detektiert (0,5 -1  $\mu\text{m}$ ) und erscheinen in der Kartierung als Markierungen mittlerer Intensität. Will man daher die Zahl von hinzu gekommenen Markierungen bei Vergrößerung des Distanzvolumens von 0,5 nach 5  $\mu\text{m}$  Distanz abschätzen, sollten als vernünftige Näherung nur Markierungen jeweils höchster Intensität verglichen werden.

Das heißt, die größere Zahl NOS-IR positiver Segmentlängen bei größerer Entfernung (5  $\mu\text{m}$ ) beruht einerseits auf dem größeren Projektionsvolumen von sehr nahen Markierungen, aber auch auf bei größerer Entfernung hinzukommenden Markierungen.

Unterschiede der NOS-Verteilungscharakteristika in Abhängigkeit der Distanz zur Neuronenoberfläche: Die Distanzwerte 0,5 und 5  $\mu\text{m}$  bilden die beiden Extrema von NOS-Verteilungscharakteristika: distinkt und vereinzelt vs. homogen und häufig (vgl. Abb. 3.7).

Will man jedoch erfragen, in welcher Weise Suchdistanz und uNOS positive Segmentlänge korreliert sind, oder soll abgeschätzt werden, bis zu welcher Distanz die Verteilungscharakteristik noch als distinkt zu bewerten ist, so ist eine genauere Quantifizierung von NOS positiven Segmenten im entscheidenden Bereich zwischen 0-5  $\mu\text{m}$  unerlässlich (Abb. 3.8).

Eine der fundamentalen Probleme der Quantifizierung von Proteinmarkierungen liegt nun aber in der Unterscheidung von Signal und Rauschen, denn im Gegensatz zu den im Allgemeinen recht homogenen Zellfärbungen mit Neurobiotinkomplexen können Antikörpermarkierungen gegen Gewebsproteine (hier NOS) viel stärker in ihrer Intensität variieren - abhängig z.B. von Dichte und Größe der zu färbenden Proteinaggregation. Deshalb wurden für Abbildung 3.8 vier Kurven erstellt - für vier verschiedene Schwellenwerte ab der eine Färbung als IR positiv gewertet wird (25/50/75/100 % in Abb. 3.23). Vergleicht man alle vier Kurven, so fällt die größere Ähnlichkeit der 50% zur 75%-Kurve für Distanzwerte von

0,5 – 2  $\mu\text{m}$  auf. Deutlich verschieden dazu war die Kurve für einen Schwellenwert von 25%. Ist es möglich aus diesem Merkmal einen vernünftigen Schwellenwert für ein uNOS-Signal abzuleiten? Abbildung 3.23 illustriert anhand hypothetischer Verteilungsgrafiken ein mögliches Vorgehen zur Unterscheidung von Signal und Rauschen und damit auch zur Auswahl eines Grafen, der die Korrelation von Suchdistanz und uNOS-IR positiven Segmenten am besten beschreibt.

Grafik B in Abbildung 3.23 zeigt schematische Kurvenverläufe, ähnlich den realen in Abbildung 3.8. Die Grafen für Schwellenwerte von 50 und 75% maximaler Intensität zeigen wiederum die größte Übereinstimmung.

Die Ordinatenwerte, d.h. der Anteil uNOS-IR positiver Segmentlängen/Gesamtlänge für alle Kurven sind kumulativ. So entspricht in B der Wert für  $x=1\mu\text{m}$  &  $y=50\%$  Schwellenintensität (\* in Abb. 3.23 B) der Summe aller Segmentlängen (Snaxellängen<sup>16</sup>), die in einem Umkreis von 1  $\mu\text{m}$  zur Neuritenoberfläche solche Voxel aufweisen, deren Helligkeit zwischen 50 und 100 % der Maximalintensität beträgt. Das ist etwa die Summe aller türkisfarbenen, grünen, gelben und roten Snaxel (vgl. Farbbalken in Abb. 3.23 und Abb. 3.7)

Um nun den Unterschied der Kurven für 50 und 75 % Schwellenintensität zur Kurve für 25% maximaler Intensität in B zu erklären, zeigt Abbildung 3.23 A eine ebenfalls hypothetische Intensitätsverteilung aller Snaxel für einen Distanzwert von 1  $\mu\text{m}$  als herkömmliches Klassen-Histogramm (graue Balken, linke Ordinate) und in kumulativer Verteilung (schwarze Balken, rechte Ordinate in %).

Im Gegensatz zu Antikörpermarkierungen gegen ubiquitär vorkommende Gewebsproteine, sollten punktförmige Markierungen gegen eher vereinzelt vorkommende Proteine wie NOS nur einen geringen Prozentsatz der Voxel eines Bilddatenstapels ausmachen. Das zeigen sowohl die hypothetische Verteilung in Abb. 3.23 A als auch zum Vergleich eine reale Intensitätsverteilung in Abb. 3.23 C (C2 mit vergrößerter Ordinatenachse). Für die reale Verteilung in C1&C2 wurde für ein Präparat mit uNOS-IR die Intensität aller Voxel in einem Volumen von etwa  $10^{-3} \text{ mm}^3$  im VAC bestimmt. Wie die grauen Balken in A und C zeigen, stehen vielen Snaxeln/Voxeln geringer Intensität (putativ Rauschen) sehr wenige Voxel/Snaxel mit hoher Intensität (putatives NOS-Signal) gegenüber. Da in Grafik B kumulative Werte aufgetragen sind, zeigen auch in A und C die schwarzen Balken die kumulative Verteilung an, beginnend mit der Voxelzahl bei 100% maximaler Intensität.

---

<sup>16</sup> Voxel = kubisches Volumenelement. Snaxel = Oberfläche oder Abschnitt auf rekonstruiertem Skelett.

---

Bemerkenswert sind die für das uNOS-IR-Präparat gewonnenen Zahlen (Abb. 3.23 C)<sup>17</sup>: nur etwa 0,7% aller Voxel wiesen mehr als 50% maximaler Intensität auf. Für eine Schwellenintensität von 25% würden immer noch nur 2,7% aller Voxel als immunopositiv gewertet werden.

Die roten Pfeile in Abbildung 3.23 A & B zeigen an, wie die kumulativen Werte (schwarze Balken) von A in Graf B übertragen werden: als Snaxelzahlen mit Schwellenintensitäten von 25, 50, 75 und 100% maximaler Intensität. Zum Vergleich wurde auch der Wert für eine Schwellenintensität von 12,5 % angegeben.

Bei geringer Signaldichte und herkömmlichen Autofluoreszenzwerten, tritt also (liest man in A von rechts nach links) erst bei geringen Intensitäten ein starker Anstieg der Snaxelzahlen auf. Der Beginn dieses Anstiegs markiert dann etwa denjenigen Intensitätsbereich, bei welchem das Rauschen zunehmend dominant würde. Eventuell vorhandene schwache Proteinmarkierungen stünden also einer zunehmend größeren Zahl mit hoher Autofluoreszenz (Rauschen) gegenüber. Der Fehler durch fälschlicherweise als IR-positiv gewertete Snaxel nähme also deutlich zu im Bereich stark ansteigender Snaxelzahlen. Dieser Bereich nun wird in B durch den größeren Abstand der Kurve mit 25% zu denen mit 50 % & 75% Schwellenintensität deutlich.

Das heißt, um den Fehler fälschlicherweise als positiv gewerteter Strukturen (Rauschen) zu minimieren und dadurch mittelbar den Anteil vermutlich „echter“ IR positiver Strukturen zu betrachten, scheinen die einander ähnlichen Kurvenverläufe bei 50 und 75 % Schwellenintensität das NOS-IR-Signal am besten zu beschreiben, da deren Intensitätswerte „kurz vor“ dem durch Rauschen bedingten Anstieg der kumulativen Kurve liegen. Gleichzeitig machen diese theoretischen Erwägungen auch klar, dass nur durch die Auftragung mehrerer Schwellenkurven überhaupt die Abschätzung eines vernünftigen Schwellenwertes für eine Proteinmarkierung möglich wird.

---

<sup>17</sup> In der Auftragung der hypothetischen Verteilung (Abb. 3.23A) wurden die relativen Snaxelzahlen bei hohen Intensitäten (> 50%) gegenüber der realen Verteilung der Voxelzahlen (Abb. 3.23 C) etwas erhöht. Das war deshalb nötig, weil bei der realen Verteilung jeder Voxel seine ursprünglich gemessene Intensität erhält. Bei der Kartierung erhält jeder Snaxel jedoch den maximalen Intensitätswert aus einer 1 µm Nachbarschaft, weshalb die Verteilung in A gegenüber C etwas zu größeren Snaxelzahlen hin verschoben ist.

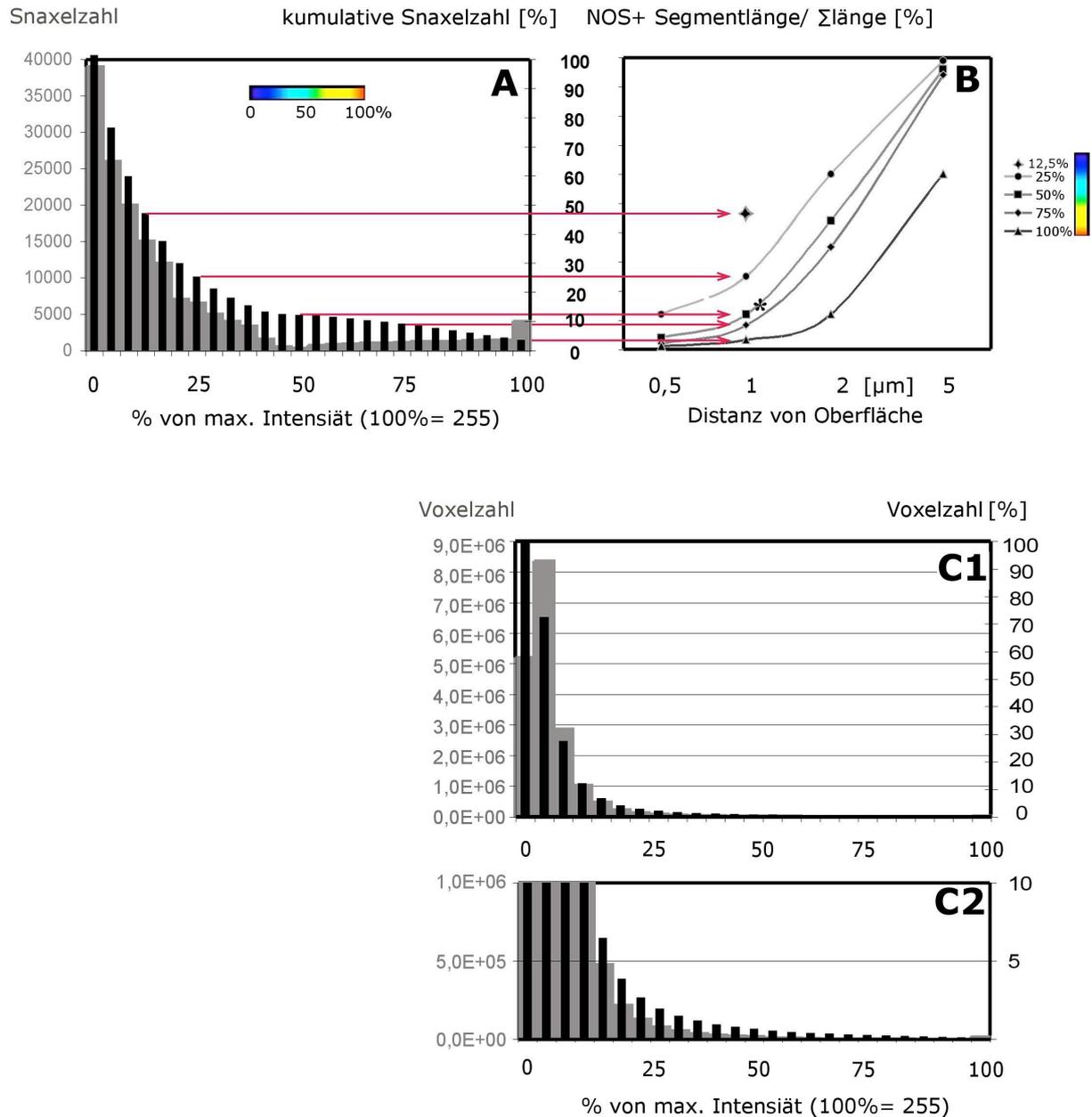


Abb. 3.23: **Abschätzen einer geeigneten Schwellenintensität durch Minimieren des Einflusses von Rauschen**

Die Grafen für 50 und 75% Schwellenintensität beschreiben am besten die Korrelation von Distanz und IR-positiver Snaxelzahl für eine hypothetische Verteilung einer IR-Markierung mit vereinzelter, punkttartiger Erscheinung. Schematische Darstellung zur Bestimmung der Schwellenintensität (A & B). Intensitätsverteilung der absoluten Snaxelzahlen als normales Klassenhistogramm (graue Balken in A) und kumulative Verteilung der prozentualen Snaxelzahlen (schwarze Balken in A). Quantitative Erfassung des Anteils von Neuritenabschnitten, die in ihrer Nähe eine IR-Markierung aufweisen (B, vgl. Abb. 3.8) für verschiedene Schwellenwerte. Reale Intensitätsverteilung (C) der Voxel einer NOS-IR-Färbung für ein Volumen von etwa  $10^{-3}$  mm<sup>3</sup> im VAC. Normales Klassenhistogramm (graue Balken) und kumulative Verteilung der prozentualen Voxelzahlen (schwarze Balken). Vergrößerte Ordinatenachse in C2.

---

Biologische Konsequenzen: Eine wichtige Frage, die hier erörtert werden sollte, ist die nach der Natur der Wirkung des NO-Signals. Ohne eine Entscheidung treffen zu können, ob NO in diesem System und in diesem Neuropilgebiet ein ausgedehntes Volumensignal darstellt, oder ob es in der Art klassischer Transmitter sehr lokal und eventuell synapsenspezifisch wirkt, so lassen sich aufgrund der Daten doch prinzipielle Voraussagen treffen:

Legt man die oben gemachten Überlegungen zu Grunde, so kann man aus Abbildung 3.8 schließen, dass bei nur wenig mehr als 2  $\mu\text{m}$  Distanz zur Neuritenoberfläche mehr als 50% der gesamten Segmentlänge eine NOS-IR Markierung in ihrer Umgebung aufwies. Nur bei Distanzen unter 2  $\mu\text{m}$  sind kaum mehr als ein 10% der Voxel NOS-IR positiv<sup>18</sup>.

Die Dichte von NOS-IR nahe dem A4I1 Neuriten war sehr hoch. Der kritische Bereich für die Entscheidung, ob NO sehr lokal oder eher global auf den Neuriten wirken könnte, liegt bei Wirkdistanzen von 0 bis 5  $\mu\text{m}$ . Bei einer Wirkung über mehr als 2  $\mu\text{m}$  würden sich aufgrund der hohen NOS-Dichte nahe dem A4I1 die NO-Signale verschiedener Quellen überlagern. Ein NO-Rezeptormolekül (sGC) könnte dann nahezu im gesamten Volumen des betrachteten A4I1-Neuriten NO-Signale detektieren. Ist dagegen die Wirkdistanz nicht größer als 2  $\mu\text{m}$ , so deuten die Ergebnisse auf eine sehr lokale Wirkung des NO-Signals hin. In diesem Fall würden verschiedene NO-Signale innerhalb eines kleinen Gebietes des VAC auch verschiedene Informationen übertragen können.

Ob die hohe NOS-Dichte ein generelles Charakteristikum des untersuchten Neuropilgebiets darstellt, oder ob die Dichte nur bezüglich des hier betrachteten Interneurons derart hoch ist, darüber könnten weiterführende Analysen Auskunft geben. Vorstellbar wäre beispielsweise, die hier vorgestellte Kartierungsmethode für ein standardisiertes Neuronenmodell (evtl. der rekonstruierte Äste selbst) in verschiedenen Orientierungen innerhalb des Ganglions vorzunehmen und die Resultate mit denen für das A4I1 an der originalen Position zu vergleichen. Optische Schnitte an verschiedenen Positionen des ventralen Prothorakalganglions (Abb. 3.2 & 3.9) jedenfalls zeigen, dass viele uNOS-IR-Markierungen typischerweise deutlich näher als 5-10  $\mu\text{m}$  beieinander liegen aber doch eine distinkte Verteilung bilden. Deshalb scheinen einerseits Wirkdistanzen von weit mehr als 10  $\mu\text{m}$  aufgrund der dichten Verteilung von NOS kaum erforderlich. Dagegen ist die NOS-Dichte

---

<sup>18</sup> Abbildungen 3.4 und 3.8 mit Suchdistanzen von 10  $\mu\text{m}$  (Abb. 3.4) bzw. 0,5-5  $\mu\text{m}$  (Abb. 3.8) lassen sich nicht direkt vergleichen, da die konfokalen Bilderstapel mit unterschiedlichen Objektiven aufgenommen wurden. Das für Abbildung 3.4 verwendete 20x-Öl Objektiv bildet aufgrund schlechterer optischer Eigenschaften kleine Strukturen lichtschwächer ab, wurde aber wegen seines größeren Arbeitsabstandes für die Übersichtsdarstellung eingesetzt.

---

nicht hinreichend hoch, um für jedes Neuron im VAC im Submikrometerbereich eine NO-Wirkung vorherzusagen.

Die Relevanz der Betrachtung verschiedener NOS-Verteilungscharakteristika in dem doch gering erscheinenden Distanzbereich unter 5  $\mu\text{m}$  (Schweighofer & Ferriol, 2000) wird deutlich bestätigt durch eine kürzlich erschienene Untersuchung von Namiki et al. (2005). Durch Kopplung von GFP und der NO-sensitiven Region der sGC entwickelten sie einen Indikator, mit dem sie direkt die NO-Ausbreitung an der Synapse von Parallelfasern und Purkinjezellen im Cerebellum der Maus darstellen konnten. Dabei zeigt sich ein äußerst steiler Abfall des NO-Signals über den Distanzbereich unter 5  $\mu\text{m}$  (siehe Abbildung 3.24). Bedenkt man die - im Vergleich zur der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten NO-Synthase-Kartierung - schlechtere Auflösung des direkten NO-Imaging<sup>19</sup>, dann korrespondieren die Daten über den gemessenen NO-Signal-Abfall und der NOS-Verteilung durchaus: Nur wenn, wie bei Namiki et al. erstmals direkt im Gewebeverband gezeigt, die Wirkdistanz von NO derart gering ist und zudem die NOS-Dichte der hier für eine Insektenpezies gezeigten vergleichbar ist, dann sind die NO-Signale innerhalb des betrachteten Gewebereiches kompartimentiert.

Tatsächlich erhärten neuere Publikationen die Annahme, dass das NO/cGMP-System oft weniger diffus und mobil ist als angenommen. Wie in anderen Sender-Empfänger-Systemen können die Einzelkomponenten der NO-Signalkaskade ein räumlich präzise angeordnetes Ensemble bilden, das sich um Zellmembranen konzentriert. Die Lokalisierung der NOS an der Plasmamembran ist schon länger bekannt (Sessa et al., 1992; dynamische Lokalisierung an Synapsen: Dreyer et al. 2005), ebenso wie die Tatsache, dass NO selbst neunmal löslicher ist in hydrophobem, als in wässrigem Milieu (Shaw & Vosper, 1977). Letzteres sollte, auch wegen der geringen Halbwertszeit (Liu et al., 1998), eine Konzentrierung von NO in den Membranen bedingen. Selbst ein membranständiger Protein-Transportkomplex, der das NO-Signalmolekül überträgt, ist beschrieben worden (Pawloski et al., 2001); ein Umstand, der das Konzept eines zielgerichteten NO-Transfersystems zwischen Zellen aufwarf. Aber neben Sender (NOS) und Signalmolekül flottiert auch der Empfänger, die „soluble“GC nicht ausschließlich frei im Zytosol, sondern tritt gehäuft an Plasmamembranen vieler Gewebe auf, so im Cortex, Cerebellum, Muskel und Darm von Ratten (Zabel et al., 2002). Die Assoziierung mit der Membran sensitiviert die sGC darüber hinaus signifikant für NO.

---

<sup>19</sup> Bei Namiki et al. wurden beispielsweise zweidimensionale Projektionsansichten ausgewertet und die Bestimmung des Zentrums der fokalen NO-Freisetzung ist nur ungenau genau determinieren.

Zahlreiche andere Arbeiten deuten ebenfalls auf eine enge Kopplung von sGC mit Membran und Synapsen hin (Burette et al., 2002; Christopherson et al., 1999, Zayas et al., 2002).

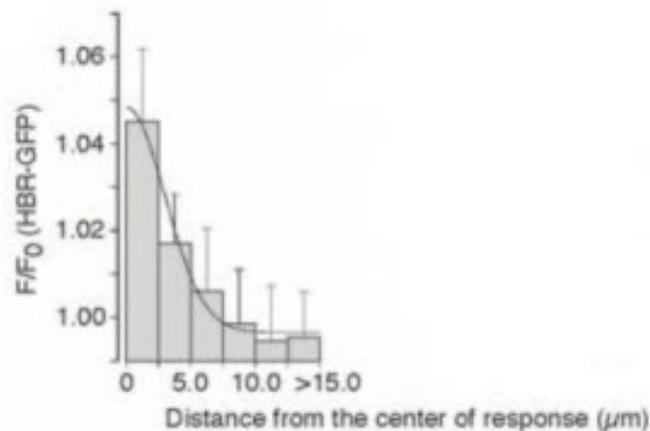


Abb. 3.24: Verteilung des mittleren Anstiegs der HBR-GFP\*-Fluoreszenz in einer Purkinjezelle nach Stimulierung der Parallelfasern (\*NO-Indikator).

Aus: Namiki et al., 2005

Im Falle einer solchen räumlichen Strukturierung der NO-Signalkaskade würde die hier vorgestellte Kartierung an Einzelzellen wertvolle Hinweise auf Ausdehnung und Lage solcher Neuritenbereiche geben, auf die eine NO-Quelle wirken könnte, wichtig zum Beispiel für die Aufklärung räumlicher Signalverarbeitung. Darüber hinaus, bei hoher Auflösung, ließe sich durch kombinierte NOS- und sGC-IR für verschiedene Tiersysteme eine räumliche Aggregationen von NO-Sender und Empfänger überprüfen. Wichtige Erkenntnisse könnten so gewonnen werden, welche die herkömmliche Vorstellung eines weitreichenden Volumensignals herausforderten. Auch die eingangs erwähnten signalökonomischen Paradoxa, nämlich das Vorhandensein vieler verschiedener NO-Quellen in kleinen Insektenneuropilen, und die daraus bei hohen Signaldistanzen resultierende Vermengung verschiedener Signale ließen sich so untersuchen und eventuell aufklären.

**Methodische Erläuterungen zur Anwendung der uNOS-IR:** Verschiedene immunozytochemische Untersuchungen sind denkbar, um anatomische Hinweise auf eine mögliche NO-Wirkung in einem Netzwerk zu erbringen; darunter Antikörpermarkierungen gegen Epitope von sGC oder GMP (Stengl et al., 2001), von NOS (Gibbs & Truman, 1998) und die nur für konventionelle Lichtmikroskopie geeignete NADPHd-Reaktion (Dawson et al., 1991). Eine sGC- oder GMP-Markierung, d.h. die Markierung eines intrazellulären Botenstoffes lässt nur Rückschlüsse auf eine NO Wirkung für eine einzelne Zelle zu. Sie ist nur sinnvoll, wenn die putative Zielzelle bereits identifiziert ist. Im Falle einer GMP-IR muss das System darüber hinaus mit einem bekannten adäquaten Reiz stimuliert werden, um GMP nachweisen zu können. Darüber hinaus ist die sGC nicht in allen NO-Signalkaskaden der

---

„NO-Rezeptor“ (Stengl et al., 2001). Die uNOS-IR erschien vorteilhaft, weil die Doppelmarkierung von NO-Quelle zusammen mit einem bekannten Schaltkreisneuron ebenfalls ein anatomisches Indiz für die Wirkung von NO auf die Zelle selbst erbringt. Wegen der Weitreichigkeit des NO-Signals gibt die uNOS-IR aber auch Hinweise für eine mögliche NO-Wirkung auf benachbarte, bislang unbekannte Neurone des Schaltkreises. Das ist besonders in dem hier untersuchten System von Belang, da ein Ensemble miteinander verschalteter Rezeptorneurone und verschiedener Interneurone desselben Schaltkreises in einem definierten Areal verzweigt (vgl. Teill). Das A4I1 als gut identifizierbares Neuron mit ausgedehntem Projektionsgebiet erschien dabei als geeignete topologische Referenz, die zudem genauer als anatomische Landmarken wie Traktgebiete u.ä. definiert ist.

### **Die Funktion von NO im A4I1-System (Physiologie)**

Mit zwei Pharmaka (DEA, ODQ), die NO-Signalkaskaden beeinflussen, konnte eine modulatorische Wirkung von NO im A4I1-System gezeigt werden. Da NO über verschiedene Signalkaskaden wirkt (Garthwaite, 1995; Ahern et al., 2002; Bon & Garthwaite, 2002), können NO-Donoren, wie DEA, unterschiedliche Wirkungen hervorrufen, was die Interpretation der Daten kompliziert. ODQ dagegen beeinflusst nur einen bestimmten NO-Signalweg, weshalb die Versuche mit ODQ hier als erstes diskutiert werden sollen.

**Die Wirkung des sGC-Inhibitors ODQ auf die Habituation:** Der Inhibitor ODQ ist spezifisch (Garthwaite et al., 1995) für die bislang am besten untersuchte NO-Signalkaskade, bei der NO über sGC die Synthese von cGMP stimuliert. Da hier kein exogenes NO appliziert wurde, sollte der beobachtete Effekt allein auf das Blockieren der Wirkung endogenen NOs zurückzuführen sein. Um eine mögliche Produktion endogenen NOs zu stimulieren, und damit die sGC in einen Zustand hoher Syntheseaktivität zu versetzen (Ballou et al., 2002; Cary et al., 2005), wurden die Präparate vor Beginn jedes pharmakologischen Versuchs für zwanzig Minuten mit einer hochfrequenten Pulsfolge stimuliert (vgl. 3.2.2.1; Dieses Vorgehen erwies sich als sinnvoll, weil in Vorversuchen nur solche Präparate einen ODQ-Effekt zeigten, die über längere Zeit stimuliert worden waren.).

Der irreversible Inhibitor der sGC (Schrammel et al., 1996) verstärkte die Habituation der Windantwort des A4I1. Die eingesetzte ODQ-Konzentration (0,1  $\mu\text{M}$ ) entsprach Werten, die auch für andere Untersuchungen an *Locusta* effektiv waren (vgl. Haase und Bicker, 2003). Im Vergleich zur schnellen Inaktivierung der sGC (< 1 min; Bellamy und Garthwaite, 2001) bei

---

solchen Versuchen, bei denen NO aus der Badlösung entfernt wird (*scavenging*), folgte der ODQ-Effekt hier einer deutlich langsameren Kinetik (vgl. Abb. 3.21) - die vollständige Inaktivierung war wahrscheinlich auch am Ende des Versuchszeitraums mit ODQ noch nicht erreicht. Dies widerspricht jedoch nicht der schnellen Inaktivierung durch NO-scavenger, denn die Inaktivierung der sGC durch ODQ folgt einer mehr als zehnfach langsameren Kinetik (Schrammel et al., 1996).

NO als Modulator der Habituation – Konsequenzen für die Reizverarbeitung: Habituation ist die Abnahme der Reizantwort bei wiederholter Stimulation eines reizverarbeitenden Systems (Thompson & Spencer, 1966). Arbeiten an *Aplysia* zeigten, dass die wiederholte elektrische Reizung von Rezeptoren zu einer Verringerung des Kalzium-Einstroms und damit ebenfalls zu einer Verringerung der Transmitter Ausschüttung an Synapsen mit Interneuronen führt (Castelluci & Kandel, 1974; Boyle et al., 1982; Byrne, 1982).

Die Versuche mit ODQ deuten hin auf eine Funktion von NO als Modulator für die Habituation der Windantwort im A4I1-System von *Locusta*. Wegen der stärkeren Habituation bei Blockierung der sGC ist es wahrscheinlich, dass endogen synthetisiertes NO eine Verminderung habituativer Effekte verursacht. Das bedeutet, bei hochfrequenter Stimulation bewirkt endogenes NO, dass das System ein höheres Antwortniveau aufrechterhalten kann. NO würde demnach den dynamischen Bereich der Reizantwort regulieren (*gain control*). Das ist insbesondere für ein System wichtig, dass die Luftströmung über einem Tier mit verschiedenen Lokomotionstypen misst. Bei hoher Systembeanspruchung, beim Flug beispielsweise, würde endogenes NO also einer zu starken Verringerung der Reizantwort entgegenwirken.

Auf welche zellulären Mechanismen die NO-sGC-cGMP-Signalkaskade im prosternalen windsensitiven System letztlich einwirkt, darüber kann vorerst nur spekuliert werden. Ein wichtiges Ziel von cGMP sind Proteinkinasen (PKGs), die auf eine Vielzahl von Ionenkanälen wirken und so die Leitfähigkeit der Neuronenmembranen ändern (Vaandrager & de Jonge, 1996). Bei der Honigbiene führt die Inhibition der sGC durch ODQ zu einer Verstärkung der PKA vermittelten Habituation (Müller und Hildebrandt, 2002). Im Hippocampus von Ratten werden Endozytose und Recycling synaptischer Vesikel durch NO aktivitätsabhängig reguliert. Während Phasen intensiver Stimulation steigert NO deshalb mittelbar die Transmitterfreisetzung (Micheva et al., 2003).

Vorstellbar ist beispielsweise ein Mechanismus, vergleichbar dem mehrfach beschriebenen retrograden NO-Signalweg, bei dem ein postsynaptisches Neuron aktivitätsabhängig NO

freisetzt, welches in der in der präsynaptischen Zelle über die sGC ebenfalls zu einer Aktivitätsänderung führt (Maffei et al., 2003; Bicker & Schmachtenberg, 1997; Schmachtenberg & Bicker, 1999). Im Falle des A4I1-Systems könnte ein NO-synthetisierendes Neuron Kalziumeinstrom und Vesikelfreisetzung an der Synapse zwischen Rezeptorzellen und A4I1 aktivitätsabhängig regulieren (vgl. Diskussion zu anatomischen Untersuchungen). Möglich ist ebenfalls ein orthograde Signalweg (Scholz et al., 2001), bei dem ein zum A4I1 präsynaptisches Neuron die Erregbarkeit des A4I1 moduliert.<sup>20</sup>

**Experimente mit DEA:** In der ersten Gruppe von Experimenten sollte durch Einsatz eines NO-Donors (DEA) ein direkter Effekt auf die Windantwort des A4I1 gemessen werden. Bei der Mehrzahl der getesteten Präparate (vgl. Abb. 3.11) wurde während der Applikation von DEA (300 µM) eine signifikante Verringerung der Zahl der je Puls generierten APs festgestellt.

Interindividuelle Unterschiede der Hemmung während DEA-Applikation – Methodische Überlegungen: Bei diesen Versuchen traten deutliche interindividuelle Unterschiede hinsichtlich Amplitude und Zeitverlauf der DEA vermittelten Hemmung auf (vgl. Abb. 3.14 & 3.12). Diese Variabilität ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Experimente am intakten Zellverband, am Ganglion also, und nicht an perfundierten Einzelzellen vorgenommen wurden. Aus zwei Gründen kann es dabei zu starken Schwankungen der effektiven Konzentration von NO an der Zielzelle kommen. Zum einen kann die Diffusion von DEA und mehr noch des im Gewebe hoch reaktiven NO selbst je nach Gangliongröße und Beschaffenheit (Alter<sup>21</sup>) verschieden stark behindert sein. So war in Vorversuchen, in denen die Ganglienhülle nicht partiell entfernt war, nur selten ein Effekt feststellbar. Zum anderen weist die effektive NO-Konzentration bei Applikation des NO-Donors nicht den für Einwaschvorgänge typischen sigmoidalen Verlauf auf. Bei gegebener Donor-Konzentration wird aufgrund seiner - unter physiologischen Bedingungen - geringen Halbwertszeit ein breites Spektrum verschiedener NO-Konzentrationen im Zeitverlauf generiert. Die

---

<sup>20</sup> Da für die Versuche mit ODQ die Reizantwort des A4I1 aufgezeichnet wurde, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass der durch ODQ hervorgerufene Effekt auf Veränderungen der Signaltransduktion schon in den dendritischen Segmenten der Rezeptorzellen zurückzuführen ist. In diesem Fall würde endogenes NO eher die *Adaptation* von Rezeptorzellen regulieren. Der beschriebene Effekt für die Reizverarbeitung - *gain control* - wäre aber vergleichbar

<sup>21</sup> Es wurden Tiere älter als 1 Tag, jedoch nicht älter als 3-4 Tage nach Häutung ausgewählt.

---

Halbwertszeit der NO-Freisetzung liegt im Bereich weniger Minuten (Maragos et al., 1991) und die Kinetik ist abhängig von verschiedenen Faktoren, insbesondere vom pH-Wert. Sie kann sich bei Anwendung im Gewebe deutlich von theoretischen Vorhersagen unterscheiden (Ferrero et al., 1999). Zwar wurde DEA bei den Versuchen an *Locusta* immer genau 30 Sekunden vor Applikation „aktiviert“ (Mischung der stark alkalischen Stocklösung mit Ringer; vgl. 6.2), trotzdem ist es möglich, dass diffusionsbedingte Unterschiede auch zu Unterschieden bei der im Präparat wirksamen maximalen NO-Freisetzung führten. Aus den genannten Gründen erschien es deshalb wenig sinnvoll eine Dosis-Wirkungsbeziehung für Effekte, die durch DEA ausgelöst wurden, zu bestimmen. Das Ziel der Versuche bestand deshalb darin, eine Wirkung des Donors bei einer gerade effektiven DEA-Konzentration nachzuweisen.

Extrazelluläres Ableiten im Konnektiv stellt immer auch einen Monitor über die Aktivitäten verschiedener Neurone dar. Deshalb soll hier noch auf eine Beobachtung hingewiesen werden, die für die Beurteilung der für das A4I1 effektiven DEA-Konzentration entscheidend ist. DEA-Konzentrationen von 100 und 300  $\mu\text{M}$ , Konzentrationen also, welche auch im A4I1 eine Hemmung induzierten, führten bei anderen Neuronen zur Steigerung der Aktivität, bzw. bei vielen vor DEA-Einwaschung inaktiven Neuronen erst zu einem „Anschalten“ der AP-Generierung<sup>22</sup>. Unter 50  $\mu\text{M}$  [DEA], bei Konzentrationen die auch für das A4I1 ineffektiv waren, konnte auch bei anderen Neuronen keine Aktivitätsänderung beobachtet werden. Die hier üblicherweise eingesetzten DEA-Konzentrationen waren mithin auch für andere Neurone von *Locusta* physiologisch effektiv und wirkten darüber hinaus nicht grundsätzlich hemmend auf die AP-Antwort von Neuronen.

Membranpotentialänderungen während DEA-Applikation: Die extrazellulär gemessene Antwortverringering des A4I1 unter DEA könnte auch auf periphere Effekte zurückzuführen sein, also auf einen Effekt von NO schon auf die Signaltransduktion von Rezeptorzellen. Die intrazellulär im A4I1 gemessene Depolarisierung des Membranpotentials (Abb. 3.16) deutet jedoch auch auf eine zentralnervöse Wirkung von DEA hin, d.h. auf eine Wirkung auf Ebene des - den Windrezeptoren nachgeschalteten - A4I1, oder auf andere für des A4I1 präsynaptische Interneurone. Diese könnten wiederum eine Leitfähigkeitserhöhung im A4I1 bewirken. Letztgenannte Möglichkeit könnte aber nur an einer aus dem Zellverband pharmakologisch oder mechanisch isolierten Einzelzelle geklärt werden. Die Aussagekraft

---

<sup>22</sup> Die Gesamtzahl der getesteten Präparate war wegen der unter DEA einsetzenden Aktivität deutlich höher als  $n = 35$ . Versuche, bei denen die Unterscheidung zwischen den Amplituden der APs von A4I1 (vgl. 6.2) und denen der APs anderer Einheiten nicht mehr gegeben war, wurden deshalb abgebrochen.

von Untersuchungen an mechanisch isolierten Einzelzellen ohne natürliche dendritische Kompartimente wäre allerdings eingeschränkt.

Während bei extrazellulären Ableitungen eine Inhibition unter DEA-Applikation dominant war, beobachtete man bei intrazellulären Ableitungen des A4I1 eine Depolarisierung des Membranpotentials. An verschiedenen Systemen ist nachgewiesen worden, dass auch eine Depolarisierung inhibitorisch wirken kann. Für Heuschrecken zeigen Burrows & Laurent (1993) sowie Burrows & Matheson (1994) in Afferenzen des FCO (femorochordotonales Organ der Tibia) inhibitorische depolarisierende PSPs, die durch die Applikation von GABA nachgeahmt werden können. Getragen werden diese Potentiale von Chlorid-Strömen, deren Umkehrpotentiale etwa 4 mV über Ruhemembranpotential liegen und Natriumströme gewissermaßen kurzschließen (*shunting*). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch im A4I1 wirken, wobei ein *shunting* sowohl durch Kalium als auch Chloridkanäle vorstellbar wäre. Ein solcher Mechanismus könnte auch zur Verringerung der EPSP-Amplitude (Abb. 3.17) beitragen.

Da in einem Drittel der Präparate das Auswaschen des NO-Donors eine Hemmung induzierte, deuten die Zeitverläufe der extrazellulär gemessenen AP-Antworten des A4I1 auf möglicherweise entgegen gerichtete DEA vermittelte Effekte hin (s.u.; vgl. Abb. 3.13). Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass die im A4I1 gemessene Depolarisierung des Membranpotentials Merkmal einer Exzitation ist. Für das A4I1 liegen bislang keine verlässlichen Daten vor, die das Ruhemembranpotential direkt im Dendriten zeigen. Pflüger (1984) gibt für deutlich axonale Ableitungen in Konnektiven ca.  $-50$  mV an. Sollte das Ruhemembranpotential im Dendriten ähnliche Werte aufweisen, wäre es kaum vorstellbar, dass Chlorid- oder Kaliumleitfähigkeiten ihre Umkehrpotentiale bei noch positiveren Werten haben. In diesem Fall ist es wahrscheinlicher, dass die gemessene Depolarisierung tatsächlich Ausdruck einer NO vermittelten Exzitation ist. Auch die gemessene Verringerung der EPSPs kann durch veränderte elektromotorische Kräfte oder Aktivierungskinetiken von Kanälen bei Depolarisierung zurückgeführt werden und spricht nicht gegen eine Exzitation (vgl. Abb. 3.17).

**NO-Pharmaka vermittelten entgegen gerichtete Effekte – Welcher Signalweg?:** Drei wesentliche Effekte wurden bei den Versuchen mit NO-Pharmaka beobachtet. (i) Während der Applikation exogenen NOs (DEA) wurde eine dominante Hemmung der AP-Antwort beobachtet (Abb. 312). (ii) Bei einem Drittel der Präparate bewirkte aber auch die Entfernung

---

von NO aus der Badlösung eine deutliche Hemmung (Abb. 3.13). (iii) Der irreversibel wirkende sGC Inhibitor ODQ führte zu einer Verstärkung der Habituation (Abb. 3.19).

Die Blockierung der NO-abhängigen sGC (iii) und das Entfernen exogenen NOs aus der Badlösung (ii) bewirkten gleich gerichtete Effekte. Sie könnten damit durch Hemmung auf sukzessiven Stufen derselben Signalkaskade (NO-sGC-cGMP) vermittelt werden. Dass die Badapplikation exogenen NOs (i) selbst eine Antwortverringering bewirkte, deutet auf einen (ii) und (iii) entgegen gerichteten Effekt hin. Einige Möglichkeiten, wie dieser Gegensatz zu erklären ist, sollen hier erläutert werden.

Die anatomischen Untersuchungen zeigen die Existenz von NO-Synthase im Umkreis verschiedener prothorakaler Kompartimente des sehr weiträumig verzweigenden A4I1 (Abb. 3.4). Es ist deshalb vorstellbar, dass endogene und lokal wirkende NO-Signale (vgl. Burette et al., 2002) in verschiedenen Projektionsgebieten des A4I1 unterschiedliche Wirkungen hervorrufen. So kann je nach Typ der von NO modulierten Synapsen, die NO-Wirkung verschieden sein (vgl. Aonuma & Newland, 2001). Die Applikation von exogenem NO auf das gesamte Ganglion könnte deshalb in verschiedenen A4I1-Projektionsgebieten verschiedene Synapsentypen oder auch verschieden wirkende präsynaptische Elemente des A4I1 modulieren. Dabei maskierte die bei globaler NO-Applikation dominante Hemmung (i) eine möglicherweise subtiler wirkende Erregung. Die Antwortverringering nach Entfernen von DEA aus der Badlösung (ii) und die in einigen Fällen während DEA-Applikation beobachtete kurzfristige Antworterhöhung vor einsetzender Hemmung (Abb. 3.14; Abb. 3.12 D) lassen dies möglich erscheinen.

Ein entscheidender Unterschied zwischen Versuchen mit DEA und ODQ war das verwendete Stimulusregime. Nur für Versuche mit ODQ wurden solche hochfrequenten Reize verwendet, die zu einer Habituation führten. Es ist deshalb vorstellbar, dass die NO-Signalkette über die sGC nur bei einer hohen Stimulusfrequenz, d.h. einer hohen Frequenz der Transmitterausschüttung, wirksam wird. So hängt beispielsweise eine Form NO-induzierter synaptischer Plastizität (Langzeitpotenzierung; LTP) im Hippocampus stark ab von der Frequenz synaptischer Übertragung (Bon & Garthwaite, 2001).

Eine wahrscheinliche Möglichkeit für die beobachteten entgegen gerichteten Effekte ist, dass NO über verschiedene Signalketten wirkte. Während der ODQ-Effekt auf die Habituation sGC/cGMP abhängig sein muss, kann die DEA-Applikation eine Aktivierung verschiedener NO abhängigen Signalkaskaden induzieren, beispielsweise über cGMP oder S-Nitrosylation; Ahern et al., 2002. Daneben zeigen verschiedene neuere Untersuchungen eine Wirkung von exogenem NO auf Adenosin vermittelte Signalketten (Dunwiddie & Masino, 2001). Für den

Hippocampus von Ratten beispielsweise zeigen Bon und Garthwaite (2001), dass die Applikation von DEA-NO über Adenosin eine reversible synaptische Depression bewirkt, was wiederum eine anhaltende NO-abhängige Potenzierung synaptischer Transmission auslöst. Das wahrscheinliche Ziel von NO bei solchen Prozessen ist die mitochondriale Cytochrom-C-Oxidase, die durch NO auch schon in *physiologisch normalen* NO-Konzentrationen inhibiert wird (*metabolic inhibition*, Brown & Cooper, 1994). Die Inhibition führt zur Freisetzung von Adenosin, welches in verschiedenen Verhaltenskontexten eine synaptische Depression, teils über retrograde Signalmechanismen bewirkt. Die Wirkung von Adenosin erfolgt dabei durch Bindung an Adenosin-Rezeptoren (Dunwiddie & Masino, 2001).

Ob ein vergleichbarer Mechanismus für die unter DEA beobachtete Hemmung verantwortlich ist, ist unklar. Der beobachtete Unterschied der Zeitverläufe (reversibel vs. irreversibel, vgl. Abb. 3.12) wäre dann auch durch eine unterschiedlich starke Hemmung der Cytochrom-C-Oxidase zu erklären. Deren Re-Aktivierungskinetik bei Auswaschung von DEA könnte beispielsweise abhängig vom physiologischen Status variieren.

Eine unterschiedlich schnelle Re-Aktivierung könnte auch der Grund dafür sein, dass eine nach Auswaschung von DEA einsetzende zweite Inhibition nur bei etwa 30 % der als reversibel klassifizierten, jedoch bei 70 % der als irreversibel klassifizierten Experimente festzustellen war (Abb. 3.13). Möglicherweise maskierte die schnelle Rückstellung der AP-Antwort bei reversiblen Verlauf den bei irreversiblen Verlauf deutlicher zu beobachtenden Effekt bei Auswaschung von DEA.

**Zusammenfassung und Ausblick:** Anatomische und pharmakologische Untersuchungen legen eine modulatorische Funktion von NO in einem mechanosensorischen windsensitiven System der Wanderheuschrecke (*Locusta migratoria*) nahe. NOS-Immunoreaktivität wurde sowohl im Umkreis dendritischer als auch axonaler Verzweigungen des A4I1 nachgewiesen. Wegen der Unklarheit über die effektive Wirkdistanz des diffusiblen Botenstoffs NO, wurde als aussagekräftiges anatomisches Indiz einer möglichen NO-Wirkung der Nachweis von uNOS-Immunoreaktivität auch in Submikrometernähe zum A4I1 erbracht. Neuartige Rekonstruktionsverfahren ermöglichten die Analyse der Verteilung von NO-Synthase (NOS) in definierten Volumen um die Oberfläche rekonstruierter Neuriten. Drastische Verteilungsunterschiede der NOS-Immunoreaktivität bei Betrachtung verschiedener Distanzvolumina wurden schon im Entfernungsbereich von nur 0,5-5  $\mu\text{m}$  festgestellt. Dieses

Resultat wurde diskutiert als Hinweis auf eine geringe effektive Wirkdistanz von NO im A4I1-Schaltkreis.

Das hier vorgestellte Verfahren macht wichtige vergleichende Untersuchungen möglich. Vorstellbar ist, die NOS-Verteilung in verschiedenen Distanzvolumina um eventuell standardisierte Neuronenmodelle zu analysieren. An solchen Modellen ließen sich Verteilung und Dichte von NO-Signalsendern sowohl in verschiedenen Neuropilbereichen als auch in verschiedenen Tiersystemen überprüfen und vergleichen. Damit könnten Erkenntnisse zu genellen Trends bei der räumlichen Verteilung von NO-Signal-Sendern gewonnen und Voraussagen über tatsächliche Wirkdistanzen von NO in unterschiedlichen Netzwerken getroffen werden.

Die hier vorgestellten pharmakologischen Untersuchungen konnten eine modulatorische Wirkung von NO auf die Windantwort und auf das Membranpotential des A4I1 zeigen. Das komplexe zeitliche Wirkschema des NO-Donors DEA deutete darauf hin, dass NO Effekte über verschiedene Signalkaskaden vermittelte. Die Inaktivierung eines einzelnen NO-Signalwegs durch Blockierung des NO-Empfängermoleküls (sGC) bewirkte eine stärkere Habituation der Windantwort des A4I1. Endogen synthetisiertes NO ist deshalb möglicherweise an einem Regulationsmechanismus beteiligt, welcher eine effektive synaptische Transmission während Phasen hoher Systembeanspruchung, beispielsweise im Flug, aufrechterhält.

### 3.4 Literatur

- Agard DA, Hiraoka Y, Shaw P, Sedat JW** (1989) Fluorescence microscopy in three dimensions. *Methods Cell Biol.* 30: 353-77.
- Ahern GP, Klyachko VA, Jackson MB** (2002) cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. *Trends Neurosci* 25:510-7.
- Aonuma H, Newland PL** (2002) Synaptic inputs onto spiking local interneurons in crayfish are depressed by nitric oxide. *J Neurobiol.* 52:144-55.
- Ballou DP, Zhao Y, Brandish PE, Marletta MA** (2002) Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12097-101.
- Barañano DE, Ferris CD, Snyder SH** (2001) Atypical neural messengers. *Trends Neurosci* 24:99-106.
- Bellamy TC, Garthwaite J** (2001) Sub-second kinetics of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, in intact cerebellar cells. *J Biol Chem* 276:4287-92.
- Bicker G, Schmachtenberg O, de Vente J.** (1996) The nitric oxide/cyclic GMP messenger system in olfactory pathways of the locust brain. *Eur J Neurosci* 8: 2635-43.
- Bicker G, Schmachtenberg O** (1997) Cytochemical evidence for nitric oxide/cyclic GMP signal transmission in the visual system of the locust. *Eur J Neurosci.* 9:189-93.
- Bicker G** (2001) Nitric oxide: an unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroïd insect. *Arch Insect Biochem Physiol.* 48: 100-10.
- Boehning D, Snyder SH** (2003) Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci* 26:105-31.
- Bon CL, Garthwaite J** (2001) Nitric oxide-induced potentiation of CA1 hippocampal synaptic transmission during baseline stimulation is strictly frequency-dependent. *Neuropharmacology* 40: 501-507.

**Bon CL, Garthwaite J** (2002) Adenosine acting on A1 receptors protects NO-triggered rebound potentiation and LTP in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87(4):1781-9.

**Boyle MB, Klein M, Smith SJ, Kandel ER** (1982) Serotonin increased intracellular  $Ca^{2+}$  transients in voltage-clamped sensory neurons of *Aplysia californica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7642-7646.

**Bredt DS, Snyder HS** (1989) Nitric Oxide Mediates Glutamate-Linked Enhancement of cGMP Levels in the Cerebellum *PNAS* 86: 9030-9033.

**Bredt DS, Snyder HS** (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:682-5.

**Bredt DS und Snyder SH** (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8:3-11.

**Brown GC, Cooper CE** (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 356: 295-8.

**Bucher, Dirk** (1996) Die Richtungssensitivität eines identifizierten windsensitiven Interneurons (A4I1) während der postembryonalen Entwicklung der Wandergeschrecke, *Locusta migratoria* L. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Freie Universität Berlin.

**Bucher D, Pflüger HJ** (2000) Directional sensitivity of an identified wind-sensitive interneuron during the postembryonic development of the locust. *J Insect Physiol.* 2000 Dec 1;46(12):1545-1556.

**Bullerjahn S, Pflüger HJ** (2003) The distribution of putative nitric oxide releasing neurones in the locust abdominal nervous system: a comparison of NADPHd histochemistry and NOS-immunocytochemistry. *Zoology* 106: 3-17

**Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HH, Valtschanoff JG** (2002) Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *J Neurosci* 22:8961-70.

- Burrows M, Pflüger HJ** (1992) Output connections of a wind sensitive interneurone with motor neurones innervating flight steering muscles in the locust. *J Comp Physiol [A]* 171:437-46.
- Burrows M** (1996) *The neurobiology of an insect brain*. New York: Oxford University Press.
- Bullock TH, Bennett MV, Johnston D, Josephson R, Marder E, Fields RD** (2005) Neuroscience. The neuron doctrine, redux. *Science* 310:791-3.
- Byrne JH** (1982) Analysis of synaptic depression contributing to habituation of gill-withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* 48:431-437
- Cary SP, Winger JA, Marletta MA** (2005) Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:13064-9.
- Castellucci VF, Kandel ER** (1974) A quantal analysis of the synaptic depression underlying habituation of the gill-withdrawn reflex in *Aplysia*. *Proc Nat Acad Sci USA* 71:504-8.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS** (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol* 274:27467-73.
- Colasanti M, Venturini G, Merante A, Musci G, Lauro GM** (1997) Nitric oxide involvement in *Hydra vulgaris* very primitive olfactory-like system. *J Neurosci* 17:493-9.
- Colasanti M, Venturini G** (1998) Nitric oxide in invertebrates. *Mol Neurobiol* 17:157-74.
- Davies S** (2000) Nitric oxide signalling in insects. *Insect Biochem Mol Biol* 30:1123-38.
- Dreyer J, Schleicher M, Tappe A, Schilling K, Kuner T, Kusumawidijaja G, Müller-Esterl W, Oess S, Kuner R.** (2004) Nitric oxide synthase (NOS)-interacting protein interacts with neuronal NOS and regulates its distribution and activity. *J Neurosci* 24(46):10454-65.

- Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH** (1991) Nitric oxide and NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7797–7801.
- Dawson TM, Snyder SH** (1994) Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 14:5147-59.
- Dunwiddie TV, Masino SA** (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55
- Elphick M, Williams L, Shea M** (1996) New features of the locust optic lobe: evidence of a role for nitric oxide in insect vision. *J Exp Biol* 199:2395-407.
- Elphick MR** (1997) Localization of nitric oxide synthase using NADPH diaphorase histochemistry. *Methods Mol Biol* 72:153-8.
- Ferrero R, Rodriguez-Pascual F, Miras-Portugal MT, Torres M** (1999) Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells: correlation with nitric oxide production. *Br J Pharmacol* 127:779-87.
- Forstermann U, Boissel JP und Kleinert H** (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12:773-90.
- Garthwaite J** (1995) Neural nitric oxide signalling. *Trends Neurosci* 18:51.
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, and Mayer B** (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* 48: 184-188.
- Gauglitz S, Pflüger HJ.** (2001) holinergic transmission via central synapses in the locust nervous system. *J Comp Physiol [A]* 187:825-36.
- Gibbs SM, Truman JW** (1998) Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron* 20:83-93.

- Gibson NJ, Rossler W, Nighorn AJ, Oland LA, Hildebrand JG, Tolbert LP (2001)** Neuron-glia communication via nitric oxide is essential in establishing antennal-lobe structure in *Manduca sexta*. *Dev Biol* 240:326-39.
- Haase A, Bicker G (2003)** Nitric oxide and cyclic nucleotides are regulators of neuronal migration in an insect embryo *Development* 130:3977-87.
- Hammer M, Menzel R (1995)** Learning and memory in the honeybee. *J Neurosci* 15:1617-30.
- Ignarro LJ, Byrnes RE, Wood KS (1987)** Endothelium-dependent modulation of cyclic GMP levels and intrinsic smooth muscle tone in isolated bovine intrapulmonary artery and vein. *Circ Res* 60:82-90.
- Jacoby S, Sims RE, Hartell NA (2001)** Nitric oxide is required for the induction and heterosynaptic spread of long-term potentiation in rat cerebellar slices. *J Physiol* 535:825-39.
- Jones, I.W. and Elphick, M.R. (1999)** Dark-dependent soluble guanylyl cyclase activity in locust photoreceptor cells. *Proc Roy Soc Lond B* 266:413-419.
- Katzoff A, Ben-Gedalya T, Susswein AJ (2002)** Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in *Aplysia*. *J Neurosci* 22:9581-94.
- Keller HE (1995)** Objective lenses for confocal microscopy. In: J. B. Pawley (Hrsg.), *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum Press, New York, London, 111-126.
- Klee S, Thurm U (1986)** Mechanosensitive Fadenhaar-Sensillen mit zwei Sinneszellen von *Locusta migratoria* L. *Verh Dtsch Zool Ges* 79: 220.
- Korneev SA, Straub V, Kemenes I, Korneeva EI, Ott SR, Benjamin PR, O'Shea M (2005)** Timed and targeted differential regulation of nitric oxide synthase (NOS) and

anti-NOS genes by reward conditioning leading to long-term memory formation. *J Neurosci* 25:1188-92.

**Kutsch, W. and Hemmer, W** (1994) Ontogenetic studies of flight initiation in *Locusta*: Wind response of an identified interneurone (TCG). *J Insect Physiol* 40:97-106

**Kutsch W, Stevenson PA** (1988). Demonstration of the adult-specific flight motor pattern in isolated ganglia and all instars of *Locusta*. *Acta Biol. Hung.* 36, 545-558.

**Lancaster JR** (1997) A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1:18-30.

**Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR** (1998) Diffusion-Limited Reaction of Free Nitric Oxide with Erythrocytes. *JR J Biol Chem* 273:18709-18713.

**Luckhart S, Rosenberg R** (1999) Gene structure and polymorphism of an invertebrate nitric oxide synthase gene. *Gene* 232:25-34.

**Maffei A, Prestori F, Shibuki K, Rossi P, Taglietti V, D'Angelo E** (2003) NO enhances presynaptic currents during cerebellar mossy fiber-granule cell LTP. *J Neurophysiol* 90:2478-83.

**Malinski T, Taha Z, Grunfeld S, Patton S, Kapturczak M, Tomboulian P** (1993) Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun* 193:1076-82.

**Maragos CM, Morley D, Wink DA, Dunams TM, Saavedra, JE, Hoffman A, Bove AA, Isaac L, Hrabie JA, Keefer LK** (1991) Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J Med Chem* 34: 3242–3247.

**Menzel R, Müller U** (1996) Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. *Annu Rev Neurosci* 19:379-404.

- Meuser S, Pflüger HJ.** (1998) Programmed cell death specifically eliminates one part of a locust pleuroaxillary muscle after the imaginal moult. *J Exp Biol* 201:2367-82.
- Micheva KD, Buchanan J, Holz RW, Smith SJ** (2003) Retrograde regulation of synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Nat Neurosci* 6:925-32.
- Moro V, Badaut J, Springhetti V, Edvinsson L, Seylaz J, Lasbennes F.** (1995) Regional study of the co-localization of neuronal nitric oxide synthase with muscarinic receptors in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*. 69:797-805.
- 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(12):7521-8.
- Namiki S, Kakizawa S, Hirose K, Iino M** (2005) NO signalling decodes frequency of neuronal activity and generates synapse-specific plasticity in mouse cerebellum. *J Physiol* 566:849-63.
- O'Shea M, Colbert R, Williams L, Dunn S** (1998) Nitric oxide compartments in the mushroom bodies of the locust brain. *Neuroreport* 9:333-6.
- Ott SR, Burrows M** (1998) Nitric oxide synthase in the thoracic ganglia of the locust: distribution in the neuropiles and morphology of neurones. *J Comp Neurol*. 395:217-30.
- Ott SR, Burrows M** (1999) NADPH diaphorase histochemistry in the thoracic ganglia of locusts, crickets, and cockroaches: species differences and the impact of fixation. *J Comp Neurol* 410:387-97.
- Ott SR, Jones IW, Burrows M, Elphick MR** (2000) Sensory afferents and motor neurons as targets for nitric oxide in the locust. *J Comp Neurol*. 422:521-32.
- Ott SR, Elphick MR** (2002) Nitric oxide synthase histochemistry in insect nervous systems: methanol/formalin fixation reveals the neuroarchitecture of formaldehyde-sensitive NADPH diaphorase in the cockroach *Periplaneta americana*. *J Comp Neurol* 448:165-185.

- Ott SR, Elphick MR** (2003) New techniques for whole-mount NADPH-diaphorase histochemistry demonstrated in insect ganglia. *J Histochem Cytochem.* 51:523-32.
- Ott SR, Delago A, Elphick MR** (2004) An evolutionarily conserved mechanism for sensitization of soluble guanylyl cyclase reveals extensive nitric oxide-mediated upregulation of cyclic GMP in insect brain. *Eur J Neurosci* 20:1231-44.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S** (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526.
- Palumbo A, Di Cosmo A, Gesualdo I, d'Ischia M** (1997) A calcium-dependent nitric oxide synthase and NMDA R1 glutamate receptor in the ink gland of *Sepia officinalis*: a hint to a regulatory role of nitric oxide in melanogenesis? *Biochem Biophys Res Commun* 235:429-32.
- Palumbo A** (2005) Nitric oxide in marine invertebrates: A comparative perspective. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 142:241-8
- Park JH, Straub VA, O'Shea M** (1998) Anterograde signaling by nitric oxide: characterization and in vitro reconstitution of an identified nitrenergic synapse *J Neurosci* 18:5463-76.
- Pawley, JB** (1995) *Handbook of biological confocal microscopy.* Plenum Press, New York, London.
- Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS** (2001) Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 409(6820):622-6.
- Pfeifer A, Ruth P, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Hofmann F** (1999) Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135:105-49.
- Philippides A, Husbands P, O'Shea M** (2000) Four-dimensional neuronal signaling by nitric oxide: a computational analysis. *J Neurosci* 20:1199-207.

- Philippides A, Ott SR, Husbands P, Lovick TA, O'Shea M** (2005) Modeling cooperative volume signaling in a plexus of nitric oxide synthase-expressing neurons. *J Neurosci* 25(28):6520-32.
- Pflüger HJ, Tautz J** (1982) Air movement sensitive hairs and interneurons in *Locusta migratoria*. *J Comp Physiol* 145:369-380.
- Pflüger HJ** (1984) The large fourth abdominal intersegmental interneuron: a new type of wind-sensitive ventral cord interneuron in locusts. *J Comp Neurol* 222:343-57.
- Pflüger HJ, Burrows M** (1990) Synaptic Connections of Different Strength Between Wind-sensitive Hairs and an Identified Projection Interneuron in the Locust *Eur J Neurosci* 2(12):1040-1050.
- Pflüger HJ, Hurdelbrink S, Czjzek A, Burrows M** (1994) Activity-dependent structural dynamics of insect sensory fibers. *J Neurosci* 14:6946-55.
- 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.
- Scholz NL, Chang ES, Graubard K, Truman JW** (1998) The NO/cGMP pathway and the development of neural networks in postembryonic lobsters. *J Neurobiol* 34:208-26.
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B** (1996) Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 50:1-5.
- Schulz S, Chinkers M, Garbers DL** (1989) The guanylate cyclase/receptor family of proteins. *FASEB J* 3:2026-35.
- Schweighofer N, Ferriol G** (2000) Diffusion of nitric oxide can facilitate cerebellar learning: A simulation study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10661-5.

**Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ** (1992) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267:15274-6.

**Shaw AW, Vosper AJ** (1977) Solubility of nitric oxide in aqueous and non-aqueous solvents. *J Chem Soc Faraday Trans 8*: 1239-1244.

**Sheppard CJR, Gan X, Gu M, Roy M** (1995). Signal-to-noise ratio in confocal microscopes. In: J. B. Pawley (Hrsg.), *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum Press, New York, London, S. 363-371.

**Stein W, Eberle CC, Hedrich UB** (2005) Motor pattern selection by nitric oxide in the stomatogastric nervous system of the crab. *Eur J Neurosci* 21:2767-81.

**Stengl M, Zintl R, De Vente J, Nighorn A** (2001) Localization of cGMP immunoreactivity and of soluble guanylyl cyclase in antennal sensilla of the hawkmoth *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res* 304:409-21.

**Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR Jr** (2001) The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:355-60.

**Thompson RF, Spencer WA** (1966) Habituation: a model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychol Rev* 73:16-43.

**Truman JW, De Vente J, Ball EE** (1996) Nitric oxide-sensitive guanylate cyclase activity is associated with the maturational phase of neuronal development in insects. *Development*. 122:3949-58.

**Vaandrager AB, de Jonge HR** (1996) Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem*. 157:23-30.

**Watson AHD, Pflüger HJ** (1984) The ultrastructure of prosternal sensory hair afferents within the locust central nervous system. *Neuroscience* 11:269-279.

**Wildemann B, Bicker G** (1999) Nitric oxide and cyclic GMP induce vesicle release at *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurobiol* 39:337-46.

**Zabel U, Kleinschnitz C, Oh P, Nedvetsky P, Smolenski A, Müller H, Kronich P, Kugler P, Walter U, Schnitzer JE, Schmidt HH** (2002) Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol* 4:307-11.

**Zayas RM, Qazi S, Morton DB, Trimmer BA** (2000) Neurons involved in nitric oxide-mediated cGMP signaling in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* 419:422-38.

**Zayas RM, Qazi S, Morton DB, Trimmer BA** (2002) Nicotinic-acetylcholine receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathway in insect neurons. *J Neurochem* 83:421-31.