

## Hochauflösende und dreidimensionale Visualisierung der Gehirnentwicklung von *Drosophila*

Peter Robin Hiesinger und Karl-Friedrich Fischbach,  
 Institut für Biologie III, Universität Freiburg

► Die Taufliege *Drosophila melanogaster* ist einer der bestuntersuchten Modellorganismen in der Entwicklungsbiologie und Neurobiologie. Aber warum interessiert gerade ein Fliegengehirn, und wie läßt sich ein solches untersuchen? Anatomisch ist es völlig anders aufgebaut als unser eigenes Gehirn, obgleich in letzter Zeit erstaunliche Verwandtschaften der Hirnanlagen entdeckt wurden. Insbesondere aber ist es sehr klein – und doch verschalten sich gut eine Viertelmillion Nervenzellen über viele Millionen Synapsen zu einem wenige hundert Mikrometer großen Biocomputer, der das zwei bis drei Millimeter lange Flugobjekt „Fliege“ sicher durch einen dreidimensionalen Raum voller Hindernisse fliegen und auf Wänden landen lassen kann. Sogar komplizierte Lernstudien werden mit Fliegen durchgeführt. Nicht nur für Entwicklungsbiologen und Gehirnforscher ist es faszinierend festzustellen, wie komplex bereits dieses kleine Gehirn ist (und wie wenig wir davon verstehen). Tatsächlich lassen sich praktisch alle wesentlichen Aspekte neuronaler Entwicklung in Fliegen als Modellsystem für den Bau eines Gehirns nachvollziehen. Experimentell zugänglich ist *Drosophila* insbesondere neurogenetisch. Für hunderte an der Entwicklung des Nervensystems beteiligter Gene sind mutante Allele beschrieben oder lassen sich vergleichsweise einfach mutante Tiere herstellen.

Bei der Analyse solcher mutanter Gehirne ist hochauflösende Mikroskopie ein unverzichtbares Hilfsmittel. Insbesondere die Untersuchung der Feinstruktur neuronaler Verästelungen und Verknüpfungen wäre in einem so kleinen Gehirn nicht ohne moderne Visualisierungstechniken auf der Basis von Lasermikroskopen oder Elektro-

nenmikroskopen möglich. Sogenannte konfokale Laser-Scanning-Mikroskope können fluoreszenzmarkierte Gehirnpräparate in definierten Tiefen mikrometergenau abtasten. Mit dem konfokalen Mikroskop gewonnene Bilder stellen somit Schnitte in der Tiefenebene des Präparates dar. Serien solcher optischer Schnitte mit wenigen hundert Nanometern Abstand kön-

nen definierten Oberflächen visualisiert und analysiert werden.

### Das Fliegengehirn als Modellsystem für neuronale Entwicklung

Die Anzahl der Nervenzellen eines menschlichen, aber auch eines Fliegengehirns übersteigt um ein Vielfaches die Zahl der zur Verfügung stehenden

Korrelat für Information im Gehirn ist die synaptische Verschaltung. Die Anzahl der Synapsen übersteigt denn auch die Zahl der Nervenzellen nochmal um das 100 bis 1000fache. Deren Information-enthaltende Verschaltung ist der letzte Schritt des Gehirnbaus, also späte neuronale Entwicklung. Und wieder läßt uns die Fliege staunen: Von der Entstehung der ersten Synapse bis zum fertigen Gehirn vergehen während der Verpuppung gerade einmal 50 Stunden!

Das visuelle System von *Drosophila* ist für die neurogenetische Untersuchung besonders geeignet, weil es für das Überleben des Tieres unter Laborbedingungen nicht notwendig ist.

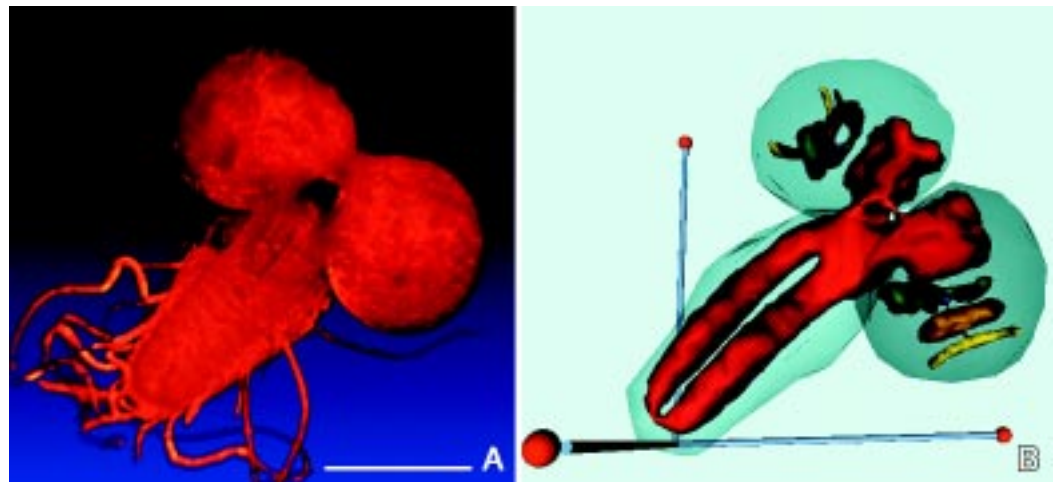
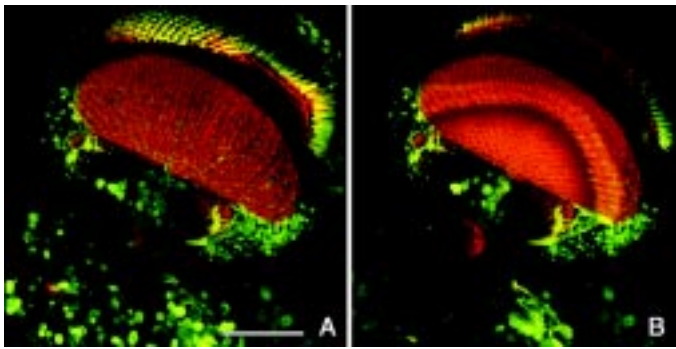


Abb. 1: Gehirn einer Fliegenlarve. (A) Volumenrekonstruktion einer Gehirnfärbung. (B) Blick ins Gehirn: Oberflächenrekonstruktion des Zentralhirns der Larve (rot) sowie sich entwickelnder Gehirnstrukturen des visuellen Systems der späteren Fliege (grün, braun, gelb). Balken in (A) entspricht 200 µm in (A) und (B).

nen anschließend benutzt werden, um bestimmte Gehirnregionen (oder aufgrund ihrer Kleinheit mit verringerter Auflösung sogar ganze Gehirne) dreidimensional zu rekonstruieren. Kombiniert mit der Leistungsfähigkeit moderner Grafikbeschleunigter Rechner wird somit die Mikroskopie routinemäßig vom Mikroskop zum Computer verlagert: Das Mikroskop wird nur noch genutzt, um einen dreidimensionalen Datensatz (Serienscan) aufzunehmen, und die eigentliche Beobachtung und Auswertung findet anschließend auf einem Grafik-Computer mit entsprechender 3D-Software statt. Auf dem Computer kann das Objekt erneut geschnitten, in seinem ganzen Volumen oder

Gene. Das ist das Wunder der Entwicklungsbiologie: Wie wenig Information ist tatsächlich notwendig, um ein komplexes System entstehen zu lassen, wenn weniger Ort und Zeit jedes Details festgelegt werden als vielmehr Regeln, die Rahmenbedingungen schaffen in Spielen, welche Einzelschicksale beteiligter Zellen zwar ungewiß lassen, aber das makroskopische Resultat durchaus determinieren. Nirgends wird dies deutlicher als bei der Entwicklung des Gehirns, welches bereits vor jeder Erfahrung Information über die Welt enthalten kann. So weiß die Spinne nach ihrer Geburt bereits wie man ein Netz baut, und die Fliege weiß, wie man fliegt. Das morphologische

Somit lassen sich Entwicklungsstörungen mutanter visueller Neurone während der gesamten Entwicklung verfolgen. Bereits im larvalen Gehirn beginnt die Verdrahtung visueller Neurone des späteren adulten Tieres, obgleich die Larve ein eigenes vom adulten grundlegend unterschiedliches visuelles System besitzt. Damit ist das larvale Gehirn aus entwicklungsbiologischer Sicht ein besonders interessantes Gebilde: Es besteht einerseits aus funktionsfähigen Gehirnteilen, die für das Leben und Verhalten der Larve notwendig sind. Andererseits wird im selben Gehirn bereits mit dem Bau grundlegend neuer Gehirnstrukturen begonnen, die erst in der fertigen Fliege funk-



**Abb. 2:** Der Optische Lobus des sich entwickelnden Fliegenhirns. (B) zeigt eine angeschnittene Volumenrekonstruktion des optischen Lobus von (A). Rot ist eine Antikörperfärbung synaptischer Regionen, grün eine Markierung einiger Neurone und Glia-Zellen. Der hochgeordnete repetitive Aufbau wird insbesondere im Anschnitt deutlich. Balken in (A) entspricht 50  $\mu\text{m}$  in (A) und (B).

tionieren werden - besonders auffällig im visuellen System. Dreidimensionale Visualisierungen dieser Gehirnstrukturen [1, 4] sind in Abbildung 1 dargestellt; die Visualisierungstechniken werden weiter unten vorgestellt.

Während wir frühere neuronale Entwicklungsschritte wie axonale Wegfindung molekular in vielen Beispielen in Grundzügen bereits verstehen, sind die Mechanismen, die zur synaptischen Verschaltung führen, weniger zugänglich. Als wesentlicher Faktor wird spontane neuronale Aktivität für sogenanntes „Fine-Tuning“ am Ende der Gehirnentwicklung diskutiert, doch finden wir bereits morphologisch plastische Änderungen neuronaler Arborisationen, bevor Synapsen überhaupt gebildet werden. Solche Beobachtungen kann man zum Beispiel an Nervenzellen des visuellen Systems von *Drosophila* machen,

welches die Kleinheit des Verknüpfungsmusters für viele Untersuchungen durch einen außerordentlich geordneten repetitiven Aufbau wettzumachen vermag. Pro Auge wird 800mal ein identischer Satz von Photorezeptoren sowie nachgeschalteter Neurone – der Anordnung im Auge entsprechend – symmetrisch in den Neuropilen des optischen Lobus verschaltet (Abb. 2). Selbst subtile einzelne Verschaltungsfehler werden so 800fach amplifiziert und als Fehler der Musterbildung offenbar [2].

#### Mikroskopie am Computer

Die Untersuchung neuropiler Feinstruktur setzt Gehirnpräparate voraus, in denen die zu untersuchenden Strukturen selektiv markiert sind. Gut geeignet sind Antikörperfärbungen synaptischer Moleküle. Die Färbung entsteht durch die Sekun-

därmarkierung mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper. Solche Präparate können sowohl in normalen Fluoreszenzmikroskopen wie auch im konfokalen Laser-Mikroskop untersucht werden. Während bei normaler Auflicht- oder Durchlicht-Mikroskopie die Lage des Präparats auf dem Objekttträger einen entscheidenden Beitrag zur Analysierbarkeit bestimmter Strukturen liefern kann, erlaubt die Aufnahme einer Bildserie mittels Konfokalmikroskopie eine weitgehend von der Lage des Präparats unabhängige Visualisierung am Computer. Ein Bildstapel kann grundsätzlich als dreidimensionaler Datensatz beschrieben werden, indem jeder Pixel eines Bildes nicht mehr eine zweidimensionale Identität innerhalb des Bildes hat, sondern eine dreidimensionale Identität innerhalb des Datenvolumens zugewiesen bekommt. Ein Bildstapel mit zum Beispiel 200 Bildern der Auflösung 512 x 512 Pixel wird also – unabhängig von seiner Entstehung als Serie zweidimensionaler Bilder – als dreidimensionales Datenvolumen mit 512 x 512 x 200 Datenpunkten (Voxeln) behandelt. In dieses Datenvolumen können nun beliebige Schnitte gelegt werden, die das Präparat in Ebenen zeigen, die am Mikroskop nicht zu beobachten gewesen wären (Abb. 3). Voraussetzung für solche wie auch im folgenden beschriebene Visualisierungstechniken ist neben der notwendigen Hardware insbesondere wissenschaftliche 3D-Visualisierungs-Software, wie das hier benutzte Programm Amira, welches vom Konrad-Zuse-Zentrum in Berlin entwickelt wurde [3].

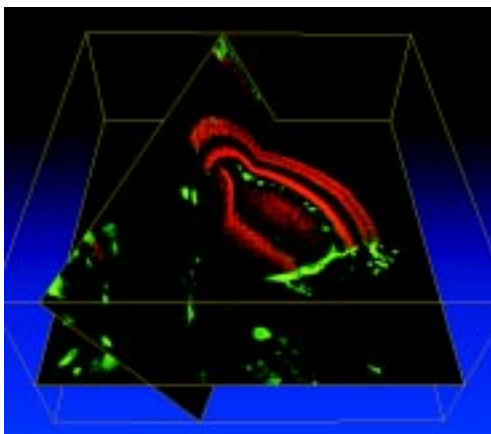
Für die Visualisierung der Projektionsgebiete von Photorezeptor-Neuronen während ihrer Entwicklung läßt sich ein Antikörper gegen ein Photorezeptorspezifisches Antigen einsetzen. Um unabhängig von der Lage des Präparats die kompletten Terminalienfelder vergleichen zu können, läßt sich aus den am Rechner „herauspräparierten“ dreidimensionalen Daten das Volumen rekonstruieren, z.B. mittels eines Raytracing-Algo-

rithmus (Abb. 4). Ganz ähnlich professioneller digitaler Filmproduktion können solche aus verschiedenen Winkeln aufgenommenen Einzelbilder anschließend zu einer Animation zusammengefügt werden.

Für die Entwicklung neuronaler Arborisation von Photorezeptor-Neuronen konnte so gezeigt werden, daß die Bildung eines Geflechts filopodialer Kontakte bereits kurz nach der axonalen Wegfindung einsetzt und erst sekundär zu einem geordneteren Neuropilmuster durch Zurückziehen eines Großteils dieser Kontakte wird [2]. Erst wenn dieser Entwicklungsabschnitt über 30% der gesamten Gehirnentwicklung fortgeschritten ist, beginnt die Synaptogenese, d.h. die eigentliche Bildung synaptischer Kontakte. In einem weiteren Schritt kann man sich mit ganz ähnlichen Techniken auch den molekularen Grundlagen während solcher Entwicklungsphasen nähern. Antikörperfärbungen sind nämlich nicht nur Marker für Strukturen, sondern in erster Linie ein Nachweis für das Vorkommen von Proteinen an einem spezifischen Ort zu bestimmten Entwicklungszeiten. Damit lassen sich Hinweise auf die Funktion bestimmter Genprodukte sammeln.

#### Veröffentlichung dreidimensionaler Mikroskopie-Daten im Internet

Bei der Rekonstruktion von Volumina wird die maximale Information der Daten zur Visualisierung eingesetzt. Eine Manipulation des kompletten dreidimensionalen Objekts ist daher mit großem Rechenaufwand verbunden und nur auf leistungsstarken Grafikrechnern bei begrenzend großen Datensätzen möglich. Eine Alternative zur Veröffentlichung zweidimensionaler vorverarbeiteter Daten stellt die Präsentation von Oberflächen-Rekonstruktionen dar. Dabei wird entweder durch Schwellwert-Definition oder Handsegmentierung der Strukturen von Interesse eine Menge von zusammenhängenden Koordinaten festgelegt, die das „In-



**Abb. 3:** Mit der 3D-Visualisierungssoftware Amira [3] kann ein dreidimensionaler Datensatz in beliebigen Ebenen geschnitten und dargestellt werden.

nen“ des Objektes vom „Außen“ abgrenzen – der Datensatz wird also binarisiert. Eine Beschreibungssprache für solche dreidimensionalen Koordinaten-Dateien ist die Virtual Reality Modeling Language (VRML), welche zusätzlich die Einfügung und interaktive Manipulation des originalen Bildmaterials ermöglicht (Abb. 1B und 5). Die hier vorgestellten Techniken wurden erst kürzlich eingesetzt für die Rekonstruktion des kompletten larvalen und adulten *Drosophila*-Gehirns [1], so daß nunmehr dreidimensionale Modelle der Forschungsgemeinde über das Internet zur Verfügung stehen. Mit dem Online Journal FLYBRAIN ([www.flybrain.org](http://www.flybrain.org)) ist eine Plattform geschaffen worden, die solche Daten zentral sammeln kann [5].

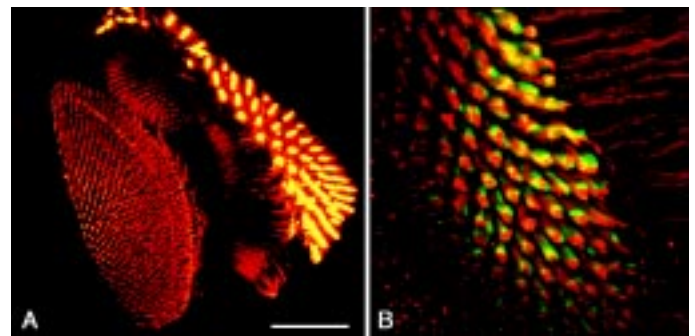
**Lichtmikroskopie an der Auflösungsgrenze: Dekonvolution**

In Kombination mit der Visualisierung ausgewählter dreidimensionaler Strukturen ist die weitestgehende Ausnutzung der Auflösungsgrenze für die Darstellung solcher kleiner Strukturen natürlich erstrebenswert. Bei der Benutzung des konfokalen Laser-Mikroskops liegt die Auflösungsgrenze ungefähr bei 500 nm in der Bildebene und etwas darüber in der Tiefenebene. Tatsächlich können aber auch zwei Punkte kleineren Abstands aufgelöst werden, wenn man die artifizielle Lichtverteilung solcher Punkte „herausrechnet“. Diese Lichtverteilung kommt durch unvermeidliche Streuungs- und Brechungseffekte innerhalb des inhomogenen Präparats sowie Imperfektionen der Optik zustande und wird in der Point Spread Function (PSF) zusammengefaßt. Die PSF für einen gegebenen Punkt läßt sich tatsächlich experimentell ermitteln, indem man eine kleine fluoreszierende Kugel (z.B. von 500 nm Durchmesser) in ein Präparat injiziert und mit dem Mikroskop scannt (Abb. 6). Das Zurückrechnen der artifiziellen Lichtstreuung mittels einer bekannten oder unbekannten PSF wird Dekonvolution genannt [6].

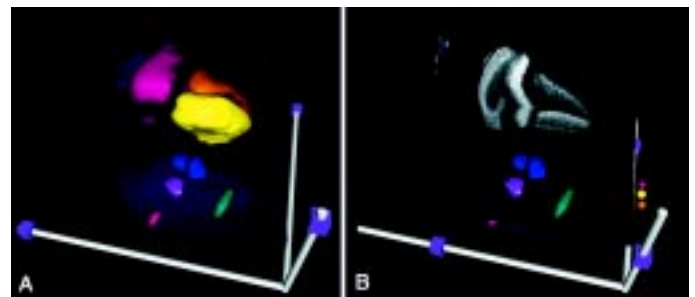
Viele interessante Strukturen liegen aufgrund der geringen Größe der Fliege und ihrer Zellen nahe an oder unter der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie. Dazu gehören zum Beispiel auch Terminalien von Photorezeptor-Neuronen mit einem Durchmesser von 0,5 - 1 µm oder intrazelluläre Strukturen wie der Spindelapparat während der Zellteilung (Abb. 6). Soll nun die Lokalisation von Strukturen an der Auflösungsgrenze untersucht werden, ist Dekonvolution notwendig. Auf diese Weise kann zum Beispiel entschieden werden, ob ein Protein eher im Cytosol oder in der Außenmembran der Terminalien vorkommt oder wie ein fehlerhafter Spindelapparat während der Zellteilung in einer Mutante aussieht. Damit liefert die hochauflösende dreidimensionale Visualisierung einer Antikörperfärbung konkrete Hinweise auf den Funktionszusammenhang eines untersuchten Genprodukts.

**Ausblick**

Während die große Stärke der entwicklungsbiologischen und neurobiologischen Forschung im Modellsystem der Fliege die Genetik ist, hängt deren Anwendbarkeit maßgeblich auch von der Erkennbarkeit phänotypischer Veränderungen ab. Ein Grund, warum bis heute mehr über axonale Wegfindung als die nachfolgende Arborisation von Neuronen gearbeitet wurde, ist sicherlich auch die wesentlich schwierigere Darstellung – und überhaupt Erkennung – solcher Defekte. Dabei sind die hier erwähnten, auf Konfokalmikroskopie basierenden Visualisierungstechniken im großen und ganzen nicht einmal so neu. Jedoch hängt ihre Anwendbarkeit von der zu ihrem sinnvollen Einsatz notwendigen Rechnerleistung ab. Sowohl die dreidimensionale Visualisierung als auch dreidimensionale Dekonvolution haben daher erst in den letzten Jahren Einzug in die routinemäßige phänotypische Analyse gehalten. Sowohl die



**Abb. 4: Raytracing-Volumen-Rekonstruktionen visueller Neurone. (A) Photorezeptoren mit Terminalienfeldern in der Lamina und Medulla. (B) Hochauflösende Darstellung von synaptisch verschaltenden Neuronen in der Lamina (rot: Photorezeptoren; grün: postsynaptische Neurone). Balken in (A) entspricht 50 µm in (A) und 20 µm in (B).**

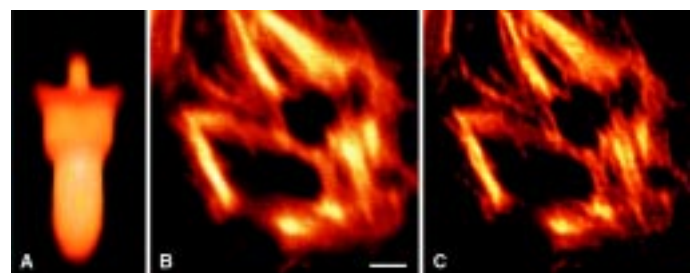


**Abb. 5: Virtual Reality Modeling Language (VRML) 3D-Modelle (hier optischer Lobus) können zur interaktiven Manipulation von Strukturen und Bilddaten im WWW veröffentlicht werden.**

notwendige Hard- als auch Software sind erst seit kurzem für einen verbreiteten Einsatz erschwinglich geworden. Zusammen mit der Möglichkeit echte 3D-Daten, also nicht nur Bilder und deren Animationen, über das Internet parallel zur normalen Publikation in elektronischen Zeitschriften zu veröffentlichen, wird in Zukunft wohl nicht nur die Gehirnforschung an einer kleinen Fliege profitieren.

**Literatur**

[1] Rein, K., Hiesinger, P. R., Zöckler, M., Kirsten, J., Fischbach, K.-F. and Heisenberg, M. (2000). Flybrain - Electronic Journal, <http://www.flybrain.org>; Accession Number AB00200.  
 [2] Hiesinger, P. R., Reiter, C., Schau, H. and Fischbach K.-F. (1999). *J. Neurosci.* 19, 7548-7556  
 [3] Amira Visualisierungs-Software: <http://www.amiravis.de>  
 [4] Rein K., Zöckler M., Heisenberg M. (1999) *Curr Biol.* 9, 93-6.  
 [5] Armstrong J. D., Kaiser K., Müller A., Fischbach K.-F., Merchant N.,



**Abb. 6: Dekonvolution dient der Korrektur konfokaler Scandaten. (A) Original-Scan einer 500 nm-Kugel. Der Verlust der Kugelform wird durch Dekonvolution weitgehend rückgängig gemacht (B,C) Mutanter Spindelapparat einer Zelle vor und nach Dekonvolution (Präparat von Dr. H. Gert de Couet). Balken in (B) entspricht 1 µm in (B) und (C).**

*Strausfeld N. J. (1995). Neuron 15, 17-20.*

[6] *Holmes T. J., Bhattacharyya S., Cooper J. A., Hanzel D., Krishnamurthi V., Lin W., Roysam B., Szarowski D. H., Turner J. N. (1995). In: Handbook of Biological Confocal Microscopy (ed JB Pawley), New York: Plenum Press. pp 389-402.*

#### Korrespondenzadressen

*Dr. Peter Robin Hiesinger*

Howard Hughes Medical Institute  
Baylor College of Medicine  
T634, One Baylor Plaza  
Houston, TX 77030, USA  
eMail: robin@biologie.uni-freiburg.de

*Prof. Dr. Karl-Friedrich Fischbach*

Institut für Biologie III  
Universität Freiburg  
Schänzlestr. 1, 79104 Freiburg  
eMail: kff@uni-freiburg.de