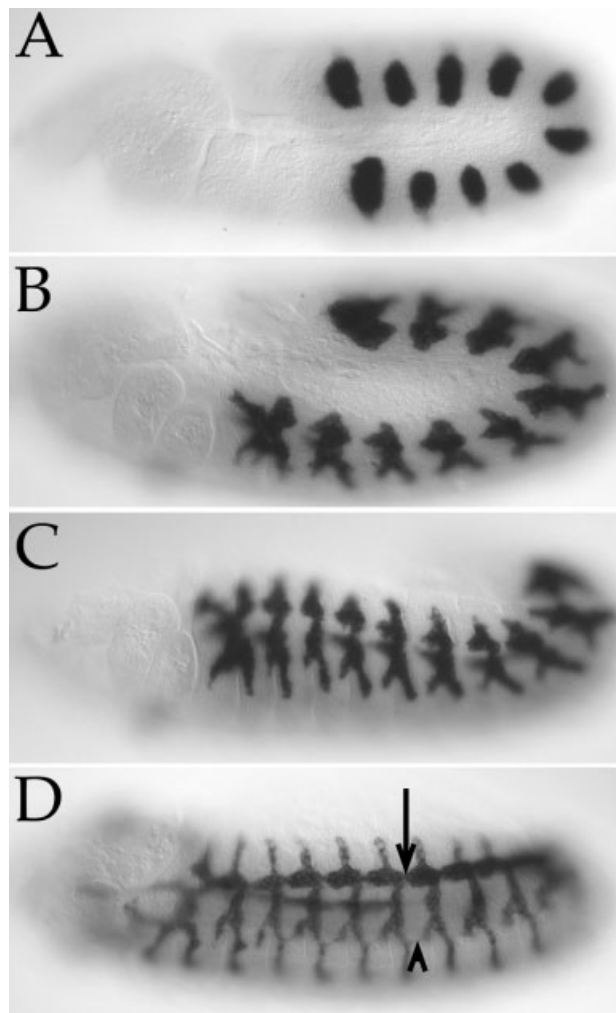


## Das Tracheensystem von *Drosophila*: ein Modell zur Bildung tubulärer Netzwerke

Reinhard Schuh, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen



**Abb. 1:** Die Entwicklung des embryonalen Tracheensystems von *Drosophila melanogaster*. Die Tracheenzellen sind durch einen spezifischen Marker sichtbar gemacht. (A) Tracheale Metamere im ausgestreckten Keimstreif. (B) Beginn des primären Auswachsens der Tracheenäste während der Keimstreifverkürzung. (C) Tracheenästabildung kurz vor Ende der Keimstreifverkürzung (D). Primäre Tracheenäste kurz nach der Fusion mit ihren Partnern. Anterior ist links; dorsal ist oben.

► Alle höher entwickelten Tiere benötigen weitverzweigte, dreidimensionale Röhrensysteme, um den Transport von Gasen und Flüssigkeiten zu ihren Geweben und Organen zu gewährleisten. Solche Strukturen sind z. B. das Blutkreislaufsystem und die Lunge von Säugetieren (RIESAU, 1997) sowie die Tracheen (Luftschläuche) der Insekten. Die Tracheenentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* bietet die Möglichkeit, zelluläre und molekulare Vorgänge, die zur Entstehung solcher tubulärer Netzwerke führen, besser zu verstehen (AFFOLTER and SHILO, 2000).

Das Tracheensystem ist das Atmungsorgan von *Drosophila*. Seine Hauptaufgabe besteht darin, den Gastransport durch Diffusion von und zu Körpergeweben sicherzustellen. Die Bildung des Tracheensystems

beginnt 4 Stunden nach Eiablage (ausgestreckter Keimstreif) mit der Differenzierung trachealer Zellgruppen aus lateralen epidermalen Zellen (Abb. 1A). Diese 20 trachealen Zellgruppen, je 10 auf jeder Seite des Embryos, werden als tracheale Metamere bezeichnet. Sie bestehen je aus ca. 80 Zellen, die sich bis zum Ende der embryonalen Tracheenmorphogenese nicht mehr weiterteilen. Durch koordinierte Zellbewegungen invaginieren die Metamere in das Innere des Embryos und bilden tubuläre Tracheenäste aus, die sich nach einem stereotypen Muster verzweigen (Abb. 1B,C). Bestimmte Tracheenäste wachsen in Richtung der beiden benachbarten Tracheenmetamere aus und fusionieren mit komplementären Tracheenästen der Nachbarsegmente (Abb. 1D). Dadurch werden die bis dahin ver-

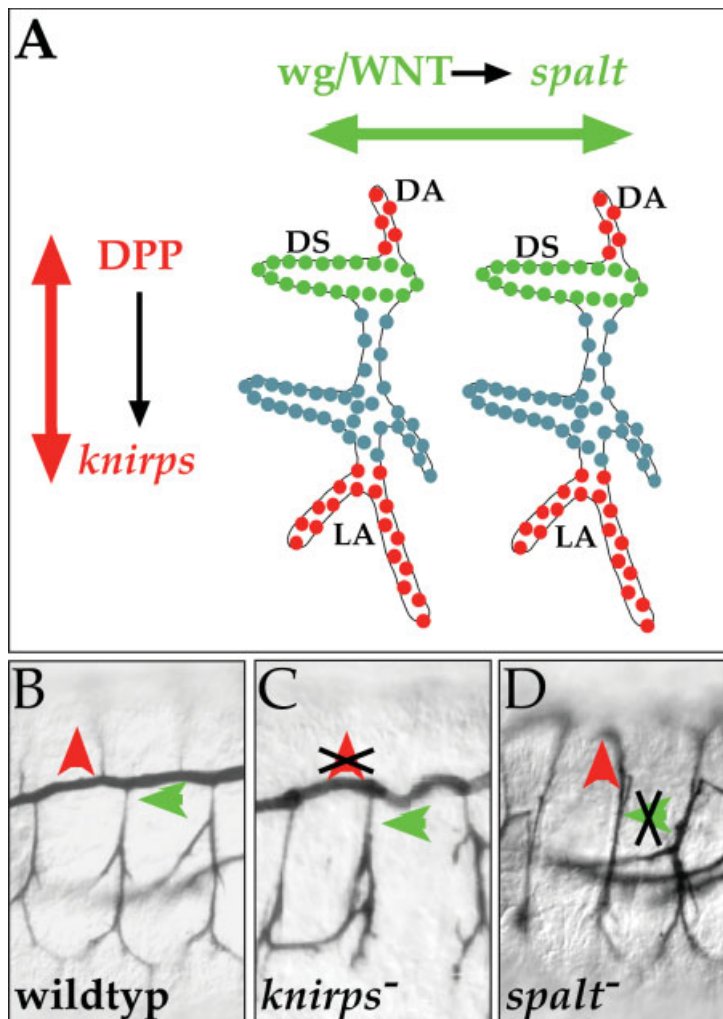
einzelnen trachealen Metamere durch eine durchgängige Hauptverbindung (Dorsalstamm; Pfeil in Abb. 1D) und eine laterale Verbindung (Lateralstamm; Pfeilkopf in Abb. 1D) verknüpft. Durch weitere dorsale und ventrale Verbindungen der Tracheen entsteht ein dreidimensionales tubuläres Netzwerk. Die Bildung einzelliger sekundärer und terminaler Tracheenäste, die Kontakt zum Zielgewebe aufnehmen und der direkten Versorgung mit Sauerstoff dienen, stellt dann den Endpunkt der embryonalen Tracheenentwicklung dar. Diese gesamte Morphogenese ist ausschließlich auf morphologische Veränderungen der Tracheenzellen zurückzuführen und folgt einem stereotypen, ontogenetisch reproduzierbaren Muster, das in der Insektenevolution konserviert ist. Daher ist eine strikte Kontrolle der Tracheenmorphogenese durch ein genetisches Programm anzunehmen.

Während der letzten Jahre wurden einige Gene identifiziert, die eine spezifische Funktion während der frühen Tracheenbildung besitzen und an den Zellmigrationsprozessen beteiligt sind. So bilden sich z. B. in Embryonen, die einen Defekt in dem Gen *tracheae defective* (*tdf*) aufweisen, noch Tracheenzellen aus. Diese verharren allerdings an der Oberfläche des Embryos und bilden keine trachealen Äste. Die Zellen haben also die Fähigkeit verloren zu migrieren (EULENBERG and SCHUH, 1997).

### Genregulatoren vermitteln orientierte Zellwanderung

Nachdem die ca. 80 Zellen jedes einzelnen trachealen Metamers in das Mesoderm eingewandert sind, beginnen sich stereotyp Tracheenäste auszubilden (Abb. 1B). Diesen morphogenetischen Bewegungen liegt tracheale Zellmigration, sowohl entlang der anterior-posterioren als auch der dorso-ventralen Körperachse, zugrunde. Für die Kontrolle der Migration entlang beider Körperachsen sind zwei verschiedene Signaltransduktionskaskaden notwendig (Abb. 2).

Der *wingless* (*wg*)/WNT-Signaltransduktionsweg kontrolliert das anterior-posteriore Auswachsen von Tracheenzellen. In mutanten Embryonen, die einen Funktionsausfall einzelner Komponenten dieses Signalwegs aufweisen, erfolgt kein anterior-posteriore Auswachsen von Tracheenästen (LIMARGAS, 2000). *spalt* ist ein Zielgen des *wg*/WNT-Signalwegs und wird in den Vorläuferzellen des Dorsalstamms (tracheale Hauptverbindung) exprimiert. Dort ist der Genregulator Spalt sowohl für die Identität dieser Zellen als auch für ihr anterior-posteriore Migrationsverhalten essentiell (Abb. 2A,D; KÜHNLEIN and SCHUH, 1996).



**Abb. 2: Kontrolle von Tracheenastbildung durch Signaltransduktionskaskaden.** (A) *wingless (wg)/WNT*-Signaltransduktion kontrolliert über das Zielgen *spalt* das Auswachsen des Dorsalstamms (DS) in anterior-posteriorer Richtung. *DPP*-Signaltransduktion kontrolliert über das Zielgen *knirps* das dorsale Auswachsen der Dorsaläste (DA) und das ventrale Auswachsen der Lateraläste (LA). Markierung des Tracheenlumens von einem normalen (B), einem *knirps* mutanten (C) und einem *spalt* mutanten (D) Embryo. Die Pfeile zeigen die Wachstumsrichtung spezifischer Tracheenäste. Durchgestrichene Pfeile weisen auf das Fehlen bestimmter Tracheenäste hin. *knirps* mutanten Embryonen fehlen Dorsaläste und Lateraläste; in *spalt* mutanten Embryonen werden keine Dorsalstämme gebildet.

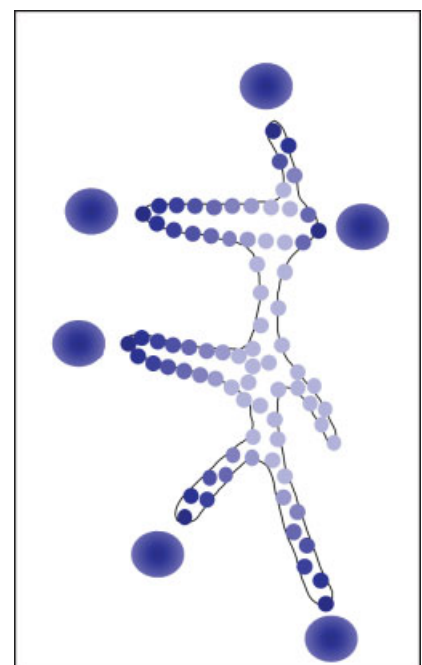
Der *decapentaplegic (dpp)*-abhängige Signaltransduktionsweg über Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen ist für die Migration von Tracheenzellen in dorso-ventraler Richtung notwendig (RUBERTE *et al.*, 1995). DPP wird in Zellen synthetisiert, die sich dorsal und ventral zu den sich entwickelnden trachealen Plakoden befinden. Deshalb wird nur in dorsalen und ventralen Zellen eine DPP-abhängige Signaltransduktion ausgelöst und die Expression des Gens *knirps* induziert (Abb.2A). *knirps* kodiert ebenso wie *spalt* für einen Genregulator, der nachgeschaltete Gene kontrolliert. Die regionsspezifische *knirps*-Expression in dorsalen und ventralen Tracheenzellen ist notwendig, um ein dorso-ventrales Auswachsen der Tracheenäste zu gewährleisten. Bei einem Funktionsverlust von *knirps* unterbleibt dieser Prozess und

damit die dorso-ventrale Zellwanderung (Abb.2C). Wenn *knirps* über ein zellspezifisches Transgen in Tracheenzellen aktiviert wird, die normalerweise anterior-posteriore Zellwanderung durchführen, dann beginnen diese Zellen in dorso-ventraler Richtung auszuwachsen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Knirps als Kompetenzfaktor für die dorso-ventrale Zellmigration wirkt und Gene aktiviert, die an diesem Prozess beteiligt sind (VINCENT *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 1998).

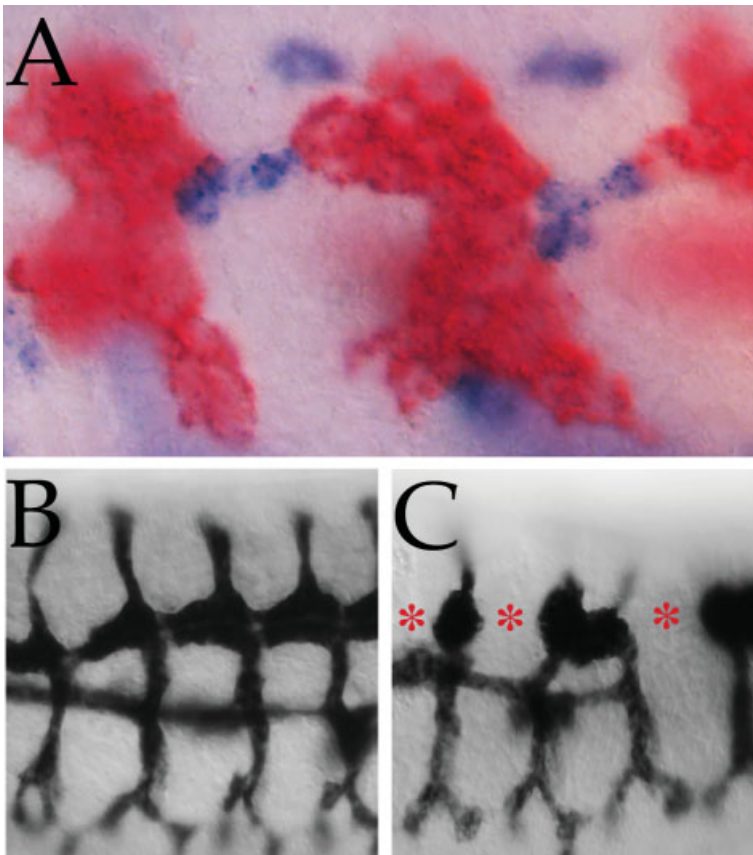
Wie die Genregulatoren Spalt und Knirps Tracheenzellen programmieren, damit diese in bestimmte Richtungen wandern, ist völlig ungeklärt. Es ist aber zu erwarten, dass die Identifikation und Analyse von Zielgenen dieser Genregulatoren zu einem besseren Verständnis orientierter Zellmigration, nicht nur in *Drosophila*, führen wird.

### Geleitete tracheale Zellwanderung

Das dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) aus Säugetieren homologe Protein aus *Drosophila* (dFGF; kodiert von dem Gen *branchless*) wird in kleinen Zellgruppen um die einzelnen trachealen Metamere herum synthetisiert. dFGF wird von diesen Zellen sekretiert und diffundiert extrazellulär in alle Richtungen. Nun befinden sich aber nur auf der Zelloberfläche von Tracheenzellen spezifische Rezeptoren für dFGF. Dadurch wird ausschließlich in Tracheenzellen eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade eingeschaltet, die über bisher unbekannte Mechanismen zu Veränderungen der Zellmorphologie und zur Zellmigration führt. Hierbei scheinen die Zellen unterschiedliche dFGF-Konzentrationen zu messen und dadurch koordiniert in Richtung der dFGF-Quellen auszuwachsen (Abb.3). Sowohl die molekulare Grundlage der Zellformgebung als auch das Messen der dFGF-Konzentration und deren Umsetzung in gerichtetes Auswachsen ist bisher nur in Ansätzen verstanden (SUTHERLAND *et al.*, 1996; METZGER and KRASNOW, 1999). Interessanterweise scheint FGF nicht nur im Atmungsorgan von *Drosophila*, sondern auch in Säugern eine Rolle für die Bildung tubulärer Lungenstrukturen zu spielen (Überblick: WARBURTON *et al.*, 2000).



**Abb. 3: Geleitete Astbildung durch den *Drosophila* Fibroblasten-Wachstumsfaktor (dFGF).** dFGF wird in Zellgruppen (blaue Kreisflächen) gebildet und diffundiert in das umliegende Gewebe. Tracheenzellen messen die dFGF-Menge und wachsen in Richtung der höchsten dFGF-Konzentration (geleitete Zellwanderung).



**Abb. 4:** (A) Die „Brücken-Zellen“ verbinden die trachealen Metamere 2,5 Stunden vor deren Fusion. Die „Brücken-Zellen“ werden durch *hunchback*-Genexpression (blau) - und die Tracheenzellen durch Markerexpression (rot) sichtbar gemacht. (B, C) Markierung von Tracheenzellen und Netzwerkbildung in einem normalen Embryo (B) und das Fehlen (rote Sterne in C) der trachealen Hauptverbindung in einem Embryo ohne „Brücken-Zellen“ (C).

Obwohl dFGF die meisten Tracheenäste instruiert, in eine bestimmte Richtung zu wachsen, hat es für die Bildung des Dorsalstamms nur eine permissive Funktion, d.h. es ist zwar in diesen Zellen für die Zellmigration notwendig, gibt aber nicht die Richtung der Migration an. Dieser experimentelle Befund führte zu der Annahme, dass zusätzliche Mechanismen an dem geleiteten Auswachsen trachealer Äste beteiligt sein müssen (SUTHERLAND *et al.*, 1996).

Mit der Entdeckung und Analyse von „Brücken-Zellen“ wurde ein neuer zellulärer Mechanismus beschrieben, der das geleitete Auswachsen von Dorsalstammzellen kontrolliert (WOLF and SCHUH, 2000). Bei den „Brücken-Zellen“ handelt es sich um einzelne mesodermale Zellen, die durch spezifische Expression des Gens *hunchback* identifiziert werden können. Die einzelnen Zellen befinden sich posterior benachbart zu jedem trachealen Metamer. Wenn die Metamere das primäre Auswachsen der Tracheenäste einleiten, beginnen sich die „Brücken-Zellen“ in anterior-posteriorer Richtung zu strecken und scheinen sich mit den anterioren Dorsalstammästen der posterior be-

nachbarten Metamere zu verbinden (Abb. 4A). Somit vernetzen „Brücken-Zellen“ die einzelnen Metamere 2,5 Stunden bevor der Dorsalstamm fusioniert.

Die Lebensfähigkeit der „Brücken-Zellen“ ist von spezifischer *hunchback*-Expression abhängig, da „Brücken-Zellen“ in *hunchback*-mutanten Embryonen sterben. Daher können diese Embryonen als Modell zur *in vivo*-Analyse der „Brücken-Zellen“ genutzt werden. In *hunchback*-mutanten Embryonen ist das primäre Auswachsen der Tracheenäste normal und die meisten Äste fusionieren mit ihren entsprechenden Partnern. Dies gilt nicht für die anterioren und posterioren Dorsalstammäste, die normalerweise den Dorsalstamm bilden. Zwar wachsen diese Äste anfänglich normal aus, sind aber später in ihrem Wachstum gehemmt, oder die Äste wachsen in falsche Richtungen. Das hat zur Folge, dass die Dorsalstammäste nicht normal fusionieren und der Dorsalstamm nicht gebildet wird (Vergleiche Abb. 4B mit C). Somit sind die „Brücken-Zellen“ essentiell für das geleitete Auswandern trachealer Dorsalstammzellen, obwohl die dFGF-Quellen in *hunchback*-mutanten Em-

bryonen vorhanden sind. Weitere Untersuchungen haben zu einem Modell über die Funktion der „Brücken-Zellen“ geführt: dFGF-Quellen leiten das primäre Auswachsen von Dorsalstammästen ein. Scheinbar können diese Quellen den Ästen aber nur eine Grobrichtung vorgeben. Die genaue Richtung und das präzise Zusammenführen der Tracheenäste, eine Voraussetzung für eine normale Astfusion, wird durch „Brücken-Zellen“ kontrolliert. Möglicherweise dienen die „Brücken-Zellen“ als Richtungsweiser für Zellausläufer, die von Tracheenzellen ausgesandt werden und an der Oberfläche von „Brücken-Zellen“ entlangwandern. Treffen sich solche Zellausläufer von zwei aufeinander zuwachsenden Tracheenästen, wird die Fusion eingeleitet, und die Bildung des Dorsalstamms ist gewährleistet. Die Entdeckung der „Brücken-Zellen“ hat gezeigt, dass an der Netzwerkbildung durch die ektodermalen Tracheenzellen auch mesodermale Zellen beteiligt sind.

#### Ausblick

*Drosophila* ist als System zur Analyse von Musterbildungsprozessen etabliert. In den letzten Jahren hat es sich auch immer mehr als exzellentes Modell für das Studium der Organogenese durchgesetzt. Hervorragende genetische Zugänglichkeit, kombiniert mit ausgezeichneter molekularer Manipulierbarkeit, erlaubt die detaillierte Analyse zellbiologischer und molekularer Vorgänge während der Organentwicklung. Die Erkenntnis, dass identische molekulare Bausteine sowohl an der Ausbildung der Tracheen als auch der Lunge beteiligt sind, lässt erwarten, dass weitergehende Analysen an *Drosophila* zu Erkenntnissen führen, die ebenfalls für andere hochentwickelte Organismen von grundlegender Bedeutung sind.

#### Danksagung

Ich möchte mich bei allen meinen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern R. Kühnlein, K. Eulenberg, C.-K. Chen, C. Wolf, M. Behr, C. Krause, N. Gerlach und B. Adryan bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein besonderer Dank gilt H. Jäckle für seine fortwährende Unterstützung.





## Literatur

**Affolter, M., Shilo, B.-Z.** (2000). Genetic control of branching morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. *Curr. Opinon Cell Biol.* 12: 732–735

**Chen, C.-K., Kühnlein, R.P., Eulenberg, K.G., Vincent, S., Affolter, M., Schuh, R.** (1998). The transcription factors KNIRPS and KNIRPS RELATED control cell migration and branch morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. *Development* 125: 4959–4968

**Eulenberg, K.G., Schuh, R.** (1997). The *tracheae defective* gene encodes a bZIP protein that controls tracheal cell movement during *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J.* 16: 7156–7165

**Kühnlein, R.P., Frommer, G., Friedrich, M., González-Gaitán, M., Wagner-Bernholz, F.J., Gehring, W.J., Jäckle, H., Schuh, R.** (1994). *spalt* encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 13: 168–179

**Kühnlein, R.P., Schuh, R.** (1996). Dual function of the region-specific homeotic gene *spalt* during *Drosophila* tracheal system development. *Development* 122: 2215–2223

**Llimargas, M.** (2000). *wingless* and its signalling pathways have common and separable functions during tracheal development. *Development* 127: 4407–4417

**Metzger, R.J., Krasnow, M.A.** (1999). Genetic control of branching morphogenesis. *Science* 284: 1635–1639

**Risau, W.** (1997). Mechanism of angiogenesis. *Nature* 386: 671–674

**Ruberte, E., Marty, T., Nellen, D., Affolter, M., Basler, M.** (1995). An absolute requirement for both the type II and type I receptors, *punt* and *thick veins*, for *dpp* signaling *in vivo*. *Cell* 80: 889–897

**Sutherland, D., Samakovlis, C., Krasnow, M.A.** (1996). *branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* 87: 1091–1101

**Vincent, S., Ruberte, E., Grieder, N.C., Chen, C.-K., Haerry, T., Schuh, R., Affolter, M.** (1997). DPP controls tracheal cell migration along the dorsoventral body axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 124: 2741–2750

**Warburton, D., Schwarz, M., Tefft, D., Flores-Delgado, G., Anderson, K.D., Cardoso, W.V.** (2000). The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech. Dev.* 92: 55–81

**Wolf, C., Schuh, R.** (2000). Single mesodermal cells guide outgrowth of ectodermal tubular structures in *Drosophila*. *Genes Dev.* 14: 2140–2145

## Korrespondenzadresse

PD Dr. Reinhard Schuh  
eMail: [rschuh@gwdg.de](mailto:rschuh@gwdg.de)  
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie  
Abt. Molekulare Entwicklungsbiologie  
Am Fassberg  
37077 Göttingen