



Dem Innenleben der Synapsen auf der Spur

Stephan J. Sigrist und Carolin Wichmann

Zusammenfassung

Chemische Synapsen stellen zentrale Elemente sowohl für Übertragung als auch Speicherung von Informationen in allen Nervensystemen inklusive unseres Gehirns dar. Sie fungieren als schnelle, hochkontrollierte und adaptive Kommunikationsstrukturen, an denen synaptische Vesikel mit spezialisierten Zellmembranen innerhalb von Millisekunden zur Fusion gebracht werden. Diese Leistungen der Synapsen werden durch eine komplexe hochgeordnete Proteinarchitektur (Zytomatrix) ermöglicht, deren Studium bis vor Kurzem eine ausschließliche Domäne der Elektronenmikroskopie war. *Drosophila*-Synapsen zeigen zum einen eine ausgeprägte Zytomatrix (T-bar) und erlauben gleichzeitig die effektive Anwendung genetischer Techniken beim funktionellen Studium dieser Strukturen. Der Artikel illustriert Prinzip und Anwendung unseres methodischen Spektrums beim Studium der molekularen Architektur von *Drosophila*-Synapsen. Hierbei spielt das Aufkommen hochauflösender Verfahren modernster Lichtmikroskopie, die in den letzten Jahren die Auflösungsschärfe bis zu 10-fach steigern konnten, eine Schlüsselrolle.

Abstract

Bringing light to the inner life of synapses.

Chemical synapses are pivotal for information transfer and storage within neuronal circuitry. Same time, various diseases of the nervous system most likely take their origin in disturbances of synapse structure and function. Synapses are very fast, extremely controlled and effective communication devices, with synaptic vesicles fusing at specialized membrane domains associated with a highly-ordered protein architectures (cytomatrices) traditionally seen by electron microscopy. *Drosophila* synapses with prominent cytomatrices called T-bars per se provide a highly suitable model system to apply genetic analysis to the roles of these protein architectures. We here describe the principles behind these techniques as well as their application to the analysis of the molecular architecture of the synapse. Thereby, the advent of super-resolution light microscopy methods yielding 2-10 fold higher resolution than conventional microscopy proved to be important.

Keywords: synapse; active zone; learning and memory; *in vivo* imaging; *Drosophila*

Synapsen: Grundsätzliche Bedeutung

Das Zentralnervensystem (ZNS) besteht aus einer enormen Anzahl von Nervenzellen (Neuronen), welche in Antwort auf externe oder interne Stimuli Informationen prozessieren, um schlussendlich adäquate Verhaltensreaktionen des Körpers abzuleiten. Gleichzeitig werden Informationen gespeichert, um zukünftige Reaktionen des Körpers zu optimieren (Lern- und Gedächtnisprozesse).

Die Kommunikation zwischen Neuronen wird weitgehend von chemischen "Synapsen" getragen. Charles Scott Sherrington prägte diesen Begriff anno 1897, der sich aus dem griechischen "syn" für "zusammen" und "hapsis" für "Verbindung" aufbaut. Synapsen repräsentieren interzelluläre Kontaktstellen,

mittels welcher Neurone mit ihren Partnerzellen (typischerweise andere Neurone, aber auch Muskel oder endokrine Zellen) kommunizieren. Der schnelle Informationsfluss zwischen prä- und postsynaptischer Zelle wird hierbei durch elektrische Ströme vermittelt. Der Strom kann hierbei direkt von einer Zelle zur anderen fließen (elektrische Synapse). Chemische Synapsen hingegen benutzen einen intermediären Schritt, der die Freisetzung und Detektion chemischer Transmittersubstanzen beinhaltet. Zudem sind chemische Synapsen in der Lage, die Stärke der synaptischen Kommunikation stark zu variieren. Hierdurch können chemische Synapsen (von hieran einfach „Synapsen“ genannt) Information filtern, integrieren und modifizieren, wodurch sie

zu Schlüsselkomponenten der komplexen Hirnprozesse werden.

Das menschliche Gehirn beinhaltet etwa 10^{11} Neurone, welche durch etwa 10^{15} Synapsen verknüpft sind. Komplexe genetische Programme steuern die Hirnentwicklung dadurch, dass sie spezifischen Populationen von Nervenzellen spezifische zelluläre Identität verleihen (es werden mindestens einige Dutzend zum Teil sehr verschiedener Typen von Neuronen unterschieden). Neuronale Identität wiederum ist Voraussetzung dafür, die hochkomplexen synaptischen Verbindungen in einer zeitlich-räumlich adäquaten Weise auszubilden. Als ob diese ungeheure Komplexität nicht genug Herausforderung für die Neurobiologen wäre, sind Synapsen in keinsten Weise statische Elemente. Vielmehr kann die Übertragungsstärke der Synapsen im aktiven Nervensystem moduliert werden, ein Prozess der als „synaptische Plastizität“ bezeichnet wird. Die Idee, dass Lernprozesse durch plastische Veränderungen der Synapsenstärke vermittelt werden könnten, und dass Gedächtnisprozesse auf deren langfristiger Konsolidierung beruhen könnten, wurde erstmalig 1894 von Santiago Ramón y Cajal formuliert. Systematische Studien zur Beziehung zwischen synaptischer Plastizität und Lern- und Gedächtnisprozessen wurden am Nervensystem der Fruchtfliege *Drosophila*, der Meeresschnecke *Aplysia* und spezifischen Gedächtnis-relevanten Formationen des Säugerhirns (Hippokampus, Amygdala) durchgeführt. Zusammengekommen konnte eine kausale Beziehung zwischen beiden Phänomenen sehr wahrscheinlich gemacht werden.

Die weitere Abklärung der molekularen Grundlagen des Gedächtnisses ist ein zentrales Anliegen der grundlagenwissenschaftlichen Arbeit an Synapsen. Darüber hinaus sind Synapsen aber auch wichtige Zielstrukturen bei Erkrankungen des Nervensystems. Es ist wahrscheinlich, dass schon subtile ererbte Defizite der Synapsenfunktion Autismus provozieren können. Weiterhin scheinen Defekte an Synapsen auch eine wichtige Komponente bei der Ausbildung degenerativer Erkrankungen des Nervensystems, inklusive der gesellschaftlich besonders bedeutsamen Parkinsonschen und Alzheimerschen Erkrankung, darzustellen.

Analyse synaptischer Funktion und Struktur

Durch Verbesserung der Empfindlichkeit biochemischer Techniken („Proteomics“) wurde eine umfangreiche Liste synaptischer Proteine erarbeitet (Jin und Garner, 2008; Sigrist und Schmitz, 2010). Zum vertieften

Spektrum Sachbücher

Bildungsfutter und Lesespaß in einem!

► Die neue Welt der personalisierten Medizin



NEU

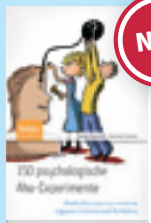
1. Aufl. 2011, 360 S.,
34 Abb., geb. m. SU
ISBN 978-3-8274-2777-9
► € (D) 24,95 | € (A) 25,65
*sFr 31,50

Francis S. Collins

Meine Gene – mein Leben

Passgenaue Diagnosen, individuell abgestimmte Therapien, eine für den Einzelnen maßgeschneiderte Medizin? Das ist keine ferne Vision mehr, sondern die sog. personalisierte Medizin rückt immer näher. Francis Collins' Buch ist eine Einladung, sich mit dieser neuen Welt – ihren Grundlagen wie ihren Perspektiven – auseinanderzusetzen.

► Warum erscheint uns die Barbiepuppe als schön?



NEU

1. Aufl. 2011, 385 S.,
10 Abb., kart.
ISBN 978-3-8274-2843-1
► € (D) 24,95 | € (A) 25,65
*sFr 31,50

Serge Ciccott

150 psychologische Aha-Experimente

In 150 Experimenten geht der Autor unterhaltsamen Fragen zum menschlichen Erleben und Verhalten nach: Warum erscheint uns die Barbiepuppe als schön? Was bringt uns zum Lachen? Oder warum können wir im Stimmengewirr einer Party hören, was unser Gesprächspartner sagt? Psychologie mit Aha-Effekt – wissenschaftlich und spannend!

► Warum wir Gesellschaft so sehr brauchen



NEU

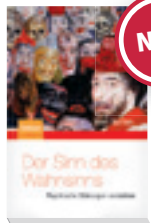
1. Aufl. 2011, 385 S., 15 Abb., kart.
ISBN 978-3-8274-2864-6
► € (D) 19,95 | € (A) 20,51 | *sFr 25,00

John T. Cacioppo / William Patrick

Einsamkeit

Einsamkeit ist ein erstaunlich verbreitetes und für die Betroffenen wie auch für die Gesellschaft sehr ernstes Problem. Einfühlsam und sehr fachkundig erläutern John Cacioppo, der weltweit bedeutendste Forscher zum Thema „Einsamkeit“, und William Patrick in diesem Buch, wie Einsamkeit entsteht und welche negativen Auswirkungen das Gefühl der Einsamkeit zur Folge haben kann. Sie zeigen aber auch auf, wie man ihr entrinnen kann.

► Was es heißt, verrückt zu sein ...



NEU

1. Aufl. 2011, 230 S., 5 Abb., kart.
ISBN 978-3-8274-2773-1
► € (D) 16,95 | € (A) 17,43 | *sFr 21,50

Neel Burton

Der Sinn des Wahnsinns

Die Zahl psychischer Erkrankungen nimmt vor allem in den Industrieländern stetig zu. Das Buch von Neel Burton, das mit zahlreichen literarisch-philosophischen Bezügen durchsetzt ist, beschreibt und erläutert die wichtigsten dieser Störungen und rückt sie zugleich in ein neues Licht: Könnte der „Wahnsinn“ einen tieferen Sinn für uns Menschen haben?

► Neuro-Enhancement – ein hochaktuelles und brisantes Thema



NEU

Thomas Grüter
Klüger als wir?
1. Aufl. 2011, 308 S., 15 Abb., geb.
ISBN 978-3-8274-2648-2
► € (D) 24,95 | € (A) 25,65 | *sFr 31,50

Können wir klüger werden, als wir heute schon sind? Und wie wäre dies zu erreichen? Ist es überhaupt erstrebenswert? Die Verbesserung der Intelligenz mit chemischen und technischen Mitteln, das sogenannte „Neuro-Enhancement“, wird zur Zeit viel diskutiert. Der Arzt und Hirnforscher Thomas Grüter untersucht, was Intelligenz eigentlich ist, wie man sie misst und welche Bedeutung sie für die Evolution des Menschen hat. Er übt auf wissenschaftlich fundierter Basis deutliche Kritik an der oft unreflektiert geführten Diskussion über das Neuro-Enhancement und erklärt, warum die vorgeschlagenen Methoden nicht zum Ziel führen können.

► Wie Lust und Genuss beim Menschen „funktioniert“



NEU

Paul Bloom
Sex und Kunst und Schokolade
1. Aufl. 2011, 330 S., 2 Abb., geb.
ISBN 978-3-8274-2872-1
► € (D) 24,95 | € (A) 25,65 | *sFr 31,50

Wir haben Lust auf etwas, Spaß an etwas, finden bestimmte Dinge in höchstem Maße vergnüglich. Aber Vergnügen ist alles andere als ein einfaches Phänomen. Unsere Bedürfnisse, Wünsche, Vorlieben gehen über die Symmetrie eines hübschen Gesichts, über zucker- und fettreiche Nahrung oder über die Schönheit eines Gemäldes hinaus. In *Sex und Kunst und Schokolade* erklärt der Psychologieprofessor Paul Bloom die Wissenschaft hinter unseren Wünschen und Neigungen – von „niederen“ Instinkten bis zur hohen Kultur, von kindlichen Bedürfnissen bis zu typisch männlichen oder weiblichen Süchten, vom Normalen bis zum Abseitigen.

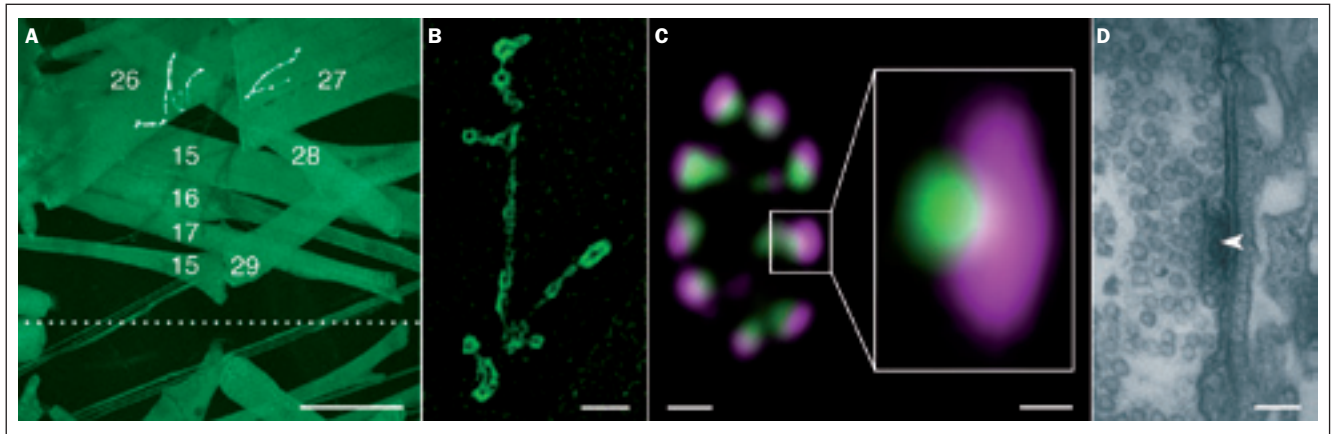


Abb. 1: Neuromuskuläre Synapsen in Drosophila

A) Muskelmuster in einem Abdominalsegment von Drosophila -Larven, von außen gesehen; Maßstabsbalken: 100 μ m. **B)** Morphologische Struktur der NMJ einer Drosophila -Larve an Muskel 27. Maßstab: 10 μ m. **C)** Immunhistochemische Färbungen eines Boutons einer larvalen NMJ und einer individuellen Synapse in der Seitenansicht (rechts Kasten). Grün: Monoklonaler Antikörper gegen Bruchpilot (Kittel et al. 2006), der die aktive Zone markiert. Magenta: Antikörper gegen die Glutamat-Rezeptor-Untereinheit GluRIIID, der die postsynaptische Dichte markiert. Maßstab Bouton: 1 μ m, Maßstab Synapse: 100 nm (100 nm sind das Zehntel eines μ m). **D)** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer einzelnen aktiven Zone. Die Pfeilspitze zeigt auf einen T-bar, der typischerweise „Cluster“ synaptischer Vesikel um sich vereinigt. Maßstab: 100 nm. (Modifiziert aus Andlauer und Sigrist (2010), publiziert in: „to Study Synapse Assembly Drosophila Neurobiology: A Laboratory Manual“ mit Erlaubnis von Cold Spring Harbor Laboratory press).

Verständnis der Funktion dieser Proteine für Synapsenstruktur und -funktion werden sie durch genetische Methoden analysiert. Hierbei werden die Gene, die diese Proteine kodieren, beseitigt oder verändert. Anschließend werden die Konsequenzen dieser Manipulationen untersucht. Oft jedoch ist die genetische Analyse synaptischer Proteine entweder durch „frühe Letalität“ (d.h. die genetische Eliminierung eines bestimmten Proteins verursacht den Tod des Organismus zu einem frühen, nicht-informativen Zustand) oder „funktionelle Redundanz“ zwischen zwei oder mehreren Proteinen kompliziert. Diese Probleme sind besonders in Säugermodellen (typischerweise Nagetiere wie Maus oder Ratte) ausgeprägt. „Einfachere“ genetische Modellsysteme, insbesondere die Fruchtfliege Drosophila und der Fadenwurm Caenorhabditis elegans, sind von diesen Komplikationen sehr viel weniger betroffen.

Eine weitere Komplikation betrifft die geringe Größe synaptischer Strukturen von nur wenigen hundert Nanometern (d.h. nur ein Bruchteil des Tausendstels eines Millimeters). Synapsenarchitekturen hatten sich bisher der „Standardtechnik“ zellbiologischer Analyse, der Fluoreszenz-Lichtmikroskopie, entzogen. Dies hat seinen Grund darin, dass „normale“ Lichtmikroskopie einer grundsätzlichen Auflösungsgrenze (auch bekannt als „Beugungsgrenze“, englisch diffraction limit) unterliegt (s.u.). Jüngste Fortschritte der Physik haben diese Beugungsgrenze allerdings „durchbrochen“ (Evanko 2006; Huang et al. 2010) und uns tiefere Einblicke

in die die molekularen Architekturen von Synapsen erlaubt (Kittel et al. 2006; Fouquet et al. 2009). Es ist des Weiteren nicht nur wichtig zu verstehen, wie reife Synapsen fein strukturiert sind, sondern auch wie sich diese Architekturen im sich entwickelnden Nervensystem ausbilden („Synaptogenese“). Unten beschreiben wir deshalb auch die Bemühungen unserer Gruppe, Synaptogenese direkt in intakten, sich entwickelnden Larven der Fruchtfliege Drosophila zu visualisieren. Zuerst allerdings soll unser Modellsystem etwas genauer vorgestellt werden.

Glutamaterge Synapsen zur genetischen Funktionsanalyse synaptischer Proteine

Glutamat ist der dominierende erregende Neurotransmitter unseres Gehirns. Primäres Modell unserer Gruppe sind die glutamatergen („Glutamat als Neurotransmitter verwendenden“) Synapsen der neuromuskulären Verbindungen („Neuromuscular Junctions“, kurz NMJs) von Drosophila-Larven. Diese sind den glutamatergen Synapsen des Säugerhirns bzgl. Ultrastruktur und molekularer Zusammensetzung ähnlich. Gleichzeitig allerdings verbindet die NMJ eine vergleichsweise einfache Morphologie (Abbildung 1) mit effektiver genetischer Zugänglichkeit.

Eine NMJ erscheint wie Perlen auf einer Schnur, wobei jede Perle einem synaptischen Bouton entspricht, welche etwa 5 μ m (1 μ m = ein Tausendstel eines Millimeters) im Durchmesser betragen (Abbildung 1A, B).

Jeder Bouton wiederum enthält etwa 20 individuelle Synapsen. Jede Synapse besteht aus einer präsynaptischen aktiven Zone, an denen die Freisetzung der glutamatgefüllten synaptischen Vesikel in Reaktion auf eingehende Aktivität (Aktionspotenziale) stattfindet. Glutamat gelangt dadurch in den synaptischen Spalt, um die Glutamatrezeptoren zu aktivieren, die wiederum in der postsynaptischen Dichte zusammengezogen sind. NMJ-Synapsen sind elektrophysiologischer (dient der Erfassung der Synapsenfunktion) und ultrastruktureller Analyse gut zugänglich.

Der T-bar, ein Modell zur Analyse der Zytomatrix präsynaptischer aktiver Zonen

An der Membran der präsynaptischen Seite führen Aktionspotenziale (die über die sogenannten Axone den Synapsen zugeleitet werden) zur Bildung von Kalziumsignalen direkt an „strategisch lokalisierten Clustern“ spannungsabhängiger Kalziumkanäle. Diese Kalziumsignale lösen die Freisetzung synaptischer Vesikel aus, ein Prozess, der eine enge physische Kopplung zwischen synaptischen Vesikeln und Kalziumkanälen benötigt, um effizient betrieben zu werden. Der Bereich der Synapse, an dem die Vesikelfusion stattfindet, wird als aktive Zone bezeichnet.

Kalziumkanäle (als Signalgeber) und sogenannte SNARE-Komplexe (als Katalysatoren der Vesikelfusion) machen das Herz der Fusionsmaschinerie an der aktiven Zone aus („Basismaschinerie“). Allerdings

ist eine vergleichbare Basismaschinerie an allen Vesikelfusionsereignissen der Zelle, z.B. auch an intrazellulären Organellen wie dem Golgi-System, beteiligt. Synapsen beeindrucken jedoch oft durch besonders hohe Fusionsgeschwindigkeiten bei gleichzeitig hoher Kontrollierbarkeit, Eigenschaften, die für ihre Funktion im Nervensystem unverzichtbar sind. Welche Maschinerie nun vermittelt diese spezifischen Eigenschaften von Synapsen?

Wie bereits oben angedeutet, sind durch jüngste Proteom- und Genom-Studien viele zusätzliche Proteinspezies an Synapsen nachgewiesen worden. Elektronenmikroskopische Studien wiederum hatten seit Jahrzehnten elektronendichte Spezialisierungen an aktiven Zonen detektiert („cytomatrix at the active zone“, kurz CAZ). Diese Befunde ließen eine hochgeordnete synaptische Proteinarchitektur als Grundlage der CAZ vermuten. Die CAZ ist offenkundig eine Kandidatenstruktur, um die spezifischen Leistungen der Synapsen zu vermitteln. Allerdings waren molekulare Zusammensetzung und detaillierte funktionelle Rolle von CAZs bisher kaum verstanden (Sigrist und Schmitz 2010; Wichmann und Sigrist 2010).

Günstigerweise bilden die *Drosophila*-Synapsen sehr ausgeprägte CAZs, die T-bars (Abbildung 1D) genannt werden (aufgrund ihrer an den Buchstaben T erinnernden Morphologie in der Elektronenmikroskopie). Es bietet sich hier die Chance, effiziente Genetik mit ultrastrukturellen und elektrophysiologische Analysen zu kombinieren. Abbildung 2 zeigt eine ultrastrukturelle Analyse des T-bars, wobei wir hier die „Schnellgefrier-Elektronenmikroskopie“ benutzen. Schockgefrieren (B) schont die natürliche Topologie der Strukturen besser als „traditionelle Protokolle“, welche chemische Fixierung beinhalten (A). Mittels dieses schnellen Einfrierens sehen wir, dass Filamente aus dem oberen Teil des T-bar hervortreten, die synaptische Vesikel an die CAZ anbinden (Fouquet et al. 2009; Wichmann und Sigrist 2010) (vgl. Abbildung 2A und B).

Um die Rolle des T-bars als einer exemplarischen CAZ-Struktur in *Drosophila* näher zu untersuchen, waren wir darauf angewiesen, ein Protein, das den T-bar (mit)aufbaut, zu identifizieren. Der „molekulare Zugriff“ auf den T-bar gelang durch einen biochemischen Ansatz, den wir in Zusammenarbeit mit dem Labor von Erich Buchner (Univ. Würzburg) verfolgten. Auf diese Weise konnten wir ein neuartiges, großes Protein als eine essenzielle Komponente des T-bars identifizieren (Kittel et al. 2006; Wagh et al. 2006). In ersten Experimenten fanden wir, dass eine Verringerung der Menge (aber nicht vollständige

Beseitigung) des betreffenden Proteins häufig einen „Absturz“ der betroffenen Fliegen im Flug mit sich brachte. So wurde der Name Bruchpilot (BRP) für diesen Faktor geprägt. Zu beachten ist jedoch, dass dieses Protein nicht eine „Fliegen-Spezialität“ darstellt, sondern dass BRP vielmehr zu einer in tierischen Organismen konservierten Proteinfamilie (ELKS-Familie) gehört. Mittlerweile ist bekannt, dass ELKS-Proteine an den aktiven Zonen aller Modellorganismen gefunden werden. Nachdem wir BRP genetisch vollständig eliminiert hatten, kam es zu einem völligen Verlust der T-bars. Die für BRP defizienten Tiere sterben vorzeitig (obwohl sie Synapsen und ein Nervensystem ausbilden) und zeigen eine starke Reduktion der Anzahl der pro Aktionspotenzial fusionierenden synaptischen Vesikel. Darüber hinaus wurden die Kalziumkanäle nicht mehr korrekt an den Membranen der aktiven Zonen zusammengezogen, sondern verteilten sich vielmehr gleichmäßig über Nervenzellmembran. Zusammengefasst, wir konnten zeigen, dass BRP Kalziumkanäle in der Nähe der Andockstellen für synaptische Vesikel konzentriert, wodurch eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Fusion der synaptischen Vesikel aufgebaut wird.

Methodisches Intermezzo: Hochauflösungs-Lichtmikroskopie (STED)

Synapsen sind, wie oben bereits erwähnt, sehr schnelle, hochgradig kontrollierte und effektive interzelluläre Kommunikationsstrukturen. Die verfügbaren Daten weisen darauf hin, dass die synaptischen, proteinbasierten Architekturen (CAZs wie z.B. der *Drosophila* T-bar) diese Eigenschaften zu vermitteln helfen. Darüber hinaus dürften Unterschiede in den CAZ-Architekturen den räumlich-zeitlichen Verlauf der Vesikel-

Fusion an verschiedenen Synapsentypen modulieren (sogenannte synaptische Kurzzeit-Plastizität). Der Kurzzeit-Plastizität der synaptischen Funktion kommt wahrscheinlich eine zentrale Rolle für „neuronaes Computing“ im Zuge von Informationsverarbeitung im Gehirn zu.

Ein *Drosophila*-T-bar misst etwa 200 nm im Durchmesser und lässt noch feiner strukturierte Substrukturen vermuten. Für eine befriedigende Visualisierung der räumlichen Architektur solcher Strukturen muss die Auflösung während der Bildaufnahme natürlich entsprechend hoch sein. Unter normalen Bedingungen konventioneller Lichtmikroskopie kann jedoch nur eine Auflösung von 200-250 nm senkrecht zur optischen Achse (sogenannte x, y - Orientierung) erreicht werden. Die minimale Größe eines Lichtpunktes (bei Fluoreszenz-Mikroskopie Anregungsspot), mit dessen Hilfe das Bild abgerastert wird, wird nämlich durch Beugung auf minimal etwa die Hälfte der verwendeten Wellenlänge (sichtbares Licht zwischen etwa 400 und 700 nm) begrenzt. Aus diesem Grund kann auch bei konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopen (höchstauflösende Form konventioneller Fluoreszenzmikroskopie) der Anregungsspot nicht unter etwa 200 nm gesenkt werden. Diese begrenzte Auflösung erlaubt also keine Analyse „sub-synaptischer“ Organisation. So waren solche Analysen lange Zeit der Elektronenmikroskopie vorbehalten (siehe Abbildung 2), welche aufgrund der kurzen Wellenlänge von Elektronen eine sehr hohe Auflösung liefert. Allerdings ist die Elektronenmikroskopie häufig nur sehr schwer mit der Detektion spezifischer Proteine kombinierbar („Immuno-Elektronenmikroskopie“). Weiterhin ist die Technik sehr arbeitsaufwendig und pro Arbeitsgang kann jeweils nur sehr wenig biologisches Material dargestellt werden. Fluoreszenzbasierte Lichtmikro-

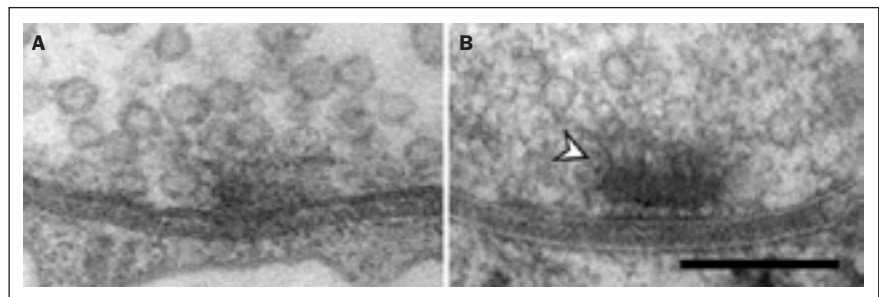


Abb. 2: Ultrastruktur des *Drosophila* T-bars

A) Dargestellt sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von klassischen d.h. fixierten Präparaten von *Drosophila* T-bars. Der Fuß des T-bars wird einem „Dach“ abgedeckt. **B)** Ein T-bar, der schnellgefroren wurde und damit natürlicher erhalten wurde. Statt eines „Dachs“ zeigen sich Filamente (Pfeilspitze), die aus dem Fuß des T-bar (Pfeil) austreten. Maßstab: 200 nm.

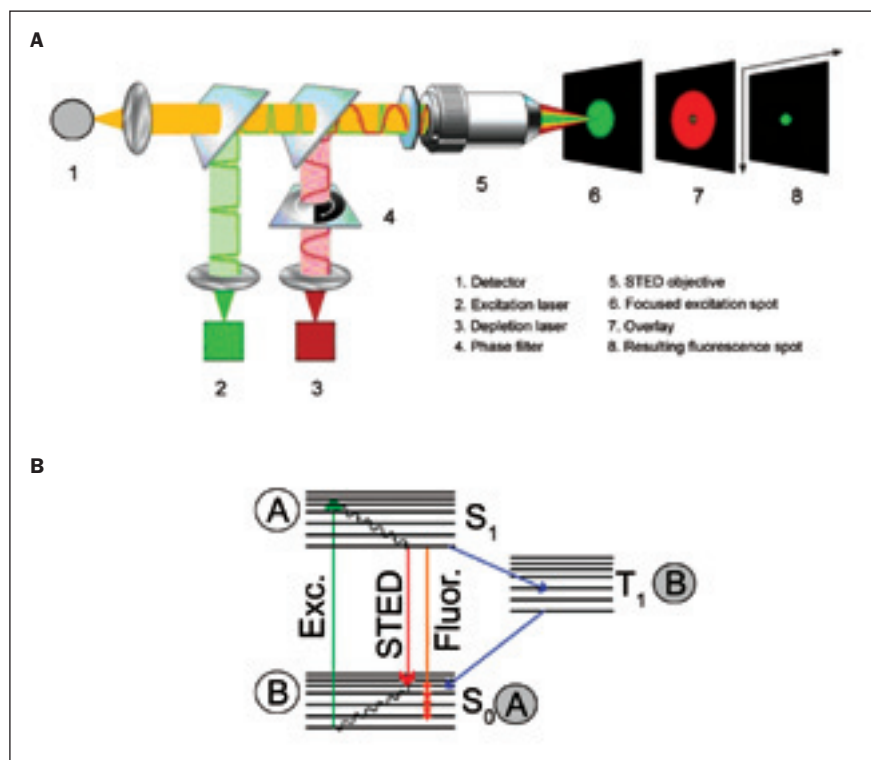


Abb. 3: Prinzip der STED-Mikroskopie

A) Der erste Laser (2-grün) regt die Fluorophore der Probe direkt an, der ringförmige, rot-verschobene Erschöpfung Abregungsstrahl (3-rot) folgt. Durch die Ringform des Depletion-Lasers werden die Fluorophore in den äußeren Bereichen des Anregungssspots abgeregt, bevor sie Fluoreszenz emittieren können. Dies führt zu einem kleinen, aber scharfen Anregungssspots, der die Beugungsgrenze überwindet und damit hochauflösendes Laser-Scanning ermöglicht. (© Leica Microsystems). **B)** Energiediagramm eines organischen Fluorophors. Moleküle gehen durch Photonenabsorption in den angeregten Zustand S_1 aus dem Grundzustand S_0 und kehren durch spontane Fluoreszenz-Emission zurück. Rückkehr zu S_0 kann aber auch durch stimulierte Emission hervorgerufen werden. Um stimulierte über spontane Emission dominieren zu lassen, erfordert STED sehr intensive Lichtpulse mit einer Dauer von nur einem Bruchteil der S_1 -Lebensdauer. Die Wellenlänge des Abregungsstrahls muss so eingestellt werden, dass keine Neuanregung erfolgt. T_1 ist ein dunkler Triplett-Zustand, der durch S_1 erreicht wird, und aus dem das Molekül in S_0 zurückkehren kann. Modifiziert mit Genehmigung aus Hell (2003), *Nat. Biotechnol.* **21:** 1347-55.

skopie erlaubt im Gegensatz dazu die sehr effektive Darstellung spezifischer Proteine in den biologischen Proben und kann vergleichsweise viel biologisches Material in übersichtlicher Zeit sichten.

Zur Überwindung der starren Beugungsgrenze der Lichtmikroskopie (wie um 1870 von Ernst Abbe postuliert) entwickelten Stephan Hell und Kollegen eine elegante Technik, die auf dem quantenmechanischen Phänomen der stimulierten Emission basiert. Unter natürlichen Bedingungen wird ein fluoreszierendes Molekül durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge in einen angeregten Zustand gebracht (Abbildung 3B). Vom angeregten Zustand fällt das Molekül normalerweise

spontan zurück in den Ruhezustand, wobei Fluoreszenzlicht rot-verschobener Wellenlänge emittiert wird. Stimulierte Emission hingegen meint die gezielte, strahlungsfreie Abregung der angeregten Farbstoffmoleküle in den Grundzustand (siehe Abbildung 3B). Hierbei werden die angeregten Moleküle durch Licht einer ähnlichen Wellenlänge (rot-verschoben gegenüber Anregungsstrahl) abgeregt (der Abregungsstrahl wird auch als Depletions-Laser oder STED-Laser bezeichnet). Durch Aussenden von Photonen mit gleicher Wellenlänge wie der Abregungsstrahl fallen die angeregten Moleküle in den Grundzustand. Nach einer solchen „stimulierten Emission“ zeigt das fluoreszierende Molekül in

der Regel keine spontane Emission von Fluoreszenz-Photonen mehr.

Bei „Stimulated Emission Depletion“-Mikroskopie (STED) wird dieser grundlegende Mechanismus genutzt, um Anregung und damit Fluoreszenz auf die Moleküle im Zentrum des Anregungssspots einzuschränken, während die Moleküle am Rand desselben abgeregt werden (Hell 2007). Das wesentliche Merkmal der STED-Mikroskopie ist, dass der Anregungsstrahl durch einen ringförmigen Abregungsstrahl, der die Moleküle durch stimulierte Emission abregt (Abbildung 3A), überlappt wird. Wenn die beiden Laserstrahlen perfekt ausgerichtet sind, bleibt der Spot des Fluoreszenzsignals nur in der Mitte des Anregungsstrahls erhalten, da hier keine Abregung geschieht (Abbildung 3A). Das Abrastern der Probe mit solch einem verkleinerten Anregungssspot erlaubt das Aufnehmen von Bildern mit einer Auflösung deutlich unterhalb der Beugungsgrenze.

STED in der Analyse synaptischer Proteinarchitekturen

STED (Abbildung 3) erwies sich als effizientes Werkzeug, um zu analysieren, warum BRP für die Ausbildung des T-bars kritisch ist. Auf diese Weise konnten wir insbesondere die molekulare Orientierung der BRP-Moleküle an der aktiven Zone näher studieren (Abbildung 4).

Hierfür verwendeten wir zwei Antikörper, BRP^{Nc82} , der den C-Terminus und BRP^{N-Term} , der den N-Terminus spezifisch erkennt. Mit STED Auflösung detektiert der BRP^{Nc82} -Antikörper „Donuts“ an „planar-ausgerichtete“ aktive Zonen (d.h. senkrecht zur optischen Achse stehend) (Kittel et al. 2006; Abbildung 4A-C [Pfeil]). Der BRP^{N-Term} -Antikörper (der ja das „anderen Ende“ der gleichen Moleküle erkennt!) hingegen zeigt keine donut-förmige Verteilung in STED. Stattdessen wird BRP^{N-Term} -Signal zentriert innerhalb des „Donut-Lochs“ der BRP^{Nc82} -Signale gefunden. An vertikal abgebildeten aktiven Zonen zeigten sich BRP^{N-Term} -Signale deutlich näher an der Membran der aktiven Zone als BRP^{Nc82} -Signale (Abbildung 4B).

Insgesamt dokumentierte die STED-Analyse eine polarisierte, trichterförmige Verteilung der BRP-Epitope (Abbildung 4C). Einzelne BRP-Moleküle dürften demnach eine gestreckte Konformation annehmen (Fouquet et al. 2009), wobei der N-Terminus von BRP in einem Abstand von ca. 100 nm vom C-Terminus lokalisiert zu sein scheint. Der N-Terminus seinerseits überlagert die „Kalziumkanal-Cluster“ im Zentrum der aktiven Zone. In diesen Studien wurde STED

mit ~80 nm Auflösung verwandt, wobei die vergleichsweise einfache Topologie der Drosophila NMJs es erlaubte, die Orientierung einzelner aktiver Zonen (planar versus vertikal) abzuklären. Ein Modell zur Beschreibung der STED-abgeleiteten-Topologie ist in Abbildung 4D zu sehen.

Wir benutzen STED nun in der weiteren Analyse der aktiven Zone. Andere an der aktiven Zone angereicherte Proteine, wie das hier gezeigte DLiprin- α konnten mittels STED anderen Sub-Kompartimenten zugewiesen werden (Abbildung 4D). Es zeigt sich dabei zunehmend, dass die exakten Positionierungen innerhalb der aktiven Zonen verschiedenen funktionellen Rollen zu entsprechen scheinen. Grob gesprochen lokalisieren Komponenten, die direkt in die Fusion synaptischer Vesikel eingebunden sind, im Zentrum (Kalziumkanäle, Bruchpilot, Rim-binding Protein), wohingegen Proteine am Rande der aktiven Zone (DLiprin- α , DSyd-1, Neurexin) eher für die korrekte Assemblierung und den Umbau der aktiven Zonen verantwortlich scheinen (Owald et al. 2010; Banovic et al. 2011). Diese Prozesse sind Gegenstand des folgenden Kapitels.

In vivo Bildgebung zum Studium der Synapsenassemblierung

Wie werden die synaptischen Proteinarchitekturen etabliert? Auf den ersten Blick eine vergleichsweise simple Frage, ist das generelle Verständnis hier noch recht dürftig. Während erste Daten aus kultivierten Neuronen (*in vitro* Synaptogenese) eine schnelle Ausbildung von Synapsen suggerierten (weniger als eine Stunde), tendieren neuere Studien an *in vivo* Material zu einem langsameren Verlauf der *in vivo* Synaptogenese (viele Stunden bis zu Tagen). Es erscheint wahrscheinlich, dass Synapsenbildung ein zeitlich ausgedehnter Prozess von mehreren miteinander verbundenen Teilschritten ist (Initialisierung der Assemblierung, Maturierung), wobei die Koordination der Assemblierung zwischen prä- und postsynaptischen Strukturen eine besondere Herausforderung an das Verständnis stellt. Zurzeit behindert ein Mangel an Wissen über die detaillierte räumlich-zeitliche Abfolge der *in vivo* Synaptogenese ein umfassendes Verständnis zum einen der Entwicklung, aber auch der Strukturplastizität synaptischer Verschaltungen im ausgereifen Nervensystem. Strukturplastizität ist zum einen eine wichtige Komponente langfristiger Lernprozesse, Fehlsteuerungen sind zum anderen sehr wahrscheinlich auch pathologisch relevant.

Zeitlich ausgedehnte intravitale Bildgebung einzelner synaptischer Proteine bei

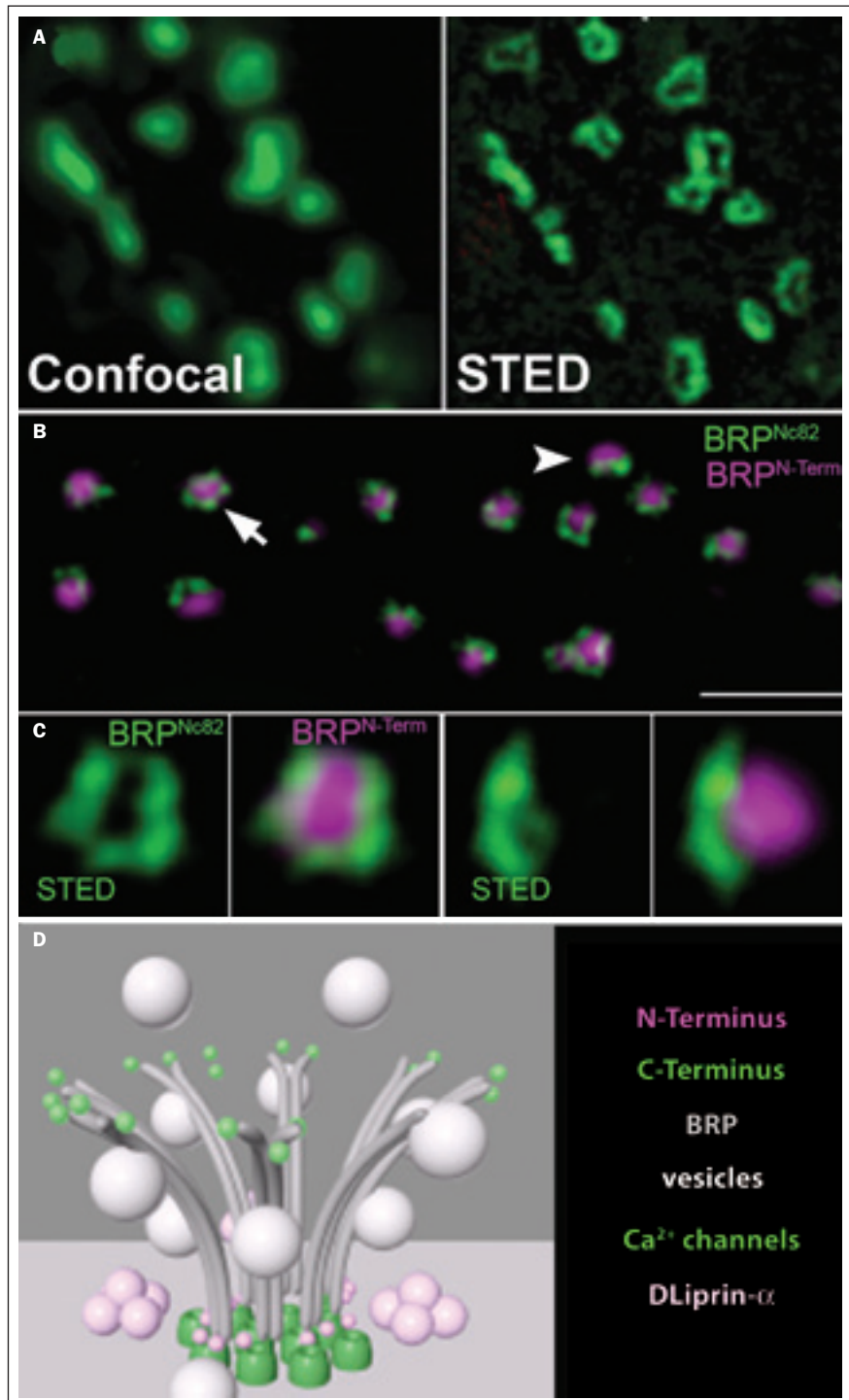


Abb. 4: STED-Analyse der synaptischen Proteinarchitektur

A-C) STED an Drosophila neuromuskulären Synapsen. **A)** STED zeigt ringförmige Strukturen, die durch den gegen das Bruchpilot-Protein gerichteten monoklonalen Antikörper NC82 erkannt werden (STED, grün); Gezeigt sind planar (Pfeil) und vertikal (Pfeilspitze) getroffene aktive Zonen; Konfokale Mikroskopie (links) hingegen kann diese Strukturen nicht weiter auflösen **B, C)** Planar (links) und vertikal (rechts) getroffene aktive Zonen gefärbt für BRP^{Nc82} (STED) und BRP^{N-Term} (konfokal). **D)** Ein erstes Modell der Struktur aktiver Zonen in Drosophila. (A modified mit Erlaubnis aus Kittel et al. (2006), *Science*, 312: 1051-4; B-D modifiziert mit Erlaubnis aus Fouquet et al. 2009, *JCB*, 186: 129-45).

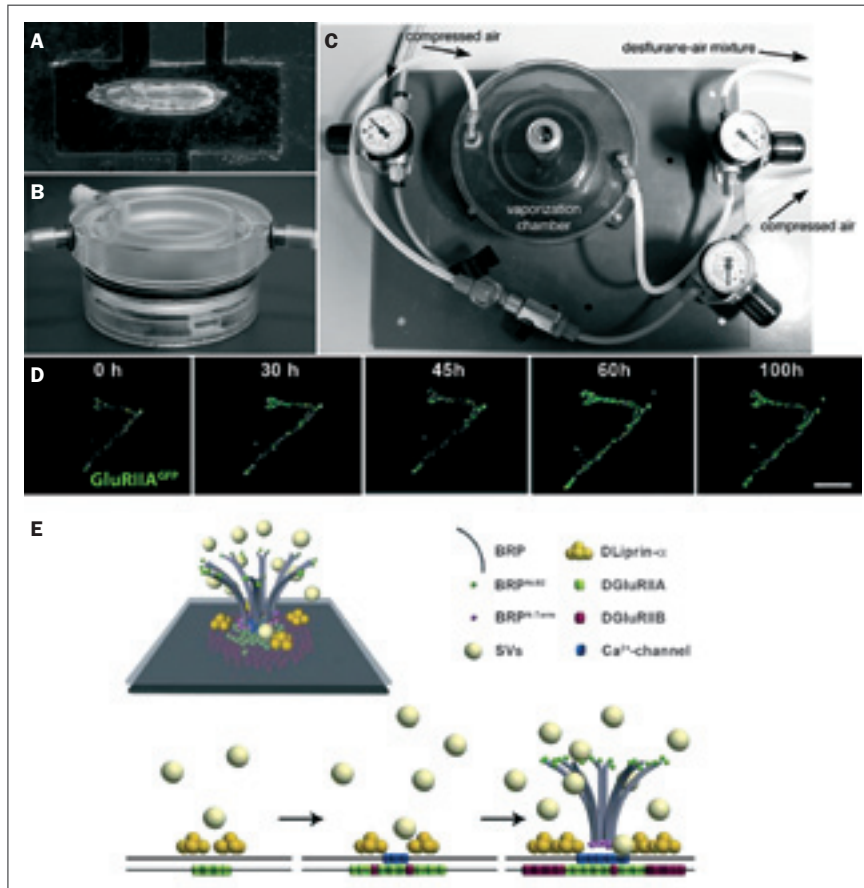


Abb. 5: In vivo Bildgebung an Drosophila NMJs

A) Drosophila-Larve immobilisiert in der Imaging-Kammer. **B)** In vivo Imaging Kammer. **C)** Betäubung geschieht vermittels Desfluran. Über die dargestellte Verdampfungskammer wird ein definiertes Desfluran-Luft-Gemisch zur Larve geleitet. **D)** Die Entwicklung eines identifizierten NMJ-Terminals wird an Muskel 27 über 100 h bei 16° C verfolgt, visualisiert mittels einer GFP markierten Glutamat-Rezeptor-Untereinheit (GluRIIA). **E)** Schematische Darstellung der Entwicklung von Drosophila-NMJ-Synapsen. Maßstab in D: 10 µm. (A-D modifiziert aus Andlauer und Sigrist (2010), publiziert in: "to Study Synapse Assembly Drosophila Neurobiology: A Laboratory Manual" mit Erlaubnis von Cold Spring Harbor Laboratory press; E) mit Erlaubnis aus Fouquet et al. 2009, JCB, 186: 129-45).

identifizierten Arten von Synapsen wäre probat zum tieferen Verständnis der Assemblierungsprozesse. Drosophila-Larven sind in mehrfacher Hinsicht ideal, um eine effektive und hochaufgelöste Bildgebung mit genetischen Möglichkeiten zur Markierung synaptischer Proteine zu verbinden.

Während der Entwicklung von Drosophila-Larven erhöht sich die Anzahl der Synapsen pro NMJ-Terminal im Zeitraum von einigen Stunden deutlich (Abbildung 5D) (Sigrist et al. 2003; Rasse et al. 2005). Weiterhin sind Muskeln der Drosophila-Larve in stereotyper Weise aufgebaut, und „individuelle NMJs“ (z.B. „NMJ an Muskel 27 in Abdominalsegment 4“) können mittels Konfokalmikroskopie leicht innerhalb einer intakten Larve identifiziert werden. Unsere Gruppe hat vor einigen Jahren Protokolle

entwickelt, die die *in vivo* Nachverfolgung identifizierter Synapsengruppen über Tage in lebenden Larven erlauben (Rasse et al. 2005). Hierfür werden intakte Larven betäubt und nicht-invasiv mit konfokaler Mikroskopie (Abbildung 5) untersucht (intravitaler Studium der Synaptogenese). Fluoreszenz-Bleich-Recovery-Experimente (FRAPs) und ähnliche Experimente erlauben es hierbei, den Fluss synaptischer Proteine während der Synaptogenese zu rekonstruieren.

Unsere *in vivo* Experimente an sich entwickelnden NMJs ergaben, dass einzelne Synapsen sich in einer definierten Sequenz über mehrere Stunden assemblieren, wobei prä- und postsynaptische Proteine in einer zeitlich definierten Reihenfolge in die Assemblierungszwischenstufen eintreten

(Rasse et al. 2005; Schmid et al. 2008; Oswald et al. 2010). Neue postsynaptische Spezialisierungen wurden abseits von bestehenden Spezialisierungen initiiert und wuchsen dann über mehrere Stunden, bevor sie sich nach Erreichen einer endgültigen reifen Größe stabilisierten. Wir konnten zeigen, dass die Inkorporation einer spezifischen Glutamat-Rezeptor-Untereinheit (GluRIIA) die Assemblierung steuert (Rasse et al. 2005; Schmid et al. 2008). In den letzten Jahren haben wir nun den Prozess weiter analysiert, insbesondere auch durch Verwendung präsynaptischer Proteine. Unsere aktuelle Interpretation des Assemblierungsprozesses ist in Abbildung 5E schematisch skizziert.

Ausblick

Trotz rascher Fortschritte bezüglich der methodischen Werkzeuge und Techniken zur Untersuchung von Struktur, Funktion und Assemblierung von Synapsen bleiben viele Fragen offen. Um nur ein Beispiel zu nennen bleibt z.B. unbekannt, inwieweit synaptische Komponenten in „vormontierten Komplexen“ an die sich etablierenden Synapsen geliefert werden. Auch wie genau die räumliche-zeitliche Organisation von Proteinen innerhalb der Synapsen Struktur und Funktion steuern, wird die Wissenschaft noch lange beschäftigen. Durch die Kombination von intravitaler Bildgebung mit Hochauflösungs-Lichtmikroskopie (live-STED) hoffen wir zu einem umfassenderen Verständnis dieser Prozesse beizutragen.

Literatur

- Andlauer, T.F.M. und Sigrist S.J. (2010): *In Vivo* Imaging of Drosophila Larval Neuromuscular Junctions to Study Synapse Assembly. *Cold Spring Harbor Laboratory Press - Drosophila Neurobiology Methods: A Laboratory Manual*; Chapter 21
- Evanko, D. (2006): STEDy progress. *Nat Methods* 3: 661.
- Fouquet, W., Oswald, D., Wichmann, C., Mertel, S., Depner, H., Dyba, M., Hallermann, S., Kittel, R.J., Eimer, S. und Sigrist, S.J. (2009): Maturation of active zone assembly by Drosophila Bruchpilot. *J Cell Biol* 186: 129-145.
- Hell, S.W. (2007): Far-field optical nanoscopy. *Science* 316: 1153-1158.
- Huang, B., Babcock, H. und Zhuang, X. (2010): Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell* 143: 1047-1058.
- Jin, Y. und Garner, C.C. (2008): Molecular Mechanisms of Presynaptic Differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Kittel, R.J., Wichmann, C., Rasse, T.M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., Wagh, D.A., Pawlu, C., Kellner, R.R., Willig, K.I., Hell,

- S.W., Buchner, E., Heckmann, M. und Sigrist, S.J. (2006): Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca^{2+} channel clustering, and vesicle release. *Science* 312: 1051-1054.
- Oswald, D., Fouquet, W., Schmidt, M., Wichmann, C., Mertel, S., Depner, H., Christiansen, F., Zube, C., Quentin, C., Korner, J., Urlaub, H., Mechtler, K. und Sigrist, S.J. (2010): A Syd-1 homologue regulates pre- and postsynaptic maturation in *Drosophila*. *J Cell Biol* 188: 565-579.
- Rasse, T.M., Fouquet, W., Schmid, A., Kittel, R.J., Mertel, S., Sigrist, C.B., Schmidt, M., Guzman, A., Merino, C., Qin, G., Quentin, C., Madeo, F.F., Heckmann, M. und Sigrist, S.J. (2005): Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation *in vivo*. *Nat Neurosci* 8: 898-905.
- Schmid, A., Hallermann, S., Kittel, R.J., Khorramshahi, O., Frolich, A.M., Quentin, C., Rasse, T.M., Mertel, S., Heckmann, M. und Sigrist, S.J. (2008): Activity-dependent site-specific changes of glutamate receptor composition *in vivo*. *Nat Neurosci* 11: 659-666.
- Sigrist, S.J. und Schmitz, D. (2010): Structural and functional plasticity of the cytoplasmic active zone. *Curr Opin Neurobiol*.
- Sigrist, S.J., Reiff, D.F., Thiel, P.R., Steinert, J.R. und Schuster, C.M. (2003): Experience-dependent strengthening of *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurosci* 23:6546-6556.
- Wagh, D.A., Rasse, T.M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Durrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M.C., Schmidt, M., Qin, G., Wichmann, C., Kittel, R., Sigrist, S.J. und Buchner, E. (2006): Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* 49: 833-844.
- Wichmann, C. und Sigrist, S.J. (2010): The active zone T-bar – a plasticity module? *J Neurogenet* 24: 133-145.

Eine vollständige Literaturliste kann bei den Autoren angefordert werden.

Kurzbiografien

Dr. Carolin Wichmann, geboren 1973 in Brake, studierte 1993-1999 an der Georg-August-Universität in Göttingen Biologie. Nach ihrer Promotion 2002, in der sie die Aktivität von unterschiedlichen Enzymen an Liposomenmembranen untersuchte, wechselte sie von der Mikrobiologie zu den Neurowissenschaften. In der AG von Prof. Dr. Stephan Sigrist am European Neuroscience Institute in Göttingen untersuchte sie die Morphologie von wildtypischen und mutanten Synapsen der Fruchtfliege *Drosophila* mithilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie. Seit Juli 2011 leitet sie ihre eigene Junior- Arbeitsgruppe in der Abteilung für Otolaryngologie in Göttingen unter Leitung von Prof. Dr. Tobias Moser und untersucht hier die molekulare Architektur und Vesikel-Dynamik von Maus-Bändersynapsen des Innenohres mittels Elektronen-Tomografie und Serien-Rekonstruktionen.

Prof. Dr. Stephan Sigrist studierte von 1986 bis 1988 Chemie an der Technischen Universität Berlin, von 1988 bis 1993 Bio-

chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Im Anschluss promovierte er bis 1997 am Friedrich-Miescher-Labor des Max-Planck-Instituts (Tübingen)

Danach war er dort bis 2000 Postdoc. Von 2001 bis 2006 war er Leiter einer Independent Junior Research Group "Neuroplasticity" der Max-Planck-Gesellschaft am European Neuroscience Institute Göttingen. Von 2006 bis 2008 war er W2-Professor für Experimental-Biomedizin am Rudolf-Virchow-Zentrum der Universität Würzburg, seit September 2008 ist W3-Professor für Genetik an der Freien Universität Berlin. Er gehört dem Direktorium des Exzellenz-Cluster Neurocare an.

Korrespondenzadressen

Prof. Dr. Stephan Sigrist
Freie Universität Berlin
Institut für Biologie
Takustr. 6, 14195 Berlin
Tel.: +49 30 838 56940
E-Mail: stephan.sigrist@fu-berlin.de

Dr. Carolin Wichmann
InnerEarLab
Department of Otolaryngology
Center for Molecular Physiology of the Brain University of Goettingen
Robert-Koch-Straße 40
37075 Göttingen
Tel.: +49 551 3910375 oder 3922604
E-Mail: cwichma@gwdg.de

Schönheit ist der Glanz der Wahrheit

Im Gespräch mit Neuroforum: Der langjährige Direktor des Physiologischen Instituts an der Technischen Universität München, Josef Dudel

Prof. Josef Dudel ist ein international anerkannter Experte auf dem Gebiet der synaptischen Transmission. Zusammen mit Stephen F. Kuffler gilt er als Entdecker des Mechanismus der präsynaptischen GABAergen Hemmung. Seine Laufbahn begann er jedoch als Herzphysiologe. In Zusammenarbeit mit Wolfgang Trautwein führte er an einzelnen Herzmuskelfasern bahnbrechende elektrophysiologische Untersuchungen durch. Zudem sind ihm eine Reihe methodischer Innovationen zu verdanken, darunter die Technik des liquid filament switch, durch die eine neue Ära im Verständnis der Glutamaterezeptorkinetik eingeleitet wurde.

Neuroforum: Herr Dudel, Ihr Lieblingslebensspruch ist gar nicht so leicht zuzuordnen – von einigen wird er dem Architekten Mies van der Rohe zugeschrieben, von anderen dem bengalischen Literaten Tagore, oder auch dem Astrophysiker Chandrasekhar... Von wem stammt er wirklich?

Josef Dudel: So ist das mit den schönen Sprüchen! „Schönheit ist der Glanz der Wahrheit - Pulchritudo est splendor veritatis“ - das habe ich seinerzeit als Heidelberger Student bei Thomas von Aquin gefunden.

Neuroforum: Eine eher ungewöhnliche Lektüre für einen Physik- oder Medizinstu-

dent. Erzählen Sie uns doch bitte etwas mehr über Ihre Heidelberger Studienzeit, bevor wir noch einmal auf Ihr Motto zurückkommen.

Josef Dudel: Wir reden von den Jahren 1949 bis 1957. Im Jahr 1949 hatte ich die Reifeprüfung in Ulm abgelegt und mich zunächst für das Fach Physik an der „Ruperto Carola“ in Heidelberg, der ältesten Universität Deutschlands, entschieden.

Neuroforum: Aber schon nach drei Jahren überdachten Sie Ihre Wahl und schrieben sich für ein Medizinstudium ein. Man könnte vermuten, dass Sie die Wahrheit erst einmal in der Umgebung schöner und glänzender Heidelberger Medizinstudentinnen suchten.

Josef Dudel: Ja, manche waren schön und haben gegläntzt, aber das Medizinstudium selber war doch arg langweilig.