Auge der erwachsenen *Drosophila* mit Mikroauge (Pfeil).

Simon Sprecher mit larvalem *Droso*-Auge, bestehend aus zwölf grün- oder blauempfindlichen Photorezeptorzellen.

Fribourg – Larvales Sehvermögen

Drosophilas grüne Zellen

Die Larven der Taufliege werden oft unterschätzt. Zu Unrecht, findet Simon Sprecher. Er weiß, wovon er redet, kennt er doch die Neuronen für die visuelle Wahrnehmung persönlich.

Simon Sprecher selbst, seit 2009 außerordentlicher Professor an der Universität Fribourg, hat das Larvenstadium definitiv hinter sich gelassen. Nicht jedoch die Larven. „Viele denken, *Drosophila*-Larven seien langweilig, weil sie nichts können. Das stimmt nicht“, erklärt Sprecher die Wahl seines Lieblingsforschungsobjektes. „Sie paaren sich zwar nicht und können nicht fliegen, aber sonst können sie eigentlich alles. Sie sind eine Nische in der *Drosophila*-Forschung.“

Schau mir ins Bolwig-Organ

Sprecher interessiert sich für die Entwicklung von Zentralnervensystemen. „Ich war immer Entwicklungsbiologe. Bei mir drehte es sich immer um Entwicklung, Neuro und *Drosophila*“, fasst Sprecher seine Karriere zusammen. Da das menschliche Gehirn mit Milliarden von Neuronen schwer zugänglich ist, konzentrierte er sich auf das der Taufliegenlarve mit nur 10.000 Neuronen. Ihr Auge, das Bolwig-Organ, besteht gerade mal aus zwölf Photorezeptorzellen. Diese sind wie eine Art Sack angeordnet, ganz anders als das wohlgeordnete Facettenauge der erwachsenen Taufliege. Weitere neun Zellen pro Hirnhemisphäre bilden den Schrittmacher des circadianen Rhythmus‘. „Diese Neuronen sind leicht zu erkennen. Man weiß immer, wen man vor sich hat“, schmunzelt der junge Professor.

Das larvale visuelle System (oder auch larvales optisches Neuropil) besteht aus vier blauempfindlichen Zellen, die den Photorezeptor Rhodopsin 5 (rh5) exprimieren, und acht grünempflindlichen, die Rhodopsin 6 (rh6) exprimieren. Beides sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Sprechers Fluoreszenzmarker haben jeweils die gleiche Farbe, was durchaus so gewollt ist. „Ursprünglich hatte ich es anders herum, aber es ist didaktisch besser, wenn die Farben stimmen.“

Mit Mutanten der beiden Rhodopsine zeigte die Gruppe kürzlich, dass nur die blauempfindlichen Rezeptoren für die Lichtvermeidung nötig sind (*J Neurosci* 2011, 31(17):6527-34). Im Experiment werden die Larven auf die Mittellinie einer zur Hälfte beleuchteten Petrischale gelegt und nach 15 Minuten die Larven auf jeder Seite ausgezählt.

Rh5-Photorezeptoren sind für die Lichtvermeidung essentiell. Entsprechend waren Larven mit mutierten blauempfindlichen Rezeptoren vom Licht unbeeindruckt. Die Mutation in den grünempfindlichen Rezeptoren dagegen hatte keinen Effekt. Es stellt sich also die Frage, wozu die grünempfindlichen Zellen dienen.

Die rh6-exprimierenden Zellen spielen im circadianen Rhythmus ein Rolle. Das zeigte sich am Transkriptionsfaktor Timeless der inneren Uhr, der sich über Nacht ansammelt und am Morgen durch Lichteinfluss schnell abgebaut wird. In Doppelmutanten beider Photorezeptoren wurde viel weniger Timeless abgebaut als im Wildtyp und in den beiden Einfachmutanten. Zur Aufrechterhaltung des circadianen Rhythmus‘ reicht demnach einer der beiden Zelltypen aus. „Die grünempfindlichen Zellen haben hier also eine Funktion, die ist aber nicht exklusiv“, erklärt Sprecher.

Neuronenkontrolle

Um das ganze neuronale Netzwerk der visuellen Wahrnehmung der Larven zu entschlüsseln, benutzt die Gruppe die gesamte Bandbreite an genetischen Werkzeugen. Neben den herkömmlichen Nullmutanten ablatieren sie die Zellen auch – die genetische Holzhammermethode. Dazu werden Apoptose-Gene wie *reaper* und *hid* unter die Kontrolle eines Photorezeptor-Promotors gestellt. Die Zelle begeht Selbstmord, sobald die Photorezeptoren exprimiert werden.

Eine weniger drastische, aber ebenfalls spezifische Methode ist die RNA-Interferenz. Damit zeigten Sprecher *et al.*, dass

Simon Sprecher (5.v.li.) hat eine entwicklungsbiologische Nische gefunden: Das Verhalten von *Drosophila*-Larven. (Naryttza Diaz (2.v.li.), Abishek Kumar Mishra (4.v.li.))

Fotos (2): AG Sprecher

der Neurotransmitter Acetylcholin in den Photorezeptorzellen für die Lichtvermeidung verantwortlich ist. Nullmutanten wären hier unangebracht, denn die neuromuskulären Synapsen sind ebenfalls cholinerg.

Im Keller werden mit dem konfokalen Mikroskop die Bilder für die Publikationen gemacht, sei es durch einen direkten Nachweis von fluoreszenten Proteinen oder durch fluoreszierende Antikörper. Abishek Kumar Mishra, einer von Sprechers Doktoranden, steht zufrieden neben dem Mikroskop. Er hat gefunden, was er wollte. Er konnte zeigen, dass seine Larven kein Rhodopsin herstellen können, die Photorezeptorzellen aber nicht einfach abgestorben sind. „Heute ist ein guter Tag, nicht wahr“, freut sich Sprecher. Mishra nickt und lacht.

Beim Entscheiden zuschauen

In Zukunft möchte Sprecher die Verhaltensexperimente verfeinern und damit spezifischere neuronale Netzwerke entschlüsseln. Ihn interessiert, wie genau die

Fotos (2): Florian Fisch

Mit Hilfe einer Rundumbeleuchtung filmt das Sprecher-Team das Verhalten der *Drosophila*-Larven.

Larven dem Licht davon kriechen oder sich zum Zucker hinbewegen. „Es geht darum, zu sehen, wie sich das Verhalten während des Lernens ändert“, erklärt Sprecher. Die Bioinformatikerin Naryttza Diaz hat ein informatorisches Verfolgungssystem für die Larven entwickelt. Keine einfache Sache.

„Damit alles gleichmäßig ausgeleuchtet ist, beleuchten wir die Larven mit für sie unsichtbarem rotem Licht“, Sprecher zeigt auf den Beleuchtungsring aus Styropor, der rundherum mit Leuchtdioden garniert ist. Die Kamera steht hinter einem Rotfilter und wird von den für Larven sichtbaren Grün- und Blaukomponenten nichts sehen.

Eine weitere Neuerung ist die sequentielle Elektronenmikroskopie. Vom larvalen optischen Neuropil, das etwa zehn auf zehn Mikrometer misst, werden 120 Schnitte gemacht. Aus den Elektronenmikroskopbildern wird danach ein dreidimensionales Bild rekonstruiert. Die Daten hat Sprecher von Volker Hartenstein von der University of California in Los Angeles erhalten. Ein Programm von Albert Cardona vom Institut für Neuroinformatik aus Zürich erlaubte, die Schnitte zusammenzusetzen.

„Damit können wir die Synapsen rekonstruieren, was mit konfokaler Mikroskopie nicht möglich ist“, so Sprecher. An der Wand im gegenüber liegenden Büro kann man die Originaltechnik bestaunen: von Hand übereinander geklebte Abzüge von Elektronenmikroskopaufnahmen.

Gestürztes Dogma

„*Drosophila* ist ein Playground. Man kann mit ihr alles tun.“ Die Larven erkennen Licht und chemische Signale, können navigieren, haben einen Tagesrhythmus und empfinden Schmerz. Mit einer einfachen Petrischale mit je einer Kupferelektrode auf beiden Seiten möchte er die Larven mittels Elektroschock konditionieren. Alles ohne ethische Bedenken? „Noch nicht!“, witzelt Sprecher.

Das Labor ist überfüllt mit Gläschen. In diesen kreucht und fleucht es auf hausgemachtem Maisbrei. Die zahlreichen Brutschränke riechen nach Mostkeller. Im Nebenraum ist gerade der Doktorand Abud José Farca Luna dabei, die Larven unter dem Mikroskop zu sezieren. Er hält sie an den dunklen Mundwerkzeugen fest und zieht die Larve auseinander. Das Gehirn bleibt am Mundstück hängen. „Ich bringe es auf 7, 8 Larven pro Stunde. Ich sollte aber so um die 15, 20 schaffen“, gibt er zu.

Für all die neuen Techniken fehlen Sprecher noch die interessanten biologischen Fragen. Für seine eigene Postdoczeit in New York hatte er eine: Hinter dem Facettenauge der erwachsenen *Drosophila* überleben vier Zellen des Larvenauges – grünempfindliche (siehe Foto oben links). Mussten vier der acht grünen sterben oder wechselten die blauen ihren Rezeptor aus? Sprecher zeigte, dass die blauen Zellen tatsächlich plötzlich grüne Rezeptoren herstellen (*Nature* 2008, 454(7203):533-7). „Das Dogma der Determinierung einer Sinneszelle fürs Leben macht Sinn, weil man nicht einfach die Farbe wechseln kann. In diesem Fall war es aber so“, freut sich Sprecher.

Das Problem der grünen Rezeptoren bleibt Sprecher erhalten. Vorläufig kann er nur spekulieren: „Wenn diese Komponente außerhalb des Labors fehlt, wacht die Fliege vielleicht etwas zu spät auf und wird vom Vogel gefressen.“

FLORIAN FISCH

Protein Purification

His60 Nickel Superflow high-capacity Ni-IDA resin

- Up to 60 mg/ml of recombinant his-tagged protein
- Low metal ion leakage in eluted his-tagged protein
- For purification under native or denaturing conditions
- Use for batch/gravity flow and automated FPLC purification

Available as resin, gravity flow columns or 1 and 5 ml cartridges for FPLC purification.

Request your free sample today!

www.clontech-europe.com/his60

orders@clontech-europe.com

Clontech Laboratories, Inc.
A Takara Bio Company
www.clontech.com

Takara Bio Europe, SAS
Europe: +33.(0)1 3904 6880 • Toll free tel: Austria: 0800 296 141 • Germany: 0800 182 5178 • Switzerland: 0800 563 629

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale. Clontech, the Clontech logo and all other trademarks are the property of Clontech Laboratories, Inc. unless noted otherwise. ©2011 Clontech Laboratories, Inc.

Clontech