

Synaptogenese

Intravitale Bildgebung in *Drosophila*-Larven

TILL F. M. ANDLAUER¹, STEPHAN J. SIGRIST²

¹BIO-IMAGING CENTER, RUDOLF-VIRCHOW-ZENTRUM/DFG-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR EXPERIMENTELLE BIOMEDIZIN, UNIVERSITÄT WÜRZBURG

²INSTITUT FÜR BIOLOGIE/GENETIK, FU BERLIN

Mithilfe intravitraler Bildgebung können ausgewählte Proteine während der Ausbildung und Reifung von Synapsen in intakten, lebenden *Drosophila*-Larven verfolgt werden.

Intravital imaging allows for tracking of selected proteins during synapse development and maturation in intact, living *Drosophila* larvae.

■ Chemische Synapsen entwickeln sich unterschiedlich schnell in Zellkultur und in organotypischen Schnittkulturen [1]. Es ist also wahrscheinlich, dass sich die Steuerung

der Synaptogenese zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Situationen unterscheidet. Die Feinheiten der räumlichen und zeitlichen Entwicklung von Synapsen sind *in vivo* noch weitgehend unbekannt. Dieses Wissen ist aber von großer Bedeutung für unser Verständnis der Entwicklung des Nervensystems sowie der langfristigen Informationsspeicherung im Nervensystem. Nicht-invasive, direkte Bildgebung im intakten Organismus (intravitale Bildgebung) über ausgedehnte Zeiträume (Stunden bis Tage) kann zum besseren Verständnis der Ausbildung und Reifung von Synapsen unter *in vivo*-Bedingungen beitragen.

Während der letzten Jahre wurde in der Arbeitsgruppe von Stephan Sigrist eine Methode entwickelt, die diese Form der Bildgebung in *Drosophila*-Larven ermöglicht [2–4].

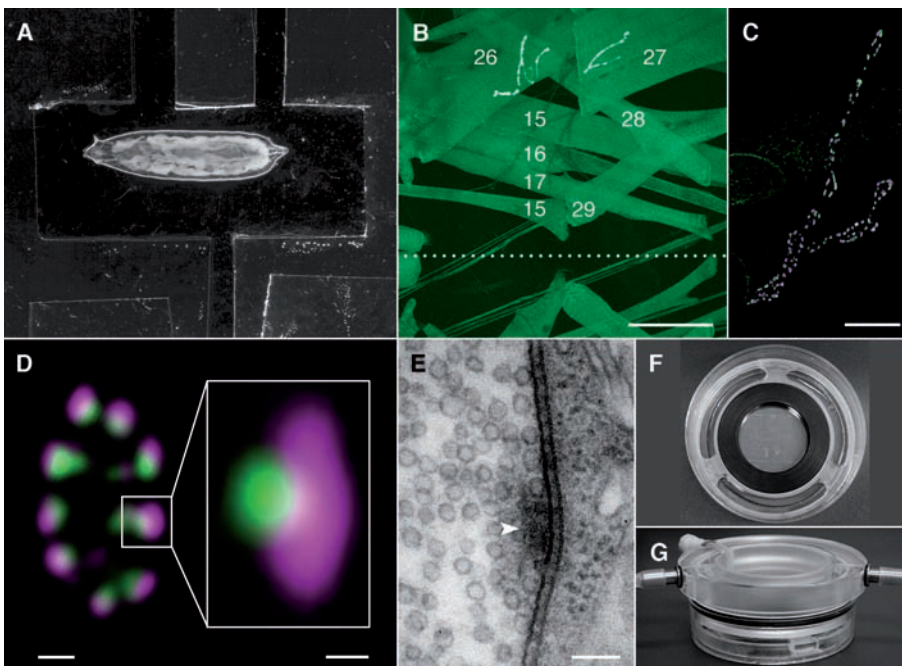
Neuromuskuläre Synapsen in *Drosophila*-Larven

Die neuromuskulären Synapsen (NMJs) von *Drosophila*-Larven sind ein führendes Modellsystem zum Studium der Synaptogenese und ihrer molekularen Grundlagen.

An einer NMJ reihen sich einzelne kugelförmige Auftreibungen (Boutons) aneinander. Diese Verdickungen des Axons beinhalten die synaptischen Übertragungsstrukturen (**Abb. 1C**). Ein einzelner Bouton kann bis zu 5 µm groß sein und enthält bis zu 40 individuelle Synapsen (**Abb. 1D**). Die grundsätzliche Form einer NMJ wird zwar schon im Embryonalstadium etabliert, die Boutons wachsen jedoch kontinuierlich, und während der gesamten Lebenszeit einer Larve werden neue Boutons und Synapsen gebildet.

Jedes Hemisegment von *Drosophila*-Larven enthält 30 stereotypisch arrangierte Muskeln, die jeweils von ein bis zwei Motorneuronen innerviert werden (**Abb. 1B**). Dadurch können einzelne NMJs in verschiedenen Tieren und zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung verlässlich identifiziert werden.

Synapsen bestehen aus einer präsynaptischen aktiven Zone, einer postsynaptischen



▲ **Abb. 1:** **A**, Eine *Drosophila*-Larve in einer Bildgebungskammer. **B**, Muskelfasern in einem abdominalen Segment ventral, von außen betrachtet, visualisiert durch Expression von *dlgS97-gfp*. Die neuromuskulären Synapsen (NMJs) an den Muskeln 26 (VA1) und 27 (VA2) wurden hervorgehoben, die ventrale Mittellinie ist gepunktet dargestellt. Maßstabsbalken: 100 µm. **C**, Struktur einer larvalen NMJ an Muskel 27. Magenta: DGluRIIA, grün: DGluRIIB. Maßstabsbalken: 10 µm. **D**, immunhistochemische Färbung eines Boutons und einer einzelnen Synapse in lateraler Ansicht. Grün: Bruchpilot^{Nc82}, magenta: Anti-DGluRIID. Maßstabsbalken Bouton: 1 µm, Synapse: 100 nm. **E**, Ultrastruktur einer präsynaptischen aktiven Zone. Pfeil: T-Bar; Maßstabsbalken: 100 nm. **F**, Bildgebungskammer, geöffnet in Aufsicht. Die Larve liegt in der Mitte zwischen zwei Deckgläsern und wird von einem Eisenring leicht nach unten gedrückt. **G**, luftdicht verschlossene Kammer. Eine Luft-Desfluran-Mischung wird zur Anästhesierung durch die Kammer geströmt.

Dichte und einem synaptischen Spalt, der beide Strukturen voneinander trennt (**Abb. 1E**). Die aktive Zone ist die präsynaptische Region, in der synaptische Vesikel mit der Membran fusionieren und Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ausschütten. Mit der aktiven Zone assoziiert findet sich eine proteinreiche Zytomatrix der aktiven Zone (CAZ). Die CAZ besteht aus mehreren präsynaptischen Proteinen, die eine Gerüstfunktion für weitere Proteine sowie synaptische Vesikel ausüben [5].

Die meisten Synapsen verfügen über elektronendichte Projektionen an der aktiven Zone [6], in *Drosophila* wird diese Struktur T-Bar genannt (**Abb. 1E**). Das präsynaptische Protein Bruchpilot (Brp) ist ein essenzieller Bestandteil dieses T-Bars und Teil der CAZ [7, 8]. Ein weiteres Protein der CAZ ist DLiprin- α , das mit verschiedenen anderen Proteinen interagiert und auch beim Transport synaptischer Vesikel eine Rolle spielt [1].

An *Drosophila*-NMJs ist der erregende Transmitter Glutamat, die ionotropen Glutamatrezeptoren bestehen aus vier Untereinheiten [9]. DGluRIID, DGluRIIE und DGluRIII sind essenzielle Untereinheiten aller Glutamatrezeptoren; DGluRIIA ist eine Untereinheit, die an jungen Synapsen vorherrscht. Der Anteil der Untereinheit DGluRIIB steigt jedoch gegenüber DGluRIIA während der über viele Stunden fortschreitenden Reifung der Synapsen an [4].

Intravitale Bildgebung

Für die *in vivo*-Bildgebung ist es notwendig, fluoreszenzmarkierte Proteine direkt im lebenden Tier zu exprimieren. In *Drosophila* wird zur gewebe- oder zelltypspezifischen Expression transgener Konstrukte in der Regel das aus der Hefe stammende GAL4-UAS-System verwendet.

Normalerweise wird die Kutikula der Larven dorsal geöffnet, um elektrophysiologische Messungen oder *in vivo* Bildgebung durchführen zu können. Für einige Stunden können die Larven in diesem Zustand in physiologischer Lösung untersucht werden, verlässliche Studien über

einen längeren Zeitraum hinweg sind jedoch nicht möglich.

Bei der intravitalem *in vivo*-Bildgebung ist es dagegen nicht notwendig, die Kutikula zu öffnen. Die Larve wird in einer Bildgebungskammer leicht gegen ein Deckglas gepresst (**Abb. 1F**) und ist in einen dünnen Film Mineralöl eingebettet, das einen ähnlichen Brechungsindex wie die wachsartige Kutikula hat. Diese erscheint dadurch transparent, und es wird möglich, Konfokalmikroskopie mit hochauflösenden Ölobjektiven mit hoher numerischer Apertur ($NA > 1,3$) durchzuführen (**Abb. 1A**). Dadurch wird eine sehr hohe Lichtausbeute erreicht.

Um zu verhindern, dass Muskelkontraktionen die Bildgebung behindern, muss die Larve in der luftdicht abgeschlossenen Bildgebungskammer mit einem Inhalationsnarkotikum betäubt werden (**Abb. 1F, G**). Die Larve wird zwischen verschiedenen Experimenten aufgeweckt, aus der Kammer entnommen und kann sich in dieser Zeit frei im Futterbrei bewegen. Die Bildgebung unter Narkose wird so kurz wie möglich gehalten (fünf bis 30 Minuten).

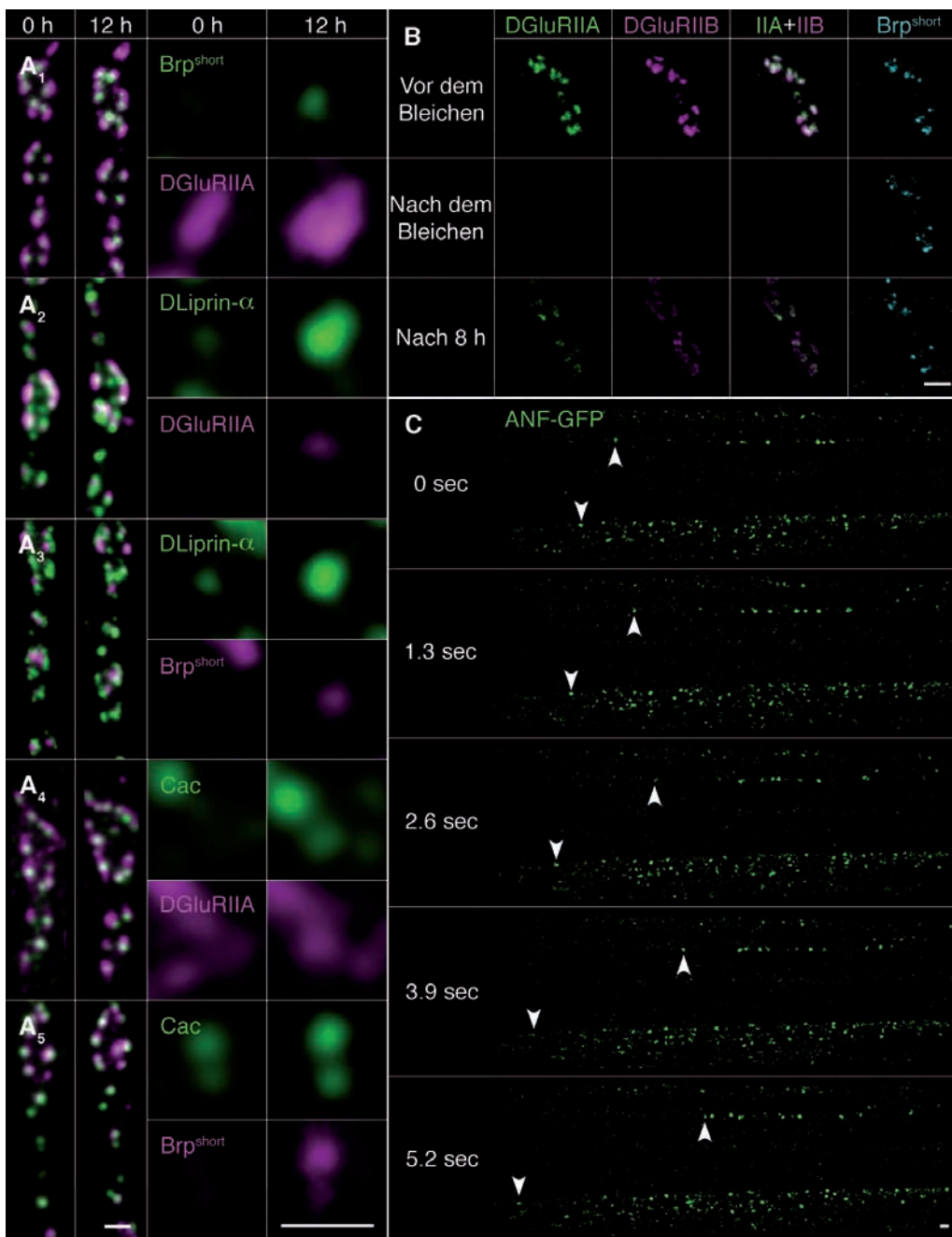
Bei der intravitalem Bildgebung werden nahe an der Kutikula liegende NMJs an ventralen Muskelfasern untersucht (z. B. NMJs an den Muskeln 26 und 27 in **Abb. 1B**). Im Unterschied dazu werden bei herkömmlicher Bildgebung NMJs an den innersten Muskeln des Hautmuskelschlauchs betrachtet, die in einer dorsal geöffneten Larve oben liegen (in der Regel NMJs an den Muskeln 4 oder 6/7).

Mit unserer Messeinrichtung wird eine Auflösung erreicht, bei der einzelne präsynaptische aktive Zonen (ca. 250 nm im Durchmesser) und postsynaptische Dichten (ca. 500 nm) über mehrere Tage hinweg verfolgt werden können.

Anwendungsbeispiele

Die Anwendungsmöglichkeiten intravitalem Bildgebung reichen von der Untersuchung axonalen Transports bis zum Studium der Umsatzkinetik von Proteinen an Synapsen.

In **Abbildung 2A** wird die zeitliche Abfolge verschiedener synaptischer



▲ **Abb. 2:** **A**, Die Akkumulation von synaptischen Proteinen *in vivo*. Links: Ausschnitt von NMJs an Muskel 26 zu zwei 12 Stunden auseinander liegenden Zeitpunkten. Die Aufnahmen von jeweils zwei Proteinen sind übereinander gelegt. Rechts: vergrößerter Ausschnitt derselben NMJs in den Einzelkanälen. A₁ bis A₅ zeigen unterschiedliche Tiere. Maßstabsbalken: 1 µm. **B**, *in vivo*-FRAP-Experiment mit den Rezeptoruntereinheiten DGLuRIIA-GFP, DGLuRIIB-mRFP und Brp(Bruchpilot)^{short}-Cerulean. Aufnahmen direkt vor, direkt nach sowie acht Stunden nach dem Bleichen der Glutamaterezeptoruntereinheiten. Maßstabsbalken: 2 µm. **C**, axonaler Transport von neuropeptidergen Vesikeln. Der antero- und retrograde Transport von ANF-GFP-markierten Vesikeln kann verfolgt werden. Pfeile: zwei gut erkennbare Vesikel. Maßstabsbalken: 1 µm.

Proteine während der Etablierung von einzelnen Synapsen dargestellt. Jeweils zwei fluoreszenzmarkierte Proteine wurden im Abstand von zwölf Stunden betrachtet. So kann beobachtet werden, wie oft ein Protein zum

ersten Zeitpunkt einzeln auftritt und wie oft zum zweiten Zeitpunkt auch das andere Protein an derselben Synapse erscheint. Aus der Analyse der Aufnahmen wird deutlich: Bruchpilot erscheint nach der Glutamat-Rezeptorunter-

einheit DGLuRIIA (**Abb. 2A₁**), DLiprin- α jedoch sowohl vor den Rezeptoren (**Abb. 2A₂**) als auch vor Bruchpilot (**Abb. 2A₃**). Calciumkanäle treten nach Glutamaterezeptoren (**Abb. 2A₄**), aber vor Bruchpilot auf (**Abb. 2A₅**). Daraus

ergibt sich die folgende zeitliche Reihenfolge: DLiprin- α , Glutamaterezeptoren, Calciumkanäle, Bruchpilot. Eine detailliertere Analyse in dieser Form wurde kürzlich publiziert [7].

Fluoreszenz-Bleich-Experimente (FRAP-Experimente) sind besonders geeignet, um dynamische Umverteilungen von Proteinen zu visualisieren. Hierbei wird das fluoreszenzmarkierte Protein in einem ausgewählten Bereich mit starkem Laserlicht gebleicht und danach die Inkorporation ungebleichten (neuen) Proteins in diesem Bereich dynamisch verfolgt. Ein entsprechendes Beispiel wird in **Abbildung 2B** gezeigt: Die mit unterschiedlichen Fluorophoren markierten Rezeptoruntereinheiten DGLuRIIA und DGLuRIIB werden gebleicht, Bruchpilot dient als Referenz. Acht Stunden später kann beobachtet werden, an welchen Synapsen neue, fluoreszenzmarkierte Untereinheiten eingebaut wurden [4].

Es ist jedoch auch möglich, schnelle Prozesse wie axonalen Transport zu untersuchen. Es stellt dabei keine Schwierigkeit dar, mit einem Konfokalmikroskop im intakten Tier bis zu den tief im Inneren des Körpers liegenden Nerven vorzudringen und dort die Bewegung von Vesikeln zu visualisieren. Ein Marker für neuropeptiderge Vesikel in *Drosophila* ist ANF-GFP (*atrial natriuretic peptide*) [10]. Antero- und retrograde Transport ANF-GFP-positiver Vesikel in Nerven wird in **Abbildung 2C** gezeigt.

Intravitale Bildgebung in *Drosophila*-Larven stellt eine einzigartige Möglichkeit dar, Proteine über lange Zeiträume hinweg in einem intakten Tier zu verfolgen.

Literatur

- [1] Oswald D, Sigrist SJ (2009) Assembling the presynaptic active zone. *Curr Opin Neurobiol* 19:311–318
- [2] Fügler P, Behrends LB, Mertel S et al. (2007) Live imaging of synapse development and measuring protein dynamics using two-

- color fluorescence recovery after photo-bleaching at *Drosophila* synapses. Nat Protoc 2:3285–3298
- [3] Rasse TM, Fouquet W, Schmid A et al. (2005) Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation *in vivo*. Nat Neurosci 8:898–905
- [4] Schmid A, Hallermann S, Kittel RJ et al. (2008) Activity-dependent site-specific changes of glutamate receptor composition *in vivo*. Nat Neurosci 11:659–666
- [5] Schoch S, Gundelfinger ED (2006) Molecular organization of the presynaptic active zone. Cell Tissue Res 326:379–391
- [6] Zhai RG, Bellen HJ (2004) The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. Physiology (Bethesda) 19:262–270
- [7] Fouquet W, Oswald D, Wichmann C et al. (2009) Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. J Cell Biol 186:129–145
- [8] Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM et al. (2006) Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. Science 312:1051–1054
- [9] Qin G, Schwarz T, Kittel RJ et al. (2005) Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*. J Neurosci 25:3209–3218
- [10] Rao S, Lang C, Levitan ES et al. (2001) Visualization of neuropeptide expression, transport, and exocytosis in *Drosophila melanogaster*. J Neurobiol 49:159–172

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Stephan Sigrist
 Freie Universität Berlin
 Institut für Biologie/Genetik
 Takustraße 6
 D-14195 Berlin
 Tel.: 030-838-56940
 stephan.sigrist@fu-berlin.de

AUTOREN



Stephan Sigrist

Jahrgang 1967. 1986–1988 Chemiestudium, TU Berlin. 1988–1993 Biochemiestudium, Universität Tübingen. 1993–1997 Promotion am Friedrich-Miescher-Labor der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen. 1997–2000 Postdoc bei Prof. Dr. Schuster am MPI Tübingen. 2001–2006 Leiter der Nachwuchs-Forschungsgruppe „Neuroplasticity“, European Neuroscience Institute Göttingen. 2006–2008 Professur für Experimentelle Biomedizin und Bio-Imaging am Rudolf-Virchow-Zentrum, Universität Würzburg. Seit 2008 Professur für Genetik, Institut für Biologie, FU Berlin.



Till Andlauer

Jahrgang 1979. 2000–2007 Biologiestudium an den Universitäten Freiburg und Stockholm, Diplomarbeit bei Prof. Dr. Fischbach in Freiburg. Seit 2007 Doktorand bei Prof. Dr. Sigrist in Würzburg.