

Die Chemie und der Wurm: *Caenorhabditis elegans* als Plattform für das Zusammenführen von chemischer und biologischer Forschung

*S. Elizabeth Hulme und George M. Whitesides**

Stichwörter:

Biochemie · *Caenorhabditis elegans* ·

Chemische Biologie:

Chemische Biologie Modellorganismus: Wurm

Der Wurm

Ein Modellorganismus für Chemiker?

Angewandte
Chemie

Dieser Aufsatz diskutiert die Nützlichkeit des Wurms *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus für Chemiker, die an der Untersuchung lebender Systeme interessiert sind. *C. elegans*, ein 1 mm langer Rundwurm, ist ein beliebter Modellorganismus in nahezu allen Gebieten der modernen Biologie. Der Wurm hat zahlreiche Eigenschaften, die ihn für die Biologie attraktiv machen: Er ist klein (< 1000 Zellen), transparent und genetisch leicht zu manipulieren. Trotz seiner Schlichtheit weist der Wurm komplexe Phänotypen auf, die mit seiner Mehrzelligkeit zusammenhängen: Er hat differenzierte Zelltypen und Organe, er altern und hat eine wohldefinierte Lebenserwartung, er kann lernen und besitzt ein Erinnerungsvermögen. Der Aufsatz will verdeutlichen, dass diese Mischung aus Einfachheit und Komplexität den Wurm zu einem besonders nützlichen Werkzeug macht, um die Beziehungen zwischen Phänomenen auf molekularer Ebene und der Ebene des Gesamtorganismus zu erforschen (Altern, Verhalten, Kognition, Anfälligkeit für Krankheiten). Es werden vornehmlich solche Forschungsarbeiten vorgestellt, die chemisch relevant sind. Außerdem werden Instrumente und Arbeitstechniken – biologischer, chemischer und physikalischer Natur – vorgestellt, die uns zur Erforschung des Wurms zur Verfügung stehen.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4871
2. Die Biologie des Wurms	4877
3. Wie können Chemiker den Wurm nutzen?	4882
4. Welche Mittel stehen Chemikern zur Erforschung des Wurms zur Verfügung?	4893
5. Zusammenfassung und Ausblick	4900

1. Einleitung

Die Chemie bildet die Grundlage für die Biologie: Molekulare Wechselwirkungen stellen das Fundament und die Struktur jeglichen Lebens dar. Chemiker sind aber keine Biologen. Wie sollten Objekt und Forschungsziel eines Chemikers aussehen, der lebende Systeme untersuchen will? Ein möglicher Weg ist das Studium von Biomolekülen, ihrer Funktion und Wechselwirkungen untereinander. Molekulare Phänomene wie die molekulare Erkennung, der hydrophobe Effekt, Multivalenz, enzymatische Katalyse und Signalübermittlung sind noch längst nicht komplett verstanden und bleiben aktuelle und wichtige Forschungsschwerpunkte. Auf ihrem reduktionistischsten Niveau konzentriert sich die Forschung auf diesen Gebieten auf Prozesse, die individuelle Moleküle, eine begrenzte Anzahl an Molekülen, individuelle Reaktionen oder kleine Netzwerke von Reaktionen beinhalten.

Ein Verständnis von Biologie auf molekularer Ebene ist ohne Frage ein wichtiges Forschungsziel, und die Chemie ist ein ausgezeichnetes Mittel hierzu. Wie sieht es aber bei Fragestellungen aus, die auf höhere Ebenen abzielen? Was ist Leben? Wie entwickeln und erhalten Netzwerke von Molekülen, molekularen Wechselwirkungen und Reaktionen – ordentlich aufgeteilt und sortiert – diesen Satz von Eigenarten, den wir im Allgemeinen mit „Leben“ assoziieren? Moleküle sind nicht lebendig; organisierte Netzwerke von Reaktionen, die Moleküle ineinander überführen, sind es. Wie kommt diese Transformation zustande? Diese Fragen lassen sich nicht beantworten, indem lediglich Moleküle betrachtet werden. Es gibt Grenzen des Reduktionismus. Zellen und Organismen sollten stattdessen betrachtet werden. Zudem

gibt es Fragestellungen, die ausschließlich anhand mehrzelliger Organismen beantwortet werden können. Was ist Altern? Was ist Krankheit? Was ist Wahrnehmung? Was ist Verhalten? Wie schließen sich fundamentale molekulare Wechselwirkungen zu diesen komplexen Phänomenen zusammen? Wie sind die Organismen durch die Zellen organisiert, und wie wechselwirken und kommunizieren diese Zell-Bausteine? Wie entwickelt sich ein befruchtetes Ei – eine einzelne Zelle – zu einem Organismus? Dieser zweite Satz von Fragen zeigt eine Möglichkeit für Chemiker auf: Zu untersuchen, wie sich die biochemischen Prozesse, die innerhalb und zwischen individuellen Zellen ablaufen, zu den komplexen Phänotypen mehrzelliger Organismen, einschließlich des Menschen, verhalten.

1.1. Die Wahl von Modellen: Was ist der beste Organismus für Chemiker?

Die Evolution hat eine große Vielfalt an Kreaturen hervorgebracht. Vom einfachsten Bakterium bis hin zu äußerst komplexen, großen, mehrzelligen Organismen. „Komplexität“ kann vieles bedeuten.^[1,2] Ein „komplexer Organismus“ bedeutet eine große Anzahl von Komponenten, und eine

[*] Dr. S. E. Hulme, Prof. G. M. Whitesides
Department of Chemistry and Chemical Biology
Harvard University
12 Oxford Street, Cambridge, MA 02138 (USA)
Fax: (+1) 617-495-9857
E-Mail: gwhitesides@gmwgroup.harvard.edu
Homepage: <http://gmwgroup.harvard.edu>

Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen diesen Komponenten.^[3,4] Der Begriff Komplexität wird auch im Zusammenhang von organisatorischer Komplexität verwendet: Jeder Organismus besteht aus Zellen, und in komplexeren Organismen sind diese Zellen weiter organisiert zu Geweben und Organen.^[3,4] Die Vielfalt und Verschiedenheit des Lebens ist so enorm, dass es – um Anstrengungen zu bündeln und intellektuellen Pointillismus zu vermeiden – notwendig ist, seine Untersuchungen auf eine begrenzte Anzahl von Organismen, die auf der Grundlage von experimenteller Handhabbarkeit ausgewählt werden, zu beschränken und diese Organismen dann bis ins letzte Detail hinein zu verstehen. Die für diese Art von Studien ausgewählten Organismen werden allgemein als Modellorganismen bezeichnet. In Tabelle 1 ist eine Auswahl von Modellorganismen aufgeführt, die sowohl im Hinblick auf wissenschaftliche Aspekte als auch mit Blick auf praktische Aspekte bezüglich einer chemischen Erforschung gegenübergestellt werden.

Die einfachsten Modellorganismen sind Einzeller: einzellige Bakterien, Algen, Hefen und Protozyten. Einzellige Organismen sind selbstverständlich lebendig und gehören zu den am besten geeigneten Organismen, um Forschungen rund um die Frage „Was ist Leben?“ zu betreiben. *E. coli* ist wohl der am besten untersuchte Organismus; *Mycoplasma genitalium*, welches das kleinste Genom aller bekannten, in Reinkultur zur selbstständigen Reproduktion fähigen Organismen besitzt,^[5] ist wahrscheinlich am besten geeignet, um die Kernfrage nach der Art und Weise, wie molekulare Netzwerke lebendig werden, zu beantworten. Einzellige Organismen sind vielversprechende Studienobjekte im Hinblick auf zahlreiche Fragestellungen, haben jedoch auch Nachteile: Obwohl die Schlichtheit dieser Organismen (hinsichtlich dem Grad an interzellulären Wechselwirkungen, dem Differenzierungsgrad sowie der Größe und Komplexität des Genoms) in vielerlei Hinsicht hilfreich ist, ist ihr Nutzen mit Blick auf übergeordnete biologische Funktionen begrenzt. Hefen und Bakterienzellen unterliegen zeitabhängigen Änderungen, die als Hinweise auf zelluläre Alterungsprozesse gedeutet werden^[6,7] (so können beispielsweise Mutterzellen der Knospungshefe *Saccharomyces cerevisiae* nur eine begrenzte Anzahl an Tochterzellen hervorbringen^[6]), doch fehlt diesem Alterungsprozess in diesen Einzellern die große Vielfalt an Phänotypen, wie sie mit dem Alterungsprozess in Säugetieren einhergeht.

Diese Phänomene höherer Ordnung sind besonders im Bezug auf den Menschen relevant – Phänomene wie Altern,

Krankheit und Kognition treten in komplexer Form ausschließlich in mehrzelligen Lebensformen auf. Welcher ist der beste Organismus aus Sicht des Chemikers, der komplexe mehrzellige Organismen, Multizellularität im Allgemeinen und damit verbundene Folgen untersuchen möchte? Der ideale Organismus sollte einerseits komplex genug sein, um übergeordnete Fragen angehen zu können; andererseits sollte er schlicht genug sein, um experimentell handhabbar zu bleiben. Mehrzellige Organismen umfassen: 1) Organismen, die eine begrenzte oder keine zelluläre Differenzierung und auch keine wohldefinierte Lebensdauer haben (z. B. fadenförmige Hefen und Bakterien), 2) Organismen, die eine höhere zelluläre Differenzierung als die erste Gruppe aufweisen, aber keine wohldefinierte Lebensdauer haben (z. B. mehrzellige Pilze, mehrzellige Algen, soziale Amöben und Pflanzen), und 3) Organismen, die differenzierte Gewebe und Organe sowie eine definierte Lebensdauer aufweisen. Es ist eben diese dritte Gruppe, die Würmer, Fliegen, Zebrafische, Mäuse, Primaten und Menschen einschließt, an der wir als Menschen am meisten interessiert sind. Die Organismen dieser Gruppe, die die höchste Relevanz im Bezug auf die menschliche Biologie haben (d. h. andere Säugetiere wie Mäuse und Primaten), sind jedoch aus praktischer Sicht auch die kompliziertesten aufgrund ihrer Komplexität und auch mit Blick auf die damit verbundenen Kosten. Einer der einfachsten Organismen dieser Gruppe ist der Fadenwurm *C. elegans*: Ein 1 mm langer Rundwurm mit einer mittleren Lebenserwartung von zwei bis drei Wochen (bei 20°C), der zudem leicht und kostengünstig zu kultivieren ist.

Experimentell gesehen ist die Züchtung von *C. elegans* einfacher als die Haltung höherer Organismen wie Mäuse und viel einfacher das Züchten von Säugetierzellen. Das Experimentieren mit *C. elegans* ist frei von den ethischen Bedenken – und auch den damit einhergehenden Regularien –, mit denen die Arbeit mit höheren Organismen, vor allem Säugetieren verbunden ist. Die Aufzucht von *C. elegans* erfordert kein spezielles Training und keine spezielle Ausstattung.^[8] Die Würmer können bei Raumtemperatur auf der Laborbank gezüchtet und gehalten werden. Sterile Umgebungen sind im Falle von *C. elegans* weniger strikt einzuhalten als beim Anlegen von Säugetierzellkulturen, da verunreinigte Bestände von *C. elegans* leicht identifiziert und gereinigt werden können.^[8] Zudem ist beim gleichzeitigen Arbeiten mit mehreren *C. elegans*-Strängen das Auftreten von unentdeckt bleibenden Kreuzkontaminationen – einem ernsten Problem bei der Arbeit mit Säugetierzelllinien^[9] – unwahr-



S. Elizabeth Hulme studierte Chemie an der McGill University (B.S. 2004) und promovierte 2010 bei G. M. Whitesides an der Harvard University. Derzeit absolviert sie ein Postdoktorat bei Kurt W. Runge an der Cleveland Clinic und erforscht molekulare Mechanismen des Alterungsprozesses.



George M. Whitesides ist Woodford L. und Ann A. Flowers Professor an der Harvard University. Er promovierte 1964 bei Professor J. D. Roberts am California Institute of Technology (CalTech) und war von 1963 bis 1982 Mitglied der Chemischen Fakultät am Massachusetts Institute of Technology (MIT). Seine Forschungsinteressen liegen in den Bereichen Chemie, Materialwissenschaften und Biochemie.

Tabelle 1: Vergleich von Modellorganismen.

Organismus	(+) Vorteile und (–) Nachteile
Einzellige Prokaryoten	
<i>Escherichia coli</i> ^[251] Gram-negatives Bakterium; lebt im Darm von Tieren (Enterobakterium)	<ul style="list-style-type: none"> (+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Unkomplizierte genetische Werkzeuge existieren (+) Am besten untersuchter Organismus (+) Modell für die molekulare Genetik (–) Eingeschränkte Differenzierung (–) Eingeschränkte interzelluläre Wechselwirkungen
<i>Bacillus subtilis</i> ^[252] Gram-positives Bakterium; Erdboden bewohnend	<ul style="list-style-type: none"> (+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Einfaches Modell für die Differenzierung und Morphogenese (Sporulation) (–) Geringfügige Differenzierung, aber weit weniger als bei mehrzelligen Organismen (–) Eingeschränkte interzelluläre Wechselwirkungen
<i>Mycoplasma genitalium</i> ^[5] Kleinste bekanntes freilebendes Bakterium; humanpathogen	<ul style="list-style-type: none"> (+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Nützlich für das Verständnis des minimalen Satzes an Genen, den ein freilebender Organismus braucht (–) Eingeschränkte Differenzierung (–) Eingeschränkte interzelluläre Wechselwirkungen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^[253] Gram-negatives Bakterium; pathogen für Tiere und Pflanzen; humanpathogen (z. B. bei Mukoviszidose)	<ul style="list-style-type: none"> (+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Modell für bakterielle Virulenz, Biofilme, Quorum Sensing (–) Eingeschränkte Differenzierung (–) Eingeschränkte interzelluläre Wechselwirkungen
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ^[254] Archaeabakterium; braucht nur H ₂ , CO ₂ , N ₂ oder NH ₄ ⁺ und anorganische Salze; produziert CH ₄	<ul style="list-style-type: none"> (+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Alternative Treibstoffquelle(?) (+) Einzigartiger Stoffwechsel (–) Eingeschränkte Differenzierung (–) Eingeschränkte interzelluläre Wechselwirkungen (–) Stoffwechsel sehr verschieden zu höheren Organismen
<i>Rickettsia prowazekii</i> ^[255] Gram-negatives Bakterium; Genom ähnelt dem mitochondrialen Genom; obligat intrazelluläres Pathogen	<ul style="list-style-type: none"> (+) Genom ist bekannt (+) Modell für bakterielle Virulenz (–) Schwierig zu kultivieren (obligat pathogen) (–) Schwierige genetische Manipulation (–) Eingeschränkte Differenzierung (–) Eingeschränkte interzelluläre Wechselwirkungen
<i>Caulobacter crescentus</i> ^[256] Gram-negatives Bakterium; asymmetrische Teilung produziert begeißelte Zelle und gestielte Zelle	<ul style="list-style-type: none"> (+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Einfaches Modell für zelluläre Differenzierung und Entwicklung (–) Eingeschränkte interzelluläre Wechselwirkungen
Einzellige Eukaryoten	
<i>Giardia lamblia</i> ^[257] einzelliger begeißelter Eukaryot; freilebende Zyste oder Parasit (Säugetiere)	<ul style="list-style-type: none"> (+) Genom ist bekannt (+) Modellparasit (+) Einfaches Modell für zelluläre Differenzierung (–) Eingeschränkte interzelluläre Wechselwirkungen
<i>Acetabularia acetabulum</i> ^[258] große einzellige grüne Schirmalge (0,5–10 cm lang); wohldefinierte Morphologie (Rhizoid, Thallus und Schirm)	<ul style="list-style-type: none"> (+) Größter einzelliger Organismus (+) Einfaches Modell für Morphogenese/Entwicklung (+) Propfen verschiedener Zellen möglich (–) Zellgröße/Bauplan sehr verschieden zu höheren Organismen (–) Nicht für Hochdurchsatz-Verfahren geeignet
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ^[259, 260] grüne Alge; kann in der Dunkelheit gedeihen; besitzt ein einfaches visuelles System (Augenfleck)	<ul style="list-style-type: none"> (+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Modell für Photosynthese (+) Modell für Sehvermögen/Evolution des Sehvermögens

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Organismus	(+) Vorteile und (–) Nachteile
<i>Dictyostelium discoideum</i> ^[261] „soziale Amöbe“ oder „Schleimpilz“; entwickelt sich von der einzelligen Amöbe hin zum frei beweglichen mehrzelligen Verband; sporenbildende Fruchtkörper	(+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Modell für bakterielle Infektionen (+) Modell für Differenzierung und Entwicklung (+) Modell für chemotaktische Lokomotion (+) Kurzer Lebenszyklus (–) Zelluläre Organisation und Lebenszyklus sehr verschieden zu höheren Organismen
<i>Naegleria gruberi</i> ^[262] einzelliger Eukaryot; wechselt zwischen Amöbenform und Geißeltierchenform	(+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Simples Modell für zelluläre Differenzierung (–) Eingeschränkte interzelluläre Wechselwirkungen
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^[263] Knospungsshefe	(+) Einfaches Modell einer eukaryotischen Zelle (+) Genom ist bekannt (+) Direkte genetische Werkzeuge existieren (+) Einfache Entwicklung (Sporulation) (+) Einige interzelluläre Wechselwirkungen (Paarung)
Mehrzellige Eukaryoten (Evertebraten)	
<i>Arabidopsis thaliana</i> ^[264] Acker-Schmalwand (Schotenkresse, Gänserauke); fruchtlose, blühende Pflanze	(+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Lebensdauer: 6–8 Wochen (+) Bestuntersuchte Pflanze (–) Pflanzenphysiologie unterscheidet sich von tierischer Physiologie
<i>Rotatoria</i> ^[265] Rädertierchen, Stamm der planktonischen Metazoa	(+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Besitzt differenzierte Organe (+) Klein; ca. 1000 Zellen (+) Invariante Entwicklung (+) Transparent (–) Komplexer und langsamer Lebenszyklus (–) Nicht mit Hochdurchsatz-Verfahren vereinbar (–) Keine transgenen Technologien vorhanden
<i>Schmidtea mediterranea</i> ^[243, 244] Planarie (freilebender Plattwurm); regeneriert verlorene Körperteile; 3–12 mm lang	(+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Besitzt Organe/differenziertes Gewebe (+) Einfaches Modell für Regeneration (+) Einfaches Modell für Gewebeplastizität (–) Nicht mit Hochdurchsatz-Verfahren vereinbar (–) Keine transgenen Technologien vorhanden (–) Nicht zugänglich für (nicht-RNAi) genetische Manipulationen
<i>Caenorhabditis elegans</i> ^[266] 1 mm langer Rundwurm; freilebend (nicht-parasitär)	(+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Direkte genetische Werkzeuge existieren (+) Kurze Generationszeit: 2–3 Tage (+) Kurze Lebenserwartung: 2–3 Wochen (+) Klein; genau 959 Körpierzellen (+) Unveränderliche Entwicklung (+) Transparent (+) Besitzt Organe/differenziertes Gewebe (+) Mutanten können eingefroren werden (+)/(–) 50–80% der Gene des Wurms sind homolog zu menschlichen Genen
<i>Drosophila melanogaster</i> ^[267] Fruchtfliege	(+) Kostengünstig/leicht zu kultivieren (+) Genom ist bekannt (+) Direkte genetische Werkzeuge existieren (+) Kurze Generationszeit: ca. 10 Tage (+)/(–) 50–80% der Gene der Fliege sind homolog zu menschlichen Genen (–) Mutanten können nicht eingefroren werden

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Organismus	(+) Vorteile und (–) Nachteile
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> ^[268] Seeigel	(+) Genom ist bekannt (+) Kann leicht in vitro befruchtet werden (+) Transparenter Embryo; einfache Larvenentwicklung (–) Nicht mit Hochdurchsatz-Verfahren vereinbar
<i>Aplysia californica</i> ^[269] Kalifornischer Seehase, Meeresschnecke	(+) Genom ist bekannt (+) Nützlich zum Studium von Nervenentwicklung und -funktion (–) Nicht mit Hochdurchsatz-Verfahren vereinbar (–) Keine transgenen Technologien vorhanden
Mehrzellige Eukaryoten (Vertebraten)	
<i>Fugu rubripes</i> ^[240] Kugelfisch	(+) Sehr kleines Genom für einen Vertebraten (+) Genom ist bekannt (–) Produziert ein tödliches Toxin (–) Nicht mit Hochdurchsatz-Verfahren vereinbar (–) Keine transgenen Technologien vorhanden
<i>Danio rerio</i> ^[270] Zebrafisch	(+) Vorläufige Genomsequenz vorhanden (+) Klein (+) Embryonen sind transparent (–) Lange Generationszeit: 2–4 Monate (–) Isogene Stränge sind nicht verfügbar
<i>Xenopus laevis</i> ^[241] Frosch	(+) Embryonen sind groß und entwickeln sich außerhalb der Mutter (+) Modell für Entwicklung und Teratogenese (–) Schwierig zu manipulieren und zu kultivieren (–) Lange Generationszeit: ca. 4 Monate (–) Nicht mit Hochdurchsatz-Verfahren vereinbar
<i>Gallus gallus</i> ^[242] Huhn	(+) Embryonen sind groß und entwickeln sich außerhalb der Mutter (+) Modell für Entwicklung (–) Schwierig zu manipulieren und zu kultivieren (–) Lange Generationszeit: > 6 Monate (–) Nicht mit Hochdurchsatz-Verfahren vereinbar
<i>Mus musculus</i> ^[271] Maus	(+) Genom ist bekannt (+) Starke genetische und physiologische Überlappung mit dem Menschen (–) Ethische Bedenken (–) Kostenintensiv (–) Lange Generationszeit: 2–3 Monate (–) Hohe Lebenserwartung (–) Nicht mit Hochdurchsatz-Verfahren vereinbar
<i>Pan troglodytes</i> ^[272] Schimpanse	(+) Genom ist bekannt (+) Am nächsten mit dem Menschen verwandt (–) Ethische Bedenken (–) Kosten- und arbeitsintensive Haltung (–) Lange Generationszeit/hohe Lebenserwartung (–) Nicht mit Hochdurchsatz-Verfahren vereinbar (–) Entwicklung transgener Technologien mit ethischen Bedenken verbunden

scheinlich. Die Würmer stellen somit für den Chemiker eine handhabungsfreundliche Plattform zum schnellen Testen chemischer Hypothesen in simplen mehrzelligen Organismen dar.

In diesem Aufsatz werden wir darlegen, warum *C. elegans* ein Organismus mit dem richtigen Grad an Komplexität ist, der es Chemikern ermöglicht, ein molekulares Verständnis von mehrzelligem Leben (und somit des Stoffwechsels, der Regulierung von Netzwerken, vielen Eigenschaften biologischer Informationsspeicherung, der Transmission, der Gen-

expression, der Entwicklung, der Reproduktion, dem Altern, Krankheit und Tod) zu erlangen. Diese Komplexität geht mit einer leichten Handhabbarkeit einher, die dazu beitragen sollte, *C. elegans* den Weg in viele chemische Forschungsgruppen zu ebnen – ein nicht zu vernachlässigender Aspekt für Chemiker, die den Schwerpunkt ihrer Arbeit weiterhin auf molekularer Ebene belassen möchten und für die die technischen Anforderungen einer Säugetierzellkultur oder die Kosten, die Komplexität und die regulatorischen Schwierigkeiten beim Umgang mit Säugetieren nicht ohne

Weiteres zu bewerkstelligen sind. Die Einfachheit, mit der der Wurm in die Forschung integriert werden kann, sollte Chemiker dazu ermutigen, nicht nur den Wurm an sich zu erforschen, sondern Organismen im Allgemeinen. Für Chemiker und andere Wissenschaftler, die sich für molekulare organismische Biologie interessieren, aber keinerlei Erfahrung im Umgang mit Modellorganismen haben, stellt der Wurm einen geeigneten Startpunkt dar.

1.2. Sydney Brenner und die Wahl von *C. elegans* als Modellorganismus

In den frühen 1960er Jahren entwickelte und etablierte Sydney Brenner, damals im MRC Laboratory of Molecular Biology in Cambridge tätig, den Einsatz von *C. elegans* (oder einfacher: des „Wurms“) für biologische Studien, insbesondere als Modell für die Entwicklung und die Organogenese; für seine Arbeiten erhielt er im Jahre 2002 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.^[10] Seit der Bekanntmachung durch Brenner ist der Wurm zu einem häufig genutzten Modellorganismus in der Biologie geworden.

Nach der Entdeckung/Aufklärung der DNA-Struktur und den Prozessen der Translation und Transkription Mitte des 20. Jahrhunderts erschien es Brenner und seinen Kollegen, als ob die Molekularbiologen die Probleme der klassischen Molekularbiologie – vornehmlich der Replikation und Exprimierung der DNA – gelöst hätten, oder zumindest auf dem Weg zu deren Entschlüsselung ein gehöriges Stück vorangekommen seien. Die bisherigen Errungenschaften waren hauptsächlich durch Studien an Bakterien und Bakteriophagen zustande gekommen, die aufgrund ihrer Einfachheit zu dieser Zeit nützliche Modellorganismen darstellten; zudem ließen sie sich leicht in großer Zahl manipulieren.^[11] Unabhängig von der Richtigkeit seiner Einschätzung seines eigenen Forschungsgebiets war Brenner daran interessiert, den Schwerpunkt der Molekularbiologie zu verlagern, weg von einer Untersuchung der chemischen Details der biomolekularen Maschinerie hin zur Untersuchung biologischer Prozesse höherer Ordnung, speziell der Entwicklung, aber auch der neuronalen Funktion.^[11] Für derartige Studien stellten Bakterien und Bakteriophagen jedoch keine geeigneten Modellorganismen mehr dar; diese Überlegung inspirierte Brenner dazu, nach höheren Organismen zu suchen, die sich mit den Werkzeugen und Arbeitstechniken der Molekularbiologie untersuchen ließen.

Brenner suchte einen Organismus, der eine kurze Generationszeit aufweist und aus einer relativ kleinen Zahl von Zellen besteht, sodass das Verfolgen zellulärer Abstammungslinien möglich bliebe.^[11] Zudem sollte der Organismus einfach zu kultivieren und auch einfach mit dem Mikroskop zu beobachten sein.^[11,12] Für seine Studien zur Entwicklung favorisierte Brenner zunächst einzellige Organismen, die eine Art von zellulärer Differenzierung aufweisen – darunter das Bakterium *Caulobacter* und der Protist *Naegleria* (Tabelle 1) – kam dann jedoch zu dem Schluss, dass es sich bei diesen Organismen um biologische Kuriositäten handeln müsse, die folgerichtig zu exotisch seien, um als Modellorganismen dienen zu können.^[12] Er dachte auch über Räderterchen

nach, die mehrzellig sind und zudem verschiedene Gewebetypen und Organe aufweisen (Tabelle 1), doch verwarf er diese wegen der langsamten Reproduktion und der komplexen Lebenszyklen.^[12] Schließlich entschied sich Brenner für *C. elegans*, der den einfachsten Modellorganismus darstellte, der seine Kriterien erfüllte.

C. elegans hat eine kurze Generationszeit (ein befruchtetes Ei entwickelt sich innerhalb von drei Tagen bei 20°C zu einem sexuell ausgereiften, erwachsenen Wurm) und eine kurze Lebenszeit (die durchschnittliche Lebenserwartung liegt bei zwei bis drei Wochen bei 20°C) und kann auf Agar oder in Lösung im Labor kultiviert werden, wobei Bakterien (typischerweise *E. coli*) als Nahrungsquelle dienen. In Abbildung 1a ist eine Mikroaufnahme von Würmern auf einer

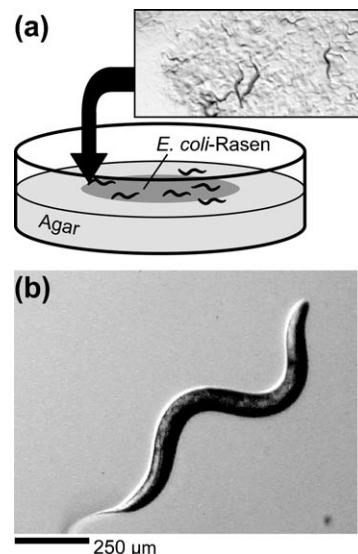


Abbildung 1. Der Rundwurm *C. elegans*. a) Im Labor besteht der typische Lebensraum von *C. elegans* aus einer mit Agar gefüllten Petrischale. *C. elegans* lebt auf der Agar-Oberfläche und ernährt sich von dort aufgebrachten *E. coli*. Der Ausschnitt zeigt eine Population von Würmern verschiedenen Alters. b) Ein adulter Hermaphrodit kriecht über die Agar-Oberfläche.

Agaroberfläche gezeigt. Der Wurm ist von kleinem Wuchs (adulte Exemplare sind 1 mm lang und 50 µm dick) und besitzt eine begrenzte Zahl von Zellen (adulte Hermaphroditen bestehen aus 959 Körperzellen; adulte Männchen aus 1031). Abbildung 1b zeigt einen adulten Hermaphroditen. Dank der Transparenz des Wurmkörpers kann jeder einzelne Zellkern mittels Lichtmikroskopie sichtbar gemacht werden.

Der Wurm existiert in zwei Geschlechtern: selbstbefruchtenden Hermaphroditen und Männchen, die in 0.1% aller Fälle aus der Selbstbefruchtung hervorgehen. Diese Geschlechterverteilung war für Brenner mit Blick auf die genetische Analyse eine attraktive Eigenschaft der Würmer, da die Männchen mit den Hermaphroditen gekreuzt und so neue Kombinationen mutierter Gene erzeugt werden konnten. Weitere Entwicklungen in den letzten 50 Jahren ließen die Attraktivität von *C. elegans* als Modellorganismus weiter steigen; diese Entwicklungen umfassen: 1) die Rückverfolgung der Abstammung jeder einzelnen Zelle des Wurms vom Zeitpunkt der Befruchtung bis zur ausgereiften Spezies durch

John Sulston und Mitarbeiter,^[13,14] 2) die Rekonstruktion des gesamten Nervensystems von *C. elegans* durch John White und Mitarbeiter,^[15] 3) die Anwendung der RNA-Interferenz zur Manipulation der Genexprimerierung in *C. elegans* durch Andrew Fire und Craig Mello^[16] sowie 4) die Entschlüsselung der vollständigen Gensequenz des Wurms durch das *C. elegans* Sequencing Consortium.^[17,18]

Brenners Ziel – das Auffinden eines einfachen Modellorganismus, mit dessen Hilfe sich genetische Manipulationen und Entwicklungseffekte korrelieren lassen – dient als Musterbeispiel für die Art von Ziel, welches wir für Chemiker vorschlagen: einen Organismus zu finden, mit dessen Hilfe sich allgemeine chemische Größen (pH, Oxidationsgrad, Nettoladung) oder Prozesse (Protein-Ligand-Wechselwirkungen, Redoxreaktionen) mit Phänomenen auf der Ebene des Organismus korrelieren lassen. Brenner wollte den einfachsten Organismus finden, der diese Art von Korrelationen ermöglicht. Der Erfolg des Wurms als Modellorganismus zur Studie der Genetik komplexer Phänomene in der Biologie bestätigt Brenners Weitsicht bei der Auswahl von *C. elegans*.

Während sich eine Vielzahl der Arbeiten mit den Auswirkungen *genetischer* Änderungen auf den Organismus befasst, ist nur wenig getan worden, um die Auswirkungen *chemischer* Änderungen zu erkunden. Viele der Eigenschaften, die den Wurm für Molekularbiologen so wertvoll machen, lassen ihn aber auch für Chemiker nützlich werden. Die Weitergabe des Wurms durch die Biologen an die Chemiker ist eine natürliche Stufe der reduktionistischen Kaskade innerhalb der Wissenschaft.

1.3. Themen des Aufsatzes

In diesem Aufsatz geben wir zunächst einen kurzen Überblick über die Biologie von *C. elegans* und diskutieren seine Relevanz als Modellorganismus in Bezug auf die organismische Biologie (und einzelne Aspekte menschlicher Biologie). Anschließend stellen wir Beispiele aus der Literatur vor, aus denen hervorgeht, wie *C. elegans* eingesetzt werden kann, um chemische Details mit organismischen Phänomenen in Verbindung zu bringen. Obwohl der Schwerpunkt des Aufsatzes auf der fundamentalen Biochemie des Wurms liegen soll, werden wir auch seine Relevanz im Bezug auf menschliche Krankheiten kurz diskutieren. Einige wichtige menschliche Krankheiten (hauptsächlich in Entwicklungsländern) werden von Nematoden oder parasitären Würmern ähnlicher Komplexität verursacht, und die Untersuchung von *C. elegans* ist von unmittelbarer Relevanz für diese Erkrankungen. Um Chemikern einen Startpunkt für ihre Arbeiten zu geben, beschreiben wir die zur Verfügung stehenden biochemischen, chemischen und physikalischen Werkzeuge, mit denen die Forschung mit und an dem Wurm erleichtert werden kann. Wir schließen mit Anmerkungen zu den sich bietenden Möglichkeiten für Chemiker im Feld der Wurmforschung. Wir werden Möglichkeiten betrachten, die sich sowohl für „Werkzeugmacher“ als auch für „Werkzeuganwender“ bieten, d.h. sowohl für diejenigen, die sich mit der Entwicklung von Instrumenten und Methoden zur Untersuchung der molekularen Biochemie des Wurms beschäftigen

wollen, als auch für diejenigen, die diese Werkzeuge und Methoden anwenden, um diese Biochemie zu erforschen.

2. Die Biologie des Wurms

Ein Kernelement der Wissenschaft ist das Bestreben, fundamentale biologische Prozesse vollständig zu verstehen. Die Einfachheit des Wurms macht diesen zu einem idealen Startpunkt für das Erreichen dieses Ziels. Im Hinblick auf anwendungsbezogene Forschung ist auch der Zusammenhang zwischen der Biologie des Wurms und der menschlichen Biologie interessant. Wie hilfreich sind die Erkenntnisse, die mithilfe des Wurms erworben werden, im Hinblick auf das Verständnis menschlicher Biologie, Gesundheit und Krankheit? Dieser Abschnitt bietet eine Übersicht über die Biologie des Wurms und, soweit relevant, vergleicht diese mit der Biologie des Menschen. In Tabelle 2 sind einige Internetseiten aufgeführt, mit deren Hilfe sich die Biologie von *C. elegans* aneignen lässt. Ein Übersichtsartikel von Antoshechkin und Sternberg bietet zudem eine detaillierte Beschreibung von Online-Datenbanken und Arbeitstechniken, die die Arbeit an und mit *C. elegans* vereinfachen.^[19]

2.1. Entwicklung und Lebenserwartung

C. elegans beginnt als Embryo und entwickelt sich dann durch vier Larvenstadien hindurch (L1, L2, L3 und L4) zu einem sexuell ausgereiften, erwachsenen Wurm. Bei 20 °C liegt die Generationszeit – die Zeit zwischen Befruchtung und dem Beginn der Reproduktion im Erwachsenenalter – bei ungefähr zwei bis drei Tagen; die durchschnittliche Lebenserwartung liegt zwischen zwei und drei Wochen.^[20] Während des Übergangs von L1 zu L2 kann *C. elegans* bei Nahrungsmitteknappheit oder hoher Populationsdichte in ein weiteres drittes Larvenstadium fallen, das (aus gegebenem Anlass) mit dem deutschen Wort *Dauer* bezeichnet wird. Dauer-Larven sind frei beweglich, fressen aber nicht und entwickeln eine dicke Oberhaut, die sie gegen die Behandlung mit Chemikalien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) schützt.^[20] Sobald sich die Nahrungsmittelversorgung wieder normalisiert hat oder die Populationsdichte zurückgegangen ist, entwickelt sich die Dauer-Larve weiter zum L4-Stadium.^[20] Als Dauer-Larve kann *C. elegans* mehrere Monate lang überleben.^[21]

Im Labor besteht die Nahrung von *C. elegans* normalerweise aus einem langsam wachsenden *E. coli*-Strang, OP50.^[23] Höchstwahrscheinlich hatte Brenner aus rein praktischen Gründen *E. coli* als Nahrungsquelle eingeführt. In der freien Natur stellen *E. coli*-Bakterien wahrscheinlich nicht die Hauptnahrungsquelle für *C. elegans* dar, vielmehr gibt es Anhaltspunkte dafür, dass *E. coli* für *C. elegans* pathogen ist.^[24,25] Wissenschaftler haben *C. elegans* aus Gartenerde und Kompost, aus Schnecken, aus Landasseln und anderen Invertebraten isoliert.^[26] Die Zusammensetzung der Nahrung von *C. elegans* in diesen Umgebungen ist unbekannt, könnte aber aus Mikroorganismen bestehen, die mit dem Zerfall von organischer Materie assoziiert sind. Studien an *C. elegans* und anderen *Caenorhabditis* deuten darauf hin, dass die Verbin-

Tabelle 2: Internetseiten zu *C. elegans*.

Beschreibung	
The WormBook http://www.wormbook.org	Ein Referenzwerk zur Biologie von <i>C. elegans</i> ; enthält ein ausführliches Kapitel mit experimentellen Methoden
WormAtlas http://www.wormatlas.org	Eine Datenbank zur Anatomie von <i>C. elegans</i> , einschließlich Elektronenmikroskopbildern von Querschnitten des Wurmkörpers
WormBase http://www.wormbase.org	Eine durchsuchbare Datenbank des Genoms und Proteoms des Wurms
The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html	Eine durchsuchbare Datenbank für mehrere Modellorganismen, einschließlich des Wurms
Reactome http://www.reactome.org	Eine Datenbank für biologische Prozesse zahlreicher Modellorganismen, einschließlich des Wurms
Caenorhabditis Research Center University of Minnesota http://www.cbs.umn.edu/CGC/	Ein von den National Institutes of Health unterstütztes Bestandslager für mutierte Würmer
RNAi Database http://rnai.org	Eine Datenbank für Phänotypänderungen in <i>C. elegans</i> als Reaktion auf die Behandlung mit RNAi
Geneservice http://www.geneservice.co.uk/	Ein Anbieter von RNAi von <i>C. elegans</i> -Genen, erhältlich in Form von Bibliotheken oder auch als einzelne in <i>E. coli</i> exprimierte Klone
Addgene http://www.addgene.org/Andrew_Fire	Vermarktet Vector Kits, die cDNA für fluoreszierende Proteine enthalten
Nematode.net http://nematode.net	Eine Genomdatenbank für parasitäre Nematoden des Genome Sequencing Center der Washington University in St. Louis, USA
Genetic Nomenclature for <i>C. elegans</i> http://wiki.wormbase.org/index.php/UserGuide:Nomenclature	Leitfaden zur genetischen Nomenklatur von <i>C. elegans</i> ; überwacht durch wormbase.org und dem Caenorhabditis Genetics Center der University of Minnesota, USA

dung von *C. elegans* mit makroskopischen Invertebraten wie Schnecken und Landasseln der Verbreitung des Wurms dient.^[26] Diese Verbindungen könnten auch nekromenisch sein, d. h., die Würmer könnten sich von den Leichnamen der Wirte ernähren.^[26] Es ist möglich, *C. elegans* in einem bakterienfreien, chemisch definierten Medium aufzuziehen; aus nicht bekannten Gründen entwickeln sich die Würmer jedoch langsamer im bakterienfreien Medium als wenn sie mit Bakterien ernährt werden.^[27] Wir werden diesen Aspekt in Abschnitt 3.2.3 ausführlicher erörtern.

2.2. Genom und Proteom

Trotz der Einfachheit des Wurms gibt es eine signifikante Überlappung zwischen Würmern und Menschen mit Blick auf Gene und biochemische Prozesse. Obwohl das Genom des Wurms erheblich kleiner ist als das des Menschen (das Genom von *C. elegans* ist ca. 100 Mb groß, das von *H. sapiens* ca. 3000 Mb), hat der Wurm fast genauso viele Gene wie der moderne Mensch (Würmer haben ca. 20000 Gene, Menschen ca. 23000).^[18] Nach bioinformatischen Analysen sind 60–80 % der Gene des Wurms homolog zu menschlichen Genen.^[28]

(Homologe Gene sind Gene in verschiedenen Organismen, die einen gemeinsamen Vorfahren haben; potentielle homologe Gene werden durch Sequenzähnlichkeitsanalyse des genetischen Codes bestimmt).^[29]

Um sein Proteom zu diversifizieren, kann *C. elegans* sowohl post-transkriptionelle Modifikationen (alternative Aufspaltung der Boten-RNA) als auch post-translatorische Modifikationen (Modifikationen von Proteinen) vornehmen. Das alternative Gen-Spleißen kommt im Menschen zu einem weit höheren Anteil vor als im Wurm: Wenigstens 60 % der menschlichen Gene kommen in wenigstens einer alternativen Form vor; im Wurm haben hingegen nur etwa 10 % der Gene eine alternative Form.^[30] Aus wahrscheinlich diesem Grund ist das Proteom von *H. sapiens* bedeutend größer und wesentlich komplexer als das von *C. elegans*. Das Genom von *C. elegans* codiert für Proteine, die ein Repertoire an post-translatorischen Modifikationen zulassen, welches dem im Menschen ähnlich ist; diese Modifikationen umfassen Phosphorylierung, Acylierung (einschließlich der Acylierung von Histonen), Ubiquitinierung,^[31] Alkylierung (einschließlich Methylierung und Prenylierung)^[32] und Glykosidierung (einschließlich N- und O-Glykosidierungen).^[33]

2.2.1. Organisation der Gene in *C. elegans*

Ungleicher anderer Eukaryoten nutzen Würmer zur Coexpression der Gene Operone, d.h. genetische Strukturen, in denen ein einzelner vorgelagerter Promoter die serielle Transkription einer Gruppe von Genen in einem einzelnen Strang Boten-RNA reguliert. (In anderen Eukaryoten hat jedes Gen typischerweise seine eigene Promoter-Region.)^[34] Ungefähr 15% der Protein-codierenden Gene in *C. elegans* finden sich in Operonen.^[35] Auch Prokaryoten nutzen Operone (z.B. das *Lac*-Operon in *E. coli*), doch entstanden die Operone in Nematoden höchstwahrscheinlich unabhängig – möglicherweise aufgrund der kurzen Zeitspanne zwischen mitotischen Teilungen in der Embryogenese, die einen Selektionsdruck zugunsten kleinerer Genome darstellt.^[36] Die Verwendung der Operone wird mit angeführt, um zu erklären, warum das Genom von *C. elegans* rund 30-mal kleiner ist als das des Menschen, obwohl beide eine ähnliche Anzahl von Genen aufweisen. Zudem enthält das Genom von *C. elegans* weniger nicht-codierende DNA (d.h. DNA, die keine Gene codiert). Umstellbare Elemente beispielsweise – mobile Abschnitte der DNA, die keine Gene codieren – und deren inaktiven (nicht mobilen) Überbleibsel machen ca. 12% des Genoms von *C. elegans* aus, bilden jedoch ca. 50% des menschlichen Genoms.^[37] Alles in allem bildet codierende DNA 25.5% des Genoms von *C. elegans*, aber nur 1.5% des menschlichen Genoms.^[36]

2.3. Signaltransduktionspfade

Viele mit der Signalübertragung assoziierte Mechanismen sind zumindest teilweise zwischen Mensch und Wurm konserviert.^[38] In Lit. [38] findet sich eine vergleichende Zusammenstellung der Signaltransduktionspfade in Würmern und Menschen. Einige Pfade weisen ein hohes Maß an Konservierung auf. So besitzt beispielsweise das Genom von *C. elegans* Homologe für sämtliche Komponenten des Signalwegs des transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF- β).^[39] Einige andere menschliche Signalwege sind hingegen nur teilweise in *C. elegans* vorhanden (etwa der Signalweg des signaltransduktionsvermittelnden Toll-aktigen Rezeptors oder der JAK/STAT Signalübertragungsweg),^[40] andere fehlen wahrscheinlich völlig in *C. elegans* (etwa der Hedgehog-Signalweg).^[38,39] Einer der am besten untersuchten Signalübertragungswege in *C. elegans* ist der des Insulin/Insulin-aktigen Wachstumsfaktors 1 (IGF-1).^[41] Dieser Signalweg beinhaltet einen einzigen Insulin/IGF-1 Rezeptor, DAF-2, und dessen Deaktivierung hat eine erhöhte Lebenserwartung von *C. elegans* zur Folge.^[42] Das Genom von *C. elegans* enthält 37 Insulin-aktige Proteine, von denen INS-1 dem menschlichen Insulin am ähnlichsten ist. Sowohl INS-1 als auch das menschliche Insulin sind DAF-2-Antagonisten. Zahlreiche Bestandteile des Insulin/IGF-1-Signalübertragungswegs sind in Würmern, Fliegen und Säugetieren konserviert. Eine Mutation eines *daf-2*-Äquivalents in *Drosophila* erhöht ebenfalls die Lebenserwartung; dies deutet auf die faszinierende Möglichkeit hin, dass der molekulare Mechanismus des Alterns über Artengrenzen hinweg konserviert ist.^[43]

Eine bislang weniger gut verstandene Variante der Signalübertragung in *C. elegans* macht Gebrauch von Hormonen zur nukleären Signalübermittlung.^[44] Das Genom des Wurms codiert für 284 Gene, die aufgrund ihrer Sequenz den nukleären Hormonrezeptoren zugeordnet werden.^[45] Das menschliche Genom hingegen soll lediglich 48 nukleäre Hormonrezeptoren aufweisen.^[46] Ungefähr 15 der vorhergesagten nukleären Hormonrezeptoren in *C. elegans* sollen Homologe der nukleären Hormonrezeptoren des Menschen sein.^[47] Die dazugehörigen Liganden sind alle unbekannt, mit Ausnahme eines Liganden für einen eigens für *C. elegans* vorhergesagten Rezeptor; Forscher haben kürzlich drei von Cholesterin abgeleitete Moleküle identifiziert, die als Liganden für den nukleären Rezeptor DAF-12 dienen können. DAF-12 beeinflusst die Entwicklung (Dauer-Ausbildung) und die Reproduktion in *C. elegans*. Für einige nukleäre Rezeptoren ist es möglich, die Identität der dazugehörigen Liganden basierend auf den Motiven innerhalb derjenigen Sequenzen des Gens vorherzusagen, die bekannten Erkennungsstellen in anderen Organismen entsprechen; so ist beispielsweise auf Basis einer Sequenzanalyse der Ligand des *C. elegans*-eigenen nukleären Hormonrezeptors NHR-14 höchstwahrscheinlich ein Östrogen oder eine Östrogen-ähnliche Substanz.^[49]

2.4. Grundlegende Anatomie und Physiologie

Trotz der anatomischen Einfachheit des Wurms weisen viele Gewebearten und Organe in *C. elegans* strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu denen des Menschen auf: Muskelgewebe in *C. elegans* sieht wie menschliche Muskeln aus; Neuronen in *C. elegans* sehen wie menschliche Neuronen aus (obgleich sie nicht myelinisiert sind und auch keine Schwann-Zellen besitzen; sie besitzen jedoch Gliazellen, welche die neuronale Funktion und Struktur unterstützen).^[50] Pharynx, Darm und Uterus des Wurms haben eindeutige Analoga in der menschlichen Anatomie.

2.4.1. Organe und Gewebe

Die Anatomie von *C. elegans* umfasst ein Verdauungssystem (Maul, Pharynx, Intestinum, Rektum, Anus), ein Reproduktionssystem (Gonade, Uterus, Spermathek und Vulva im Hermaphroditen; Gonade, Samenblase, Samenleiter und Kloake im Männchen), ein Nervensystem (302 Neuronen im Hermaphroditen, mit einem Cluster von Synapsen – dem „Nervenring“ – im Kopf) sowie ein Ausscheidungssystem (eine Gruppe von vier Zellen, von der angenommen wird, dass sie die Osmolarität sowie das Ausscheiden von Abfallstoffen kontrolliert).^[20] Der Wurm besitzt Muskeln (gestreifte und nicht-gestreifte), eine Hypodermis, eine schützende, den gesamten Körper überziehende Oberhaut (wird von der Hypodermis sekretiert) sowie Bindegewebe und Basismembranen.^[20] Die Oberhaut ist 0.5 μm stark, bedeckt die äußere Oberfläche des Wurms und besteht aus fünf Schichten (von innen nach außen): einer Lage Kollagen-Fibrillen, einer flüssigkeitsgefüllten Lage mit Stützstreben aus Kollagen, einer Lage aus Kollagenen und Oberhaut-spezifischen Pro-

teinen, einer Lipidschicht und einem Oberflächenüberzug aus Glycoproteinen.^[20]

Der Körper des Wurms ist aufgebaut wie eine Röhre – der Verdauungstrakt – innerhalb einer zweiten Röhre – der Hyperdermis mitsamt der Oberhaut. Zwischen den beiden Röhren befindet sich die fluidgefüllte Leibeshöhle – das Pseudozölom.^[20] *C. elegans* besitzt kein Kreislaufsystem und muss sich zum Transport von Sauerstoff, Kohlendioxid und Nährstoffen auf die passive Diffusion innerhalb der Flüssigkeit im Pseudozölom verlassen. Es ist zudem möglich, dass die lokomotorische Bewegung des Körpers zur Mischung der in der Körperflüssigkeit enthaltenen Substanzen beiträgt. Der Gasaustausch mit der Umgebung findet per Diffusion durch die Oberhaut oder durch die Oberfläche des Darms statt.^[51]

2.4.2. Das Immunsystem des Wurms ist nicht adaptiv

Im Unterschied zum Menschen oder anderen Vertebraten besitzt *C. elegans* kein adaptives Immunsystem; *C. elegans* produziert keine Antikörper. Stattdessen verlässt sich der Wurm auf eine angeborene Erkennung und Reaktion, um sich vor Pathogenen zu schützen.^[52] Obwohl die angeborene Immunität des Wurms noch nicht vollständig charakterisiert ist, ist doch bekannt, dass einige der Signaltransduktionspfade der angeborenen Immunität in *C. elegans* und im Menschen konserviert sind, einschließlich des p38-Mitogen-aktivierten Proteinkinasepfades und des Apoptosepfades.^[52] Zudem scheinen einige der Pfade, die für das adaptive Immunsystem in Säugetieren eine Rolle spielen, auch in das angeborene Immunsystem von *C. elegans* involviert zu sein: Der TGF-β-Signaltransduktionspfad kontrolliert die Differenzierung der T-Zellen und ist zudem an der Initiierung der angeborenen Immunantwort in *C. elegans* beteiligt.^[52]

Die Immunantwort des Wurms auf pathogene Bakterien beruht auf dem Einsatz von Lysozymen, die die Bakterienwände attackieren, sowie von Caenoporen (die bakterielle Zellmembran zerstörenden Peptiden), um die Bakterien aufzubrechen. Die Immunantwort beinhaltet auch das Her-aufregulieren der Exprimierung von Katalasen, Superoxid-Dismutases, Metallothioneinen und Glutathion-S-transferasen – allesamt Moleküle, die wahrscheinlich an der Detoxifikation beteiligt sind.^[52] Zudem enthält die Leibeshöhle des Wurms sechs Coelomyzten, d.h. große, 10–15 µm starke Zellen, deren Rolle innerhalb des Immunsystems des Wurms wahrscheinlich darin besteht, fremde oder toxische Moleküle durch Endozytose aufzunehmen.^[52]

2.4.3. Neurobiologie

C. elegans weist als adulter Hermaphrodit 302 Neuronen auf. Anders als die Neuronen in Vertebraten sind diese in *C. elegans* nicht myelinisiert. Nur ein Teil der Neuronen in *C. elegans* scheint das klassische „Alles-oder-nichts“-Aktionspotential zu erzeugen.^[53] Anstelle dieser Aktionspotentiale erzeugen die meisten Neuronen in *C. elegans* abgestufte Potentiale, deren Form von der Stärke, der Dauer und der Art des Signals abhängt, durch welches die neuronale Aktivität stimuliert worden ist.^[54] Trotz dieser Unterschiede nutzt der Wurm viele der gleichen Neurotransmitter wie der Mensch,

und die Mechanismen der Biosynthese, der Freisetzung, der Erkennung und der Erneuerung der Neurotransmitter sind in hohem Maße in Wurm und Mensch konserviert.^[55] In Tabelle 3 werden Neurotransmitter von Wurm und Mensch verglichen. Zahlreiche Neuronen in *C. elegans* sprechen zudem auf Stoffe an, die auch im Menschen neuroaktiv sind, darunter Acetylcholinesterase-Hemmer,^[56] Serotoninwiederaufnahme-Hemmer^[57] und Anästhetika.^[58]

Tabelle 3: Essentielle Aminosäuren^[27] und Neurotransmitter^[59] in *C. elegans* und dem Menschen.

Aminosäure	<i>C. elegans</i>	Mensch
Arginin	E ^[a]	E in der Entwicklung
Histidin	E	E
Lysin	E	E
Asparaginsäure	NE	NE
Glutaminsäure	NE	NE
Serin	NE	NE
Threonin	E	E
Asparagin	NE	NE
Glutamin	NE	NE
Alanin	NE	NE
Isoleucin	E	E
Leucin	E	E
Methionin	E	E
Phenylalanin	E	E
Tryptophan	E	E
Tyrosin	NE	E in der Entwicklung
Valin	E	E
Cystein	NE	E in der Entwicklung
Glycin	NE	NE
Prolin	NE	NE
Neurotransmitter	Genutzt in <i>C. elegans</i> ?	Genutzt im Menschen?
Acetylcholin	Ja	Ja
GABA	Ja	Ja
Stickstoffmonoxid	Ja	Ja
Serotonin	Ja	Ja
Dopamin	Ja	Ja
Glutaminsäure	Ja	Ja
Octopamin	Ja	Nein
Tyramin	Ja	Nein
Adrenalin	Nein	Ja
Noradrenalin	Nein	Ja
Histamin	Nein	Ja
Neuropeptide ^[b]	Ja	Ja

[a] E: essentiell NE: nicht-essentiell. [b] Mensch und Wurm nutzen Neuropeptide; sie nutzen jedoch nicht die gleichen Neuropeptide.

C. elegans zeigt eine Vielzahl von einfach zu beobachtenden Verhaltensweisen – darunter Lokomotion (Kriechen und Schwimmen), Fressen (pharyngales Pumpen), Kotabsatz, Eiablage und Paarung (falls die Population Männchen enthält).^[59] Die Laser-Ablation von Neuronen ermöglichte das Auffinden der neuronalen Schaltkreise, die mit diesen Verhaltensweisen korreliert sind.^[59] *C. elegans* kann chemische, mechanische und thermische Stimulationen fühlen und darauf reagieren – in überraschend komplizierten Formen, wenn man bedenkt, dass es sich um einen Organismus mit gerade einmal 302 Neuronen handelt. Würmer besitzen die Fähigkeit zum Lernen – definiert als eine auf Erfahrungen beruhende Verhaltensänderung –, einschließlich Gewöhnung

und klassischer Konditionierung.^[60] Würmer besitzen auch ein Gedächtnis. Fand beispielsweise die Versorgung mit Nahrung bei einer bestimmten Temperatur statt und wurden die Würmer anschließend einem thermischen Gradienten ausgesetzt, so siedelten sie sich bevorzugt entlang derjenigen Isothermen an, die der Fütterungstemperatur entsprach.^[61]

2.5. Stoffwechsel und Energie

Die Tatsache, dass sich im Genom des Wurms Sequenzen finden, die funktionellen Motiven in menschlichen Proteinen entsprechen, deutet darauf hin, dass Signaltransduktionspfade, die mit der Nahrungsmittelverwertung, der Energiespeicherung und der Synthese kleiner Moleküle zusammenhängen, in Würmern und Menschen im hohen Maße konserviert sind.^[62] Für einige, aber nicht alle, potentiell konservierten Gene haben Experimente bestätigt, dass die assoziierten Proteine gebildet werden und auch funktionsfähig sind.^[62] Das Genom des Wurms enthält Gene, die für all diejenigen Proteine codieren, die für die Zellatmung notwendig sind – bestehend aus Glykolyse (Umwandlung von Glukose in Pyruvat), Pyruvat-Decarboxylierung (Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat), β -Oxidation von Fettsäuren, Zitronensäurezyklus, Elektronentransportkette und ATP-Synthese.^[63] Wie die Säugetiere nutzt auch *C. elegans* Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) als Cofaktoren in der Zellatmung. Die Proteine, die in diesen Signaltransduktionspfaden involviert sind, sind zwischen Wurm und Mensch hoch konserviert.^[62-64]

Um die Energieversorgung auch unter anaeroben Bedingungen sicherzustellen, bedient sich *C. elegans* – wie auch der Mensch – der anaeroben Glykolyse, die Milchsäure als Abfallprodukt erzeugt. Anders als beim Menschen können die Zellen in *C. elegans* jedoch auch ethanolische Fermentation^[63] und Malat-Dismutation nutzen – einen auch in parasitären Fadenwürmern anzutreffenden Stoffwechselpfad, der eine spezialisierte mitochondriale Elektronentransportkette beinhaltet. Diese Kette nutzt Fumarsäure anstelle von Sauerstoff als Elektronenrezeptor und produziert als Abfallprodukte Acetat, Succinat und Propionat anstelle von Kohlendioxid und Wasser.^[65]

Würmer können zur Energiespeicherung Glykogen aus Glukose erzeugen. Glykogen macht ca. 3.3 % der Trockenmasse ausgewachsener Würmer aus.^[66] Hauptspeicherplatz des Glykogens im Wurm ist der Darm.^[66] Bei Säugetieren können Enzyme das gespeicherte Glykogen in der Leber zu Glukose abbauen, die sodann über den Blutkreislauf sämtlichen Geweben im Körper zur Energieversorgung zur Verfügung steht. *C. elegans* besitzt keine Glukose-6-phosphatase, die für die letzte Stufe des Glykogenabbaus nötig ist.^[64] Es ist möglich, dass *C. elegans* Glukose aus Glykogen über eine Trehalose-Zwischenstufe erhält. Würmer weisen sowohl Enzyme auf, die die Synthese von Trehalose aus Glukose-6-phosphaten katalysieren, als auch Enzyme, die die Hydrolyse von Trehalose zu Glukose katalysieren.^[64] Es ist nicht bekannt, ob Trehalose, Glukose oder beide im Anschluss an den Abbau des Glykogens aus dem Glykogenspeicher hin zu den Energie benötigenden Geweben diffundieren.^[62, 64]

Würmer speichern Energie auch in Form von Lipiden. Triacylglyceride und freie Fettsäuren machen bis zu 36 % der Trockenmasse eines ausgewachsenen Wurms aus.^[66] *C. elegans* kann Fettsäuren mit der Nahrung aufnehmen (bei Bakteriendiät), oder diese durch Biosynthese de novo herstellen. Wie auch der Mensch synthetisiert und nutzt *C. elegans* gesättigte, einfach und mehrfach ungesättigte sowie verzweigte Fettsäuren.^[67, 68] In *C. elegans* findet die Fettspeicherung in der Hypodermis und in Form von Tröpfchen in intestinalen Zellen statt.

C. elegans kann Sterole nicht de novo erzeugen. Der Wurm besitzt Gene, die für die erforderliche molekulare Maschinerie zur Synthese des Polysoprenoidmoleküls Farnesylypyrophosphat codieren, einem Vorläufer für Dolichole, Ubiquinone und Sterole. Die Stufen dieses Synthesewegs sind zwischen Menschen und Würmern konserviert. Während der Wurm Dolichole und Ubiquinone herstellen kann, versagt er bei der Synthese der Sterole aus Farnesylypyrophosphaten. Daher benötigt der Wurm eine pflanzliche oder tierische Nahrungsquelle, die fertig synthetisierte Sterole oder aber den unmittelbaren synthetischen Vorläufer enthält.^[70] Im Labor enthält das Wachstumsmedium für *C. elegans* normalerweise Cholesterin.^[8] Statine sind cholesterolsenkende Wirkstoffe, die die Aktivität der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA(HMG-CoA)-Reduktase hemmen, die wiederum in der Biosynthese von Farnesylypyrophosphat eine Rolle spielt. Daher kann der Wurm als Modell eingesetzt werden, um die von der Cholesterolsenkung unabhängigen Effekte der Statine zu untersuchen.^[32]

Würmer benötigen eine Häm-haltige Nahrung, und es scheinen ihnen einige Enzyme der Säugetiere, Hefen und Bakterien zu fehlen, die für die Biosynthese von Häm erforderlich sind.^[71] Die Analyse des Genoms von *C. elegans* deutet darauf hin, dass der Wurm eine Reihe von Häm-haltigen Proteinen generiert, darunter Globine, Guanylatzyklase, Adenylatzyklase, Katalyse, Cytochrome P450 und die an der Zellatmung beteiligten Cytochrome.^[71] Bakterien dienen als Häm-Lieferanten bei der Aufzucht von *C. elegans*, wenn sie als Nahrungsquelle verwendet werden. Den Würmern kann Häm auch in Form von Häminen oder Häm-haltigen Proteinen wie Hämoglobin, Myoglobin oder Cytochrom C zugeführt werden, welche allesamt dem chemisch definierten Medium zugemischt werden können.^[62, 71] Würmer benötigen zudem eine Nahrungsquelle, die spezifische Aminosäuren enthält. In Tabelle 3 werden essentielle und nicht-essentielle Aminosäuren für Mensch und Wurm gegenübergestellt.

2.5.1. *C. elegans* kann Hypoxie und Anoxie überleben

Würmer können interessanterweise Phasen von Anoxie (kein Sauerstoff) und Hypoxie (wenig Sauerstoff) überleben. Bei einem Sauerstoffpartialdruck von rund 3.6 kPa (0.036 atm) ist die Stoffwechselgeschwindigkeit von *C. elegans* – gemessen an der CO₂-Produktion^[72] oder am O₂-Verbrauch^[73] – gleich derjenigen vor Würmern in normaler Umgebung mit Sauerstoffpartialdruck $p(O_2) \approx 21$ kPa. Unterhalb der 3.6-kPa-Schwelle sinkt die Stoffwechselgeschwindigkeit mit sinkendem Sauerstoffpartialdruck und beträgt bei 1 kPa nur noch 50 % der Geschwindigkeit unter normoxischen Bedin-

gungen.^[72,73] *C. elegans* überlebt auch kurzzeitige anoxische Bedingungen (definiert als $p(O_2) < 0.001$ kPa).^[72] Alle Entwicklungsstufen des Wurms, vom embryonalen bis zum adulten Stadium, zeigen hohe Überlebensraten (85–90%) nach 24-stündiger Simulation von Anoxie.^[74–76] Bei länger andauernder Anoxie sinkt die Überlebensrate und beträgt nach 72 Stunden bei ausgereiften Würmern nur noch 5–10%.^[75,76] Larven (L1–L4) zeigen einen ähnlichen Verfall der Überlebensrate nach 72 Stunden unter anoxischen Bedingungen.^[76]

Wie überlebt der Wurm Anoxie? Die anoxischen Bedingungen führen dazu, dass die Würmer in eine Art Scheintod fallen, der sich durch das Ausbleiben von Lokomotion, Fressen, Eiablage (bei adulten Würmern) und Zellentwicklung (bei Embryonen und Larven) äußert.^[75–77] Dieser Stillstand dürfte den Energieverbrauch auf ein Minimum senken und somit das Überleben während der Anoxie sichern. Zudem führt die Anoxie zur Produktion und Ausscheidung von L-Lactat, Acetat, Succinat und Propionat durch *C. elegans*.^[78] Die Produktion dieser Metaboliten deutet darauf hin, dass *C. elegans* zur Aufrechterhaltung der zellulären Energieversorgung anaerobe Stoffwechselwege heranzieht, nämlich Milchsäurefermentation und Malat-Dismutation.^[78]

Um das Überleben von *C. elegans* unter hypoxischen Bedingungen zu erklären, ist es sinnvoll, drei Bereiche von Hypoxie zu definieren: milde Hypoxie ($p(O_2) = 0.25\text{--}1$ kPa), schwere Hypoxie ($p(O_2) = 0.01\text{--}0.1$ kPa) und Anoxie ($p(O_2) < 0.001$ kPa). Wie oben beschrieben, weisen *C. elegans*-Embryonen eine hohe Überlebensrate auf (> 90%), wenn sie für 24 h einer milden Hypoxie ausgesetzt waren. Dieses Überleben ist von der Expression von *hif-1* abhängig, einem Homologen des Hypoxie-induzierten Faktors bei Säugetieren.^[74,76,79] *C. elegans*-Embryonen wiesen ebenfalls eine hohe Überlebensrate auf, wenn sie für 24 h einer Anoxie ausgesetzt waren,^[74,76] das Überleben war in diesem Fall jedoch nicht von *hif-1* abhängig.^[76] Vielleicht überraschend weisen die Embryonen von *C. elegans* eine nur geringe Überlebensrate von < 30% auf, wenn sie für 24 h einer schweren Hypoxie ausgesetzt waren.^[74] Es scheint daher, dass die Mechanismen, die den Wurm während der Anoxie und der milden Hypoxie schützen, bei schwerer Hypoxie entweder inaktiv oder ineffektiv sind. Entgegen Embryonen, die einer Anoxie ausgesetzt sind, fallen Embryonen bei schwerer Hypoxie nicht in den Scheintod.^[76,78,79] Werden die Würmer während der schweren Hypoxie mit Kohlendioxid behandelt, fallen auch sie in den Scheintod, und auch die Überlebensrate nach 24 h Exposition steigt signifikant.^[74] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwar schwere Hypoxie allein (ohne CO₂-Behandlung) nicht ausreicht, um den Scheintod zu induzieren, der Scheintod aber, wenn er erst einmal eingeleitet wurde, den Wurm sowohl während einer Anoxie als auch während einer Hypoxie schützen kann.^[74]

3. Wie können Chemiker den Wurm nutzen?

C. elegans diente bislang hauptsächlich als Modellorganismus für die Erforschung der Rolle von Genen bei der Spezifizierung biologischer Prozesse.^[80] Deshalb galt der

konventionelle Ansatz zur Erforschung des Wurms vornehmlich folgenden Aspekten: 1) den Auswirkungen einer genetischen Mutation auf den Phänotyp, 2) den Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Genen und Genprodukten (RNA und Proteinen) und 3) der Funktion einzelner spezifischer Gene.^[38,80] Diese starke Fokussierung auf die Genetik ist sicher historisch bedingt, denn Sydney Brenner und Mitarbeiter hatten *C. elegans* als Modellorganismus eingeführt, um zu studieren, wie einzelne Gene die organismische Entwicklung bestimmen.^[11,12] Ein zweiter, verwandter Grund ist, dass *C. elegans* gerade deswegen ausgewählt wurde, weil sich der Organismus besonders gut für genetische Studien eignete. Durch die Sequenzierung des Genoms von *C. elegans*^[17] wurde die Attraktivität des Wurms als Modellorganismus für genetische Studien nur noch verstärkt.

Aus chemischer Sicht handelt es sich bei einer genetischen Mutation um eine hoch komplexe molekulare Perturbation. Eine einzelne Mutation kann direkte Auswirkungen auf die Struktur und Funktion eines Proteins haben, das durch das Gen codiert ist, und kann darüber hinaus nachgeschaltete, sich aus der geänderten Funktion des Proteins ergebende Auswirkungen zur Folge haben. Falls das Gen für ein regulatorisches Protein codiert, können nachgelagerte chemische Auswirkungen schwerwiegend und äußerst divers sein. Für den Chemiker stellen Gene daher einen weitaus weniger nützlichen Rahmen zum Experimentieren dar als etwa „Proteine“, „Katalyse“, „Metabolismus“ oder „Netzwerke“. Die Beziehung zwischen einer einfachen Information, codiert in einem Genom, und der komplexen Information, die für das Verstehen von Leben nötig ist, wird umso undurchsichtiger, je mehr wir über Gene und auch das Leben an sich lernen.

Mit Blick auf das übergeordnete Ziel, die Beziehungen zwischen Phänotypen und ihren zugrundeliegenden chemischen Zuständen zu verstehen, sollte die chemische Forschung an und mit dem Wurm unserer Meinung nach den folgenden experimentellen Strategien folgen: 1) direkte Manipulation des chemischen Zustandes des Wurms, unabhängig von genetischen Manipulationen, 2) Ausnutzen von genetischen Mutationen, die einfache und wohldefinierte chemische Änderungen hervorufen (dieser Ansatz sollte sich stark auf die Erkenntnisse stützen, die Genetiker bezüglich der Funktion der Gene erhalten haben), und 3) Anwendung konventioneller biochemischer und anderer Techniken, um den chemischen/molekularen Zustand des Wurms in Abhängigkeit von genetischen, umweltbedingten, chemischen und physikalischen Perturbationen zu beobachten. Die folgenden Abschnitte stellen Arbeiten an und mit *C. elegans* vor, die einen signifikanten chemischen Aspekt aufweisen.

3.1. Redoxchemie und der Wurm

Cai und Sesti untersuchten die Auswirkungen chemischer Oxidationen und Reduktionen auf das Verhalten und das Altern von *C. elegans*.^[81] Die Behandlung lebendiger Würmer mit oxidierenden Reagentien wie Wasserstoffperoxid oder Chloramin-T (dem Natriumsalz des *N*-Chlor-4-methylbenzylsulfonamids) verringerte die Fähigkeit des Wurms, Chemotaxis zu betreiben. Die Behandlung von alternden Wür-

mern mit Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol führte zu einer Verlangsamung der altersbedingten Abnahme der Fähigkeit zur Chemotaxis (im Vergleich mit unbehandelten Würmern). In Anbetracht der Bedeutung von K^+ -Kanälen für die neuronalen Funktionen untersuchten die Autoren, ob der Grund für das veränderte Verhalten der Würmer in der Oxidation von KVS-1, einem spannungsgesteuerten K^+ -Kanal in den Neuronen von Würmern, begründet liegt. Mutierte Würmer, die eine Version von KVS-1 mit einer einzigen Cystein-Serin-Mutation exprimieren, zeigten eine geringere Abnahme der Chemotaxis im Vergleich zu Würmern mit natürlichem KVS-1, wenn sie chemischen Oxidantien ausgesetzt wurden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Oxidation des Cysteins in KVS-1 anteilig für die Abnahme der Fähigkeit zur Chemotaxis verantwortlich ist. Dies deutet auf einen möglichen Mechanismus hin, demzufolge oxidativer Stress – wie er beispielsweise durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgeübt wird – zu einer Abnahme neuronaler Funktionen führt.^[82]

Cai und Sesti fanden in ihrer Arbeit, dass ROS die Funktion von Proteinen zu beeinträchtigen scheinen. ROS kann allerdings auch als Botenstoff in Zellen fungieren.^[83] Eine Studie an *clk-1*-Mutanten von *C. elegans*, denen ein Enzym zur Synthese von Ubiquinon fehlt, lieferte einen indirekten Beweis für ROS-vermittelte Signalgebungen in den Würmern.^[84] Die *clk-1*-Mutanten zeigten eine langsamere Zellentwicklung, eine langsamere Keimbahnentwicklung und eine höhere Lebenserwartung als Wildtyp-Würmer.^[84] Die Mutanten könnten auch eine geringere ROS-Gesamtkonzentration aufweisen als Wildtyp-Würmer.^[84] Eine zweifach mutierte Spezies mit Mutationen in *clk-1* und *sod-1*, das für eine Cytosol-Superoxid-Dismutase codiert, wies eine höhere Rate der Keimbahnentwicklung auf als die Würmer, die lediglich die *clk-1*-Mutation besaß. Basierend auf der Annahme, dass die *clk-1*-Mutanten einen geringeren ROS-Spiegel haben und dass die *sod-1*-Mutation einen Anstieg des ROS-Spiegels zur Folge hat, kamen die Autoren zu dem Schluss, dass ROS in den Signaltransduktionspfad involviert sind, der die Keimbahnentwicklung steuert. Weitere Befunde legen nahe, dass die Oxidation von niederdichten Lipoproteinen durch ROS eine Rolle in diesem Signalübertragungsweg spielt.^[84] Zusammenfassend hat die Studie also gezeigt, dass ROS an der Kontrolle der Zellentwicklung beteiligt sind. Weitere Arbeiten sind notwendig, um die Existenz eines ROS-vermittelten Signaltransduktionspfades innerhalb der Entwicklungskontrolle zu bestätigen, und um die biochemischen Wechselwirkungen zu bestimmen, die einem solchen Signaltransduktionspfad zugrunde liegen.

3.2. Molekulare Mechanismen des Alterns in *C. elegans*

Was ist altern? Handelt es sich um einen vorprogrammierten Prozess in lebenden Organismen (wie die Entwicklung)? Ist es bloß eine Anhäufung von Defekten über die Zeit?^[43] Es gibt viele Theorien.^[85] Aufgrund der geringen Lebenserwartung (zwei bis drei Wochen) ist *C. elegans* zum Studium des Alterungsprozesses hervorragend geeignet. Das Altern in *C. elegans* geht mit einigen Änderungen im Phä-

notyp einher, darunter dem Verlust der Fähigkeit zur Reproduktion, einem Anstieg ungeordneter Muskelformen, Faltenwurf innerhalb der Oberhaut und einem fortschreitenden Rückgang der Lokomotion. Wissenschaftler haben über 100 Gene ausgemacht, deren Mutation eine erhöhte Lebenserwartung der Würmer zur Folge hat.^[86] Aus chemischer Sicht besteht die fundamentale Aufgabe bei der Erforschung des Alterungsprozesses darin, herauszufinden, welche chemischen Änderungen im Wurm zu einer erhöhten Lebenserwartung führen. Es ist durchaus möglich, dass gleich mehrere molekulare Mechanismen unabhängig voneinander zu Langlebigkeit beitragen. Wir beschreiben nachfolgend drei bekannte Klassen von Perturbationen, die die Lebenserwartung von *C. elegans* erhöhen: 1) Mutationen innerhalb des Insulin/IGF-1-Signaltransduktionspfades, 2) Nahrungsmittelrestriktion und 3) Mutationen von Genen, die für mitochondriale Proteine codieren.^[42]

3.2.1. Insulin-Signalübertragung und Altern

Wie oben beschrieben wurde, führt die Deaktivierung von DAF-2, dem einzigen Insulin/IGF-1-Rezeptor in *C. elegans* zu einer erhöhten Lebenserwartung.^[69] Der Insulin/IGF-1-Signaltransduktionspfad ist an der Ausbildung des Dauer-Larvenstadiums bei Nahrungsmittelknappheit und Überpopulation beteiligt. *daf-2*-Mutanten fallen im Zuge ihrer Entwicklung konstitutiv in das Dauer-Larvenstadium.^[69] Langlebige Mutanten innerhalb dieser Gruppe zeichnen sich typischerweise durch eine höhere Widerstandsfähigkeit gegen oxidative Stress, Hypoxie, Schwermetalle, UV-Strahlung, hohe Temperaturen und Infektion mit pathogenen Bakterien im Vergleich zum Wildtyp aus.^[42] *daf-2*-Mutanten zeigen zudem Änderungen im Stoffwechsel, wie beispielsweise eine erhöhte Glykogen- und Fettspeicherung.^[43, 69, 87] Es ist nicht klar, welche dieser Charakteristika, wenn überhaupt, notwendig oder ausreichend sind, um eine erhöhte Lebenserwartung herbeizuführen.

3.2.2. Nahrungsmittelrestriktion, Ernährungsweise und Altern

Viele Organismen, einschließlich der Säugetiere, weisen eine erhöhte Lebenserwartung auf, wenn sie unter Diät aufgezogen werden, die kalorienreduziert ist, ansonsten aber alle für eine gesunde Entwicklung benötigten Nährstoffe enthält. Es ist nicht gut verstanden, welche Änderungen auf genetischem und molekularem Niveau mit der Nahrungsmittelrestriktion im Falle von *C. elegans* einhergehen.^[42] Die Lebenserwartung von *C. elegans* hängt von der Konzentration der Bakterien in seiner Umgebung in einer nicht-monotonen Art und Weise ab.^[88-90] In Bereichen geringer Bakterienkonzentrationen ($0\text{--}10^8$ Zellen mL^{-1}) erhöht sich die Lebenserwartung mit steigender Bakterienzahl, wahrscheinlich aufgrund von Hungererscheinungen bei niedrigeren Bakterienkonzentrationen. Im Bereich mittlerer Bakterienkonzentrationen ($10^8\text{--}10^{10}$ Zellen mL^{-1}) sinkt die Lebenserwartung mit weiter steigender Bakterienkonzentration, wahrscheinlich wegen Nahrungsmittelrestriktionen. Bei höheren Konzentrationen an Bakterien ($>10^{10}$ Zellen mL^{-1}) sterben die Würmer im Laufe ihrer Entwicklung, wahrscheinlich aufgrund

von Sauerstoffmangel in der Umgebung der Bakterien.^[88,89] Wegen der offensichtlich schädigenden Auswirkungen hoher Bakterienkonzentrationen auf *C. elegans* muss bestimmt werden, welche Bereiche von Bakterienkonzentrationen einem „Überangebot“ an Nahrung und welche Bereiche einer „Verknappung“ an Nahrung entsprechen.

Als Modelle zur Untersuchung von Nahrungsmittelrestriktionen eignen sich *eat-2*-Mutanten, welche eine verringerte Schlundfunktion und daher eine nur eingeschränkte Fähigkeit haben, sich von Bakterien zu ernähren.^[91] *eat-2*-Mutanten weisen eine erhöhte Lebenserwartung auf und produzieren mehr Superoxid-Dismutases (SOD) und Katalasen als Wildtyp-Würmer.^[88,91] Die Erhöhung der Lebenserwartung durch die *eat-2*-Mutation hängt von der Expression von Genen ab, die eine Rolle in der Makroautophagie spielen – einem in Säugetieren konservierten, zellulären Prozess, bei dem Organellen und subzelluläre Komponenten in Lysosomen abgebaut werden.^[92,93] Dieser Prozess ermöglicht es, dass zelluläre Komponenten abgebaut und wiederverwertet werden. Die *eat-2*-induzierte Erhöhung der Lebenserwartung hängt nicht vom Insulin-Signaltransduktionspfad ab.^[91]

Ein bakterienfreies, chemisch definiertes Medium für *C. elegans* könnte Aufschluss geben über den Zusammenhang zwischen Diät und Langlebigkeit.^[27] Aus unbekannten Gründen wachsen Würmer in bakterienfreiem Medium langsamer und leben länger als Würmer, die mit Bakterien aufgezogen wurden. Darüber hinaus zeigen in bakterienfreiem Medium aufgezogene Würmer eine erhöhte Thermotoleranz, eine geringfügig höhere Widerstandsfähigkeit gegen oxidativen Stress (Behandlung mit Wasserstoffperoxid und Paraquat) sowie erhöhte SOD- und Katalase-Spiegel.^[94] Eine mögliche Erklärung ist, dass die Würmer flüssige, bakterienfreie Medien weniger gut aufnehmen können als Bakterien, und in diesem Fall würde die Verfütterung von bakterienfreier, flüssiger Nahrung einer Nahrungsmittelrestriktion gleichkommen.^[42]

Auch ohne chemisch definiertes Medium ist eine Untersuchung des Einflusses der Ernährungsweise auf die Lebenserwartung der Würmer möglich, indem an die Würmer Bakterien verfüttert werden, denen spezifische Nährstoffe zugesetzt wurden. Studien belegen, dass die Beimengung von D-Glukose zur Bakteriendiät von *C. elegans* dessen Lebenserwartung senkt.^[95–97] Diese Glukose-vermittelte Verkürzung der Lebenserwartung scheint mit dem oben beschriebenen Insulin/IGF-1-Signaltransduktionspfad zusammenzuhängen.^[95]

Eine Behandlung der Würmer mit 2-Desoxy-D-glukose (DOG) – einem kompetitiven Inhibitor der Glukose-6-phosphat-isomerase, die in der zweiten Stufe der Glykolyse benötigt wird – verhindert den Abbau der Glukose. Schulz und Mitarbeiter fanden, dass eine DOG-Behandlung die Lebenserwartung von *C. elegans* erhöht.^[97] DOG-behandelte Würmer weisen zudem einen höheren Sauerstoffverbrauch sowie einen erhöhten Anteil von Fett als Energiequelle auf als un behandelte Würmer (Extrakte behandelter Würmer enthielten geringere Mengen an Triglyceriden als die Extrakte der Kontrollgruppen).^[97] Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Würmer die DOG-induzierte Inhibition

der Glykolyse durch eine erhöhte mitochondriale Atmung kompensieren, wobei sie Fettsäuren als Energiequelle nutzen. Diese Theorie wird durch DNA-Mikroarray-Experimente gestützt, durch die gezeigt werden konnte, dass die DOG-Behandlung die Produktion von Proteinen erhöht, die mit dem Transport von Lipiden, der Oxidation von Fettsäuren und der mitochondrialen Atmung assoziiert sind.^[97]

Diese Ergebnisse allein erkären allerdings nicht die erhöhte Lebenserwartung in DOG-behandelten Würmern. Eine weitere mögliche Ursache ist der „hormetische Effekt“ – ein Phänomen, bei dem eine geringe Dosis eines Stressfaktors, der in höheren Dosen toxisch ist, ein positives Resultat hervorruft, z. B. eine erhöhte Lebenserwartung.^[98] In DOG-behandelten Würmern könnte die erhöhte mitochondriale Atmung die Produktion von ROS (dem Stressfaktor) erhöhen, wodurch im Gegenzug eine Schutzreaktion des Organismus eingeleitet wird, sodass letztlich die Langlebigkeit gefördert wird.^[98] Um die ROS-Bildung zu verfolgen, behandelten Schulz et al. die Würmer mit 2,7-Dichlordihydrofluorescein (H₂-DCF), das nach Oxidation zu 2,7-Dichlorfluorescein fluoresziert. Die mit DOG behandelten Tiere wiesen höhere Konzentrationen an fluoreszierendem DCF auf als un behandelte Würmer, was darauf hindeutet, dass der ROS-Spiegel in mit DOG behandelten Würmern höher ist. Werden die mit DOG zu behandelnden Würmer mit Antioxidantien wie *N*-Acetylcystein (einem Glutathion-Vorläufer), Ascorbinsäure und Vitamin E vorbehandelt, wurde der lebensverlängernde Effekt der DOG-Behandlung nicht mehr beobachtet. Dies stützt die These, dass ROS eine schützende, lebensverlängernde Antwort des Organismus von *C. elegans* hervorruft. Die Autoren fanden auch einen Beweis für einen derartige Schutzmechanismus. Extrakte von Würmern, die sechs Tage lang mit DOG behandelt worden waren, enthielten signifikant höhere Konzentrationen der Katalase, die die Zersetzung von Wasserstoffperoxid katalysiert (im Vergleich mit Extrakten von un behandelten Würmern).^[97]

Andere einfache Änderungen in der Diät von *C. elegans* können sich ebenfalls auf die Lebenserwartung auswirken. Zum Beispiel erhöht der Zusatz von Essigsäure zur Bakteriendiät von *C. elegans* die Lebenserwartung.^[99] Der Mechanismus dieses Effekts ist unbekannt, eine mögliche Erklärung wäre aber, dass die Essigsäure (oder das Acetat) mit dem Kohlenhydrat- oder Lipidstoffwechsel interagiert.

3.2.3. Mitochondriale Mutationen und Altern

Mutationen in Genen, die für mitochondriale Proteine codieren, können ebenfalls zu einer erhöhten Lebenserwartung beitragen. So sind beispielsweise langlebige *clk-1*-Mutanten bekannt, in denen die Synthese von Ubiquinon, das Bestandteil des Elektronentransportmechanismus der aeroben Atmung ist, gestört ist. Einige, bei weitem aber nicht alle langlebenden mitochondrialen Mutanten weisen einen geringeren Sauerstoffverbrauch auf als der Wildtyp.^[42] Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch ROS hervorgerufene chemische Defekte den Alterungsprozess verursachen.^[100] Eine verringerte Mitochondrienaktivität könnte zu einer verringerten ROS-Produktion führen. Störungen in der Elektronentransportkette könnten den Organismus des

Wurms ebenfalls dazu stimulieren, anaerobe Stoffwechselpfade wie die Malat-Dismutation zu aktivieren, wodurch wahrscheinlich weniger ROS produziert wird.^[42,86] Die Behandlung von Würmern mit Antioxidantien – wie Vitamin E und verwandten Verbindungen,^[101,102] Ubiquinon,^[102] Polyphenolen sowie Extraktten von Blaubeeren und anderen Pflanzen^[103,104] – resultiert ebenfalls in einer erhöhten Lebenserwartung. Es ist jedoch nicht klar, ob die durch die Antioxidantien hervorgerufene Zunahme der Lebenserwartung in der Verringerung der ROS-Konzentration begründet liegt, denn auch andere Mechanismen sind vorstellbar. So ist beispielsweise die Erhöhung der Lebenserwartung durch Polyphenole, die aus natürlichen Quellen extrahiert wurden, mit Genen assoziiert, die Teil des angeborenen Immunsystems von *C. elegans* sind.^[103,104]

Es ist auch möglich, dass eine Verringerung der mitochondrialen Aktivität indirekt für die erhöhte Lebenserwartung zuständig ist. Werden sich entwickelnde Larven kurzzeitig mit interferierender RNA (iRNA) gegen Proteine der Elektronentransportkette behandelt, erhöht sich schon die Lebenserwartung.^[105] Eine Verringerung der mitochondrialen Aktivität könnte daher als Signal dienen, das in permanenten Änderungen des Stoffwechsels des Wurms resultiert.

3.2.4. Begünstigt eine molekulare Reaktion auf Stress die Langlebigkeit?

Viele der Perturbationen, die zu einer erhöhten Lebenserwartung von *C. elegans* führen, simulieren eine Art von umweltbedingtem Stress. Zum Beispiel ist die Insulin-Signalgebung eng mit der Ausbildung des Dauer-Larvenstadiums verbunden, mit dem der Wurm auf Nahrungsmittelknappheit oder Überpopulation reagiert;^[64] kalorien- oder glukosearme Diäten haben Engpässe in der Energieversorgung zur Folge;^[97] lebensverlängernde Naturstoffe wie Polyphenole (aus Blaubeeren) und Polysaccharide (aus Reishi-Pilzen) aktivieren das Immunsystem und können dadurch eine Schutzreaktion auslösen.^[99,103,104] Wie aber führen realer oder gefühlter Stress zu einer erhöhten Lebenserwartung? Viele langlebige Würmer weisen erhöhte Konzentrationen an SOD und Katalasen auf, was auf einen lebensverlängernden Effekt einer verringerten ROS-Konzentration hindeutet. Obgleich viele der langlebenden Würmer gegen oxidative Stress resistent sind, reagieren einige dieser Spezies hypersensitiv auf eine Behandlung mit Wasserstoffperoxid.^[106] Eine breiter angelegte Möglichkeit besteht darin, dass umweltbedingter Stress bestimmte Stoffwechselpfade heraufreguliert, die auf die Handhabung problematischer molekularer Spezies (toxische Stoffwechselprodukte wie ROS, Xenobiotika, ungefaltete Proteine, Lipofuszin (lipophiler, molekularer „Müll“)) spezialisiert sind.^[22] In DNA-Mikroarray-Experimenten wurde demonstriert, dass *daf-2*-Mutanten eine Gruppe von Genen verstärkt exprimieren, die mit folgenden Vorgängen assoziiert sind: 1) dem Abbau problematischer Verbindungen (Cytochrome P450, kurzkettige Dehydrogenasen und Reduktasen, UDP-Glukuronosyltransferasen, Glutathion-S-transferasen) und 2) der Erhaltung von ordentlich gefalteten Proteinen sowie dem Entfernen von feh-

lerhaft gefalteten Proteinen (Chaperone und Hitzeschockproteine).^[22]

3.2.5. Ausblick auf die Erforschung des Alterns mithilfe von *C. elegans*

Ein irritierender Aspekt der Erforschung des Alterungsprozesses in *C. elegans* ist, dass langlebende Würmer diverse und manchmal auch sich widersprechende Merkmale aufweisen. So können beispielsweise genetische oder chemische Perturbationen langlebige Würmer erzeugen, die im Vergleich mit Kontrollwürmern einen beschleunigten,^[97] einen verlangsamten^[107] oder einen unveränderten^[98] Stoffwechsel aufweisen. Dieser Zwiespalt macht deutlich, dass eine Standardisierung der experimentellen Methoden notwendig ist, und er verdeutlicht außerdem, dass der Alterungsprozess sehr komplex sein kann. Ein weiterer, verkomplizierender Faktor ist der hormetische Effekt, bei dem Stress eine kontraintuitive Rolle bei der Erhöhung der Lebenserwartung spielt.^[98]

Ein Bereich, in dem Chemiker zur Erforschung des Alterungsprozesses beitragen könnten, liegt in der Entwicklung zusätzlicher Methoden zur Sondierung des chemischen Zustandes des alternden Wurms. Erkenntnisse über Parameter wie den Redoxzustand der Zelle, die chemische Aktivität der Mitochondrien oder die molekulare Zusammensetzung intrazellulärer Abfallprodukte könnten sicher dazu beitragen, die molekulare Basis des Alterungsprozesses und der Langlebigkeit zu entschlüsseln.

Ein weiterer Schritt vorwärts bei der Erforschung des Alterungsprozesses in *C. elegans* wäre auch die Entwicklung neuer Instrumente für die Forschung. So könnten Langzeitexperimente von Nutzen sein, d.h. Experimente, in denen das Verhalten individueller Organismen über die gesamte Lebenszeit des Organismus hinweg aufgezeichnet wird. Mithilfe solcher Experimente würde es gelingen, Biomarker des Alterungsprozesses in isogenen, identisch behandelten Würmern zu bestimmen.^[108] Wir haben ein Instrument zur Durchführung von Längsschnittstudien an *C. elegans* entwickelt (Abbildung 2).^[109] Das Instrument ermöglicht die lebenslange Beobachtung einer Population einzelner Würmer in einer wohldefinierten chemischen Umgebung und ist zudem vereinbar mit der Beobachtung von lokomotorischem Verhalten und mit subzellulärer Bildgebung. Wir haben dieses Instrument eingesetzt, um altersbedingte Änderungen in Körpergröße und Lokomotion zu identifizieren, die mit der Lebensdauer von *C. elegans* korrelierten.^[109]

3.3. Biochemie und *C. elegans*

Im Vergleich mit der großen Zahl von Forschungsarbeiten, die zum Studium von *C. elegans* einen genetischen Ansatz verwendeten, fällt die Zahl der Arbeiten, die konventionelle biochemische Ansätze nutzen, eher klein aus.^[62,80] Hier könnte die molekulare Biochemie jedoch wichtige Beiträge leisten. Als Grund für die geringe Zahl an biochemischen Studien wurde die schwierige Isolation der benötigten Probenmengen aus den Würmern angeführt,^[80] allerdings trägt die Entwicklung von hochempfindlichen Techniken zur

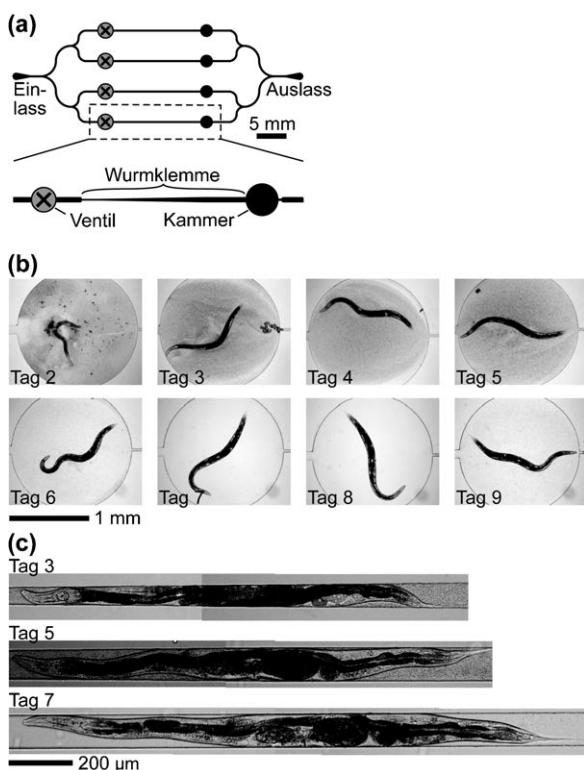


Abbildung 2. Ein mikrofluidisches Instrument zur lebenslangen Beobachtung von *C. elegans*. a) Eine schematische Darstellung eines Instruments mit vier Kamern, von denen jede einen einzelnen Wurm für die Dauer seines Erwachsenenlebens beherbergt. Jeder Kammer vorgelagert ist eine Wurmklammer – ein konisch zulaufender, mikrofluidischer Kanal, der die temporäre Immobilisierung der Würmer zwecks Aufnahme hochauflöster Bilder ermöglicht. Eingebaute Ventile erlauben es, jede Kammer strömungstechnisch zu isolieren. Das Design ist skalierbar, und es können mehr als vier Kammern in das Gerät integriert werden. b) Mikrobild eines einzelnen Wurms in einer mikrofluidischen Kammer, in der er für die gesamte Dauer seines Erwachsenenlebens isoliert ist. Der kontinuierliche Durchfluss einer Bakteriensuspension vom Einlass in Richtung Auslass versorgt den Wurm mit Nahrung und entfernt Abfallstoffe. c) Mikrobilder des Wurms aus (b), immobilisiert in der Wurmklammer an den Tagen 3, 5 und 7. Die Umkehr der Flussrichtung durch das Instrument spült den Wurm in die Wurmklammer. Wiedergabe nach Lit. [109].

Analyse kleiner Probenmengen (MS, GLC/MS und CE/MS) dazu bei, dieses Problem zu verringern. In anderen Fällen wurden physikalische Barrieren wie die Oberhaut oder die Eierschale als Hinderungsgründe genannt.^[62] Es scheint aber möglich, diese Barrieren mithilfe gentechnischer,^[110] chemischer^[111,112] oder mechanischer^[112] Herangehensweisen überwinden zu können. Im folgenden Abschnitt stellen wir die biochemische Forschung an *C. elegans* vor.

3.3.1. Das Proteom von *C. elegans*

Mithilfe zweidimensionaler Gelektrophorese sowie eindimensionaler Flüssigkeitschromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie konnte untersucht werden, inwieweit sich die Proteinexprimierung zwischen Wurmpopulationen unterscheidet, die sich im Bezug auf das Ent-

wicklungsstadium,^[113] das Geschlecht,^[114] die Alterungsrate^[115] und die Fähigkeit zur Reproduktion^[116] unterscheiden. Zudem sind durch diese Proteomiktechniken Proteine identifiziert worden, die sich in aus Würmern isolierten Mitochondrien finden.^[117]

Durch die Verwendung von Stickstoffisotopen gelang es Krijgsveld und Mitarbeitern, die Proteinexprimierung in verschiedenen Wurmpopulationen quantitativ zu vergleichen.^[116] Die Aufzucht von *E. coli* in ¹⁵N-angereichertem Medium und die anschließende Verfütterung dieser Bakterien an die Würmer ermöglichte die Züchtung einer Generation von Würmern mit ¹⁵N-haltigen Proteinen. Es war dann möglich, die Proteinextrakte von Würmern zweier Populationen – Würmern mit ¹⁴N und Würmern mit ¹⁵N – 1:1 zu mischen und so mittels zweidimensionaler Elektrophorese und Massenspektrometrie die relative Menge an ¹⁴N-haltigen und ¹⁵N-haltigen Proteinen in der Probe zu erfassen. Diese Methode erlaubte die Bestimmung des relativen Niveaus der Proteinexprimierung in der ¹⁵N-markierten Wurmpopulation, bezogen auf das Niveau der Proteinexprimierung in der ¹⁴N-haltigen Wurmpopulation (und umgekehrt). Kürzlich diente diese Methode zur Untersuchung, inwieweit sich die Proteinexprimierung in langlebigen *C. elegans*-Mutanten ändert.^[115] Langlebige *daf-2*-Mutanten bilden im Vergleich mit dem Wildtyp im geringeren Maße solche Proteine aus, die mit dem Lipidtransport und der RNA-Translation assoziiert sind, und im höheren Maße solche Proteine, die mit der Aminosäure-Biosynthese sowie dem Sauerstoff-, ROS- und Kohlenhydratstoffwechsel assoziiert sind.

3.3.2. Verfolgung der Glykosylierung in *C. elegans*

Nishiwaki und Mitarbeiter fanden mithilfe von Protein-Immunblots, dass eine fehlerhafte Morphogenese der Gonade in einer *C. elegans*-Mutante ihre Ursache in einer gestörten Glykosidierung eines Proteins hatte, das für die Führung der distalen Spitze der Gonade während der Entwicklung zuständig ist.^[118] Andere Autoren fanden durch Immun-Blotting, dass Mutationen, die mit der Addition (oder dem Entfernen) von O-verknüpftem *N*-Acetylglucosamin (*O*-GlcNAc) an Proteine (von Proteinen) interferieren, zu einem veränderten Stoffwechsel bei *C. elegans* führen, der mit höheren Konzentrationen von Glykogen und Trehalose sowie niedrigeren Lipidwerten einhergeht.^[33,119] Dieses Ergebnis könnte für die menschliche Gesundheit relevant sein; eine Einzelnukleotidpolymorphie in der *O*-GlcNAcase ist mit Typ-II-Diabetes beim Menschen assoziiert.^[33]

3.3.3. Ausblick auf die biochemische Forschung

Die geringe Zahl biochemischer Forschungen an *C. elegans* könnte einen Bedarf an neuen Werkzeugen und Arbeitstechniken widerspiegeln, was wiederum Chemikern in der Biochemie und der organismischen Chemie Möglichkeiten aufzeigen sollte. Neue Techniken, die eine Erforschung der Biochemie des Wurms erlauben, werden unzweifelhaft dazu beitragen, den Zusammenhang zwischen Zuständen auf molekularer Ebene und denen auf der Ebene des Gesamtorganismus zu verstehen.

3.4. Modellierung menschlicher Krankheiten in *C. elegans*

C. elegans kann auch mit Blick auf das Verstehen einiger Aspekte menschlicher Krankheiten von Nutzen sein.^[28] Eine Herausforderung bei der Entwicklung von Modellen menschlicher Krankheiten in *C. elegans* besteht darin, den Grad zu bestimmen, bis zu dem das *C-elegans*-Modell einer bestimmten menschlichen Krankheit die molekularen Aspekte dieser Krankheit im Menschen akkurat widerspiegelt. Vom Einsatz des Wurms profitieren am ehesten Studien zu solchen Krankheiten, die Prozesse befallen, die zwischen Würmern und Menschen in hohem Maße konserviert sind (wie neuronale Signalübertragung oder grundlegender Stoffwechsel). Künftige Arbeiten werden aufzeigen, welche Gemeinsamkeiten bestehen.

Würmer ermöglichen die Studie von Krankheiten im Kontext eines intakten und mehrzelligen Multiorgan-Organismus und können so zum Verständnis der Wechselwirkungen zwischen mehreren biologischen Systemen in der Pathologie einer Krankheit beitragen. Würmer zeigen eine

große Bandbreite an physiologischen und verhaltensbezogenen Phänotypen – von der Genexpression und dem biochemischen Zustand bis hin zu Verhaltensweisen und Altern. Wird der Wurm auf molekularer Ebene Perturbationen ausgesetzt (z.B. der Mutation eines mit der Krankheit assoziierten Gens oder der Verabreichung von Wirkstoffen), kann dies unter Umständen weitreichende Folgen auf der Organismusebene haben (z.B. Änderungen in der Lebenserwartung, der Morphologie und/oder im Verhalten). So ist es z.B. möglich, den Vorgang der Eiablage, der einfach zu beobachten und zu quantifizieren ist, als Maß für die serotonerge Signalübermittlung zu nutzen.^[121] In Tabelle 4 sind menschliche Krankheiten aufgeführt, für die Modelle in *C. elegans* vorgeschlagen und demonstriert worden sind. In einigen Fällen existieren in *C. elegans* Homologe krankheitsbezogener Gene des Menschen. In anderen Fällen ist es notwendig, menschliche Gene in *C. elegans* einzusetzen, um ein geeignetes Modell zu erhalten. Für jede in Tabelle 4 aufgeführte Krankheit werden auch die dazugehörigen Änderungen am Phänotyp genannt.

Tabelle 4: Menschliche Krankheiten, die in *C. elegans* erforscht wurden.

Krankheit	Ansatz	Phänotyp der Krankheit beim Wurm	Literatur
Alzheimer	Hochdurchsatz-Screening von Inhibitoren des Präsenilin-Homologen im Wurm	Verminderte Eiablage	[273]
	Transgene Expression von Amyloid- β im Wurm	Proteinoxidation; Paralyse; Bildung von Amyloidfibrillen	[123, 125, 129, 274]
Chorea Huntington	Transgene Expression von polyQ-Erweiterungen im Wurm	Verringerte Lokomotion; erhöhte Rate des altersbedingten Rückgangs der Lokomotion; Bildung unlöslicher polyQ-Aggregate	[126, 127]
	Transgene Expression von Huntington und Mutation des polyQ-Enhancer-Gens (<i>pqe-1</i>) in <i>C. elegans</i>	Neuronaler Tod und Degeneration; verringelter Nahrungsmittelverbrauch	[275, 276]
Parkinson	Transgene Expression von menschlichem α -Synuklein im Wurm	Veränderte Dopamin(DA)-Konzentration; Degeneration der DAergischen Neuronen; reduzierte Beweglichkeit; veränderte Verteilung von DA-Bläschen an den Synapsen	[277, 278]
Depression	Mutation von Genen in konservierten serotonergen Signalübertragungswegen zur Bestimmung des Mechanismus von Antidepressiva	Verstärkte serotonergische Signalübertragung führt zu vermehrter Eiablage; verminderte serotonergische Signalübertragung führt zu verminderter Eiablage	[121]
Muskeldystrophie vom Duchenne-Typ	Wurm hat Dystrophin-ähnliches Gen (<i>dys-1</i>); Untersuchung der Auswirkungen von <i>dys-1</i> -Mutationen	Verringerte Lokomotion; Degeneration von Muskelzellen; veränderte Reaktion von Muskelzellen auf Acetylcholin und Acetylcholinesterase-Inhibitoren	[279, 280]
Lungenkrebs	Transgene Expression von Wildtyp- und mutiertem c-Met im Wurm	Verringerte Lokomotion; Paralyse; Wachstumsarrest; Änderungen in der Körpermorphologie	[281]
Karzinogenese	Würmer werden bekannten Karzinogenen ausgesetzt	Inhibition der Apoptose während der Entwicklung	[140]
Tumorbildung	Mutation von <i>gld-1</i> , einem Tumorsuppressorgen im Wurm	Tumorartige Proliferation von Keimzellen	[131, 282]
Bakterielle Infektion	Verfütterung von infektiösen Bakterien an die Würmer	Darmbefall von Bakterien; Tod	[283]
Diabetes/Insulinresistenz	Mutation der konservierten Hexosamin-Signaltransduktion	Vermehrtes Speichern von Glykogen und Trehalose; verringerte Fettspeicherung	[33, 119]
Mitochondriopathie	Mutation konservierter mitochondrialer Proteine	Schwere Funktionsverlust- und Null-Mutationen führen zum Wachstumsarrest, Tod; milde Funktionsverlust-Mutationen können die Lebenserwartung erhöhen.	[284]

3.4.1. Neurodegenerative Krankheiten

Es ist möglich, in das Genom von *C. elegans* Gene einzusetzen, die für zur Aggregation neigende Polypeptide codieren,^[122] und anschließend die Auswirkungen dieser Polypeptide auf den Organismus zu untersuchen. Diese Strategie ermöglichte die Studie von Analogen zahlreicher menschlicher neurodegenerativer Krankheiten in *C. elegans*, einschließlich der Alzheimer-Krankheit^[123–125] (AD) und Chorea Huntington^[126,127] (HD).

Im Menschen ist die Alzheimer-Krankheit durch die Aggregation von β -Amyloidpeptid($\text{A}\beta$)-haltigen Proteinen zu Plaques oder Fibrillen im Gehirn des Patienten sowie durch schwere oxidative Schäden des Hirngewebes charakterisiert.^[128] Der auffälligste Phänotyp in transgenen, $\text{A}\beta$ -exprimierenden Würmern ist fortschreitende Paralyse.^[123,129] An solchen transgenen Würmer lässt sich die Bildung von Amyloid-Plaques und das Vorliegen von Carbonylgruppen in Proteinen untersuchen (als Maß für den Oxidationsgrad der Proteine; bestimmt durch Reaktion der Carbonylgruppen extrahierter Proteine mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, Auf trennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Detektion der derivatisierten Carbonylgruppe mittels Immunfärbung).^[123,125] Im Vergleich mit Extrakten von Wildtyp-Würmern weisen die Extrakte der $\text{A}\beta$ -exprimierenden Würmer höhere Carbonylgruppenkonzentrationen auf.^[125] Durch Verwendung eines temperatursensitiven Strangs von $\text{A}\beta$ -exprimierenden Würmern (der nur bei 23 °C $\text{A}\beta$ bildete) konnten Drake und Mitarbeiter nachweisen, dass Paralyse und erhöhte Carbonylgruppenbildung auftraten, bevor die Plaquebildung einsetzte.^[123] Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Plaquebildung möglicherweise ein Symptom für eine Erkrankung mit Alzheimer ist und nicht allein verantwortlich für die Pathogenese der Krankheit.

Es ist eventuell möglich, durch den Einsatz transgener, Polyglutamin(polyQ)-produzierender Würmer Einsichten in den Mechanismus der HD-Pathogenese zu erlangen. *C. elegans*-Spezies, die längere polyQ-Ketten (Polypeptide mit einer höheren Anzahl an Q-Wiederholungen) bilden, enthalten eine größere Anzahl von polyQ-Aggregaten, weisen einen früheren Zeitpunkt der polyQ-Aggregation auf, kriechen langsamer und erfahren einen schnelleren altersbedingten Rückgang der Lokomotion als Tiere, die kürzere polyQ-Fragmente exprimieren.^[127] Zudem scheint die Bildung von polyQ die Stabilität anderer Proteine in *C. elegans* zu beeinträchtigen.^[126] Durch das Erzeugen temperatursensitiver Mutationen in *C. elegans* ist es möglich, einen mutierten Phänotyp bei einer bestimmten Temperatur (der restriktiven Temperatur) zu beobachten, aber nicht bei einer anderen Temperatur (der permissiven Temperatur). So könnte beispielsweise eine Mutation zu einer temperaturabhängigen Störung der Proteinfaltung führen; in diesem Falle würde eine Änderung des Phänotyps (aufgrund der Fehlfaltung) nur bei der restriktiven Temperatur zu beobachten sein. In mutierten Würmern, die temperatursensitive Mutationen in einer Vielzahl von Proteinen aufwiesen, führte die Coexprimierung von polyQ-Ketten zur Ausbildung des temperatursensitiven Phänotyps bei den permissiven Temperaturen. So entwickeln sich beispielsweise Würmer, die eine tempe-

ratussensitive Mutation im Paramyosin tragen, bei 15 °C (der permissiven Temperatur) normal, stellen aber das Wachstum in der Entwicklungsphase bei 25 °C (der restriktiven Temperatur) ein. Tragen die Würmer zusätzlich zu dieser Mutation Gene in sich, die für eine polyQ-Wiederholung codieren, stellen beinahe die Hälfte von ihnen das Wachstum während der Entwicklungsphase bei 15 °C ein. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von polyQ (und möglicherweise auch von polyQ-Aggregaten) den Effekt der restriktiven Temperatur widerspiegelt. Die Autoren dieser Studie schlagen vor, dass durch die Bildung und die Anhäufung von polyQ-Aggregaten die zelluläre Maschinerie zur Proteinfaltung und zur Korrektur oder Beseitigung fehlgefalteter Proteine überfordert werden könnte und die polyQ-Aggregation so die Instabilität verstärkt, die durch die temperatursensitive Mutation verursacht wurde.^[126] Wenn auch unbewiesen, stellt diese Hypothese doch einen universellen Mechanismus der zellulären Toxizität von zur Aggregation neigenden Proteinen und Polypeptiden dar.

3.4.2. Krebserkrankungen

In ihrer Entwicklungsphase produzieren Hermaphroditen genau 1090 Körperzellen. Zu verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungsprozesses erfahren 131 dieser Zellen Apoptose, sodass der vollentwickelte Wurm 959 Zellen besitzt. Die Anzahl an Körperzellen im adulten Wurm beträgt konstant 959; die Zellen eines adulten Wurms durchlaufen keine weiteren mitotischen Teilungen. Diese nicht-proliferativen Zellen bilden keine somatischen Tumore.^[130] Daher scheint es zunächst, als sei der Wurm kein geeigneter Kandidat für einen Modellorganismus zum Verständnis von Krebserkrankungen. Drei Ansätze haben es jedoch ermöglicht, Modelle zum Studium von Krebs und Karzinogenese in *C. elegans* zu entwickeln.

Der erste Ansatz konzentriert sich auf die Entdeckung genetischer Änderungen, die unkontrollierte Zellproliferationen in *C. elegans* zur Folge haben. Die Mutation des *C. elegans*-Gens *gld-1* lieferte Würmer mit tumorartigen Proliferationen von Zellen in der Gonade. In diesen Mutanten ersetzt die unkontrollierte mitotische Teilung von Keimzellen die Produktion von Oozyten aus den Keimzellen mittels Meiose; diese Proliferation kann die Gonade auseinanderreißen, und letztlich auch den Wurm.^[131] Kenyon und Mitarbeiter fanden, dass Mutationen, die die Lebenserwartung von *C. elegans* erhöhen – *daf-2* (Teil des Insulin/IGF-1-Signalübertragungswegs), *eat-2* (eine Mutation, die Nahrungsmitteleinschränkungen aufzwingt) und *clk-1* (eine Mutation, die die zelluläre Atmung stört) –, die Proliferation der Keimzellen in *gld-1*-Tieren verringern und in manchen Fällen auch den frühen Tod verhindern.^[131–132] In Würmern, die sowohl eine *gld-1*- als auch eine *daf-2* Mutation trugen, trug Apoptose zur Verringerung der Gesamtzahl an Keimzellen bei.^[131] Ungleicher den apoptotischen Vorgängen im Zuge der Entwicklung, hängen die zur Verringerung der Gesamtzahl an Keimzellen beitragenden apoptotischen Vorgänge von CEP-1 ab, einem Homologen des menschlichen Tumor-Suppressor-Proteins p53.^[131] Dieses Ergebnis legt nahe, dass es eine – wenn auch

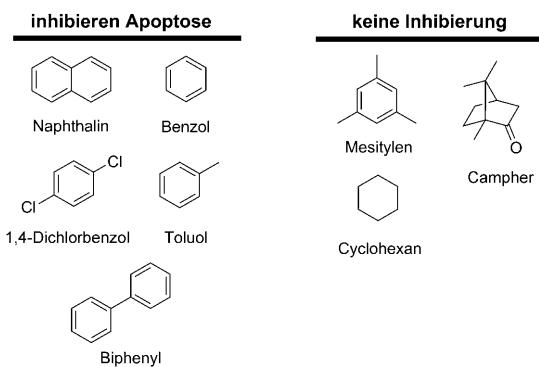
weit entfernte – Beziehung zwischen der Tumorbildung beim Menschen und beim Wurm gibt.

Der zweite Ansatz konzentriert sich auf die Erforschung von Pfaden, die für menschliche Krebserkrankungen relevant sind und die gleichzeitig zwischen Menschen und Würmern konserviert sind. Die *RAS*-Gene codieren für eine Familie von kleinen GTPasen, die eine Schlüsselrolle in einem konservierten Signaltransduktionspfad spielen, der an der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und dem Überleben der Zelle beteiligt ist.^[133] Dysregulation des *RAS*-Pfades spielt bekanntermaßen bei der Tumorgenese eine Rolle. Ungefähr 20% aller menschlichen Tumore enthalten aktivierende Mutationen in einem der *RAS*-Proteine.^[133] Der *RAS*-Signalübertragungspfad ist zwischen Würmern und Menschen in hohem Maße konserviert, obgleich der Pfad in Würmern weitaus einfacher ist; Würmer haben beispielsweise nur ein einziges *RAS*-Protein (LET-60), während Menschen derer drei aufweisen.^[134]

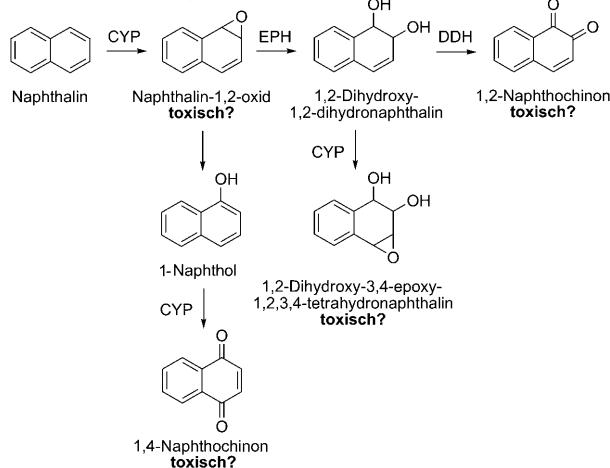
Die Forschung an und mit *C. elegans* ermöglichte signifikante Durchbrüche bei der Entschlüsselung des *RAS*-Signaltransduktionspfades.^[135,136] Maßgeblichen Anteil daran hatte die Entdeckung, dass eine Änderung des *RAS*-Pfades einfach zu beobachtende phänotypische Änderungen im Zuge der Entwicklung der Vulva zur Folge hatte: Mutationen, die die Aktivierung des *RAS*-Proteins in *C. elegans* verhindern, erzeugen Würmer ohne Vulva; Mutationen, die das *RAS*-Protein konstitutiv aktivieren, haben Phänotypen mit mehreren Vulven zur Folge.^[134] Im Wildtyp-*C. elegans* besteht die Vulva übrigens aus Nachfahren von nur drei Zellen.^[134] Die durch die Veränderungen des *RAS*-Signaltransduktionspfades hervorgerufenen Effekte auf das Schicksal von Zellen im Zuge der Entwicklung der Vulva sind daher direkt beobachtbar. Zusätzlich zu seiner Funktion als einfaches Modell zum Verständnis des Mechanismus der *RAS*-Signalübertragung kann *C. elegans* auch als Modell zur Entwicklung von Wirkstoffen dienen, die in die *RAS*-Signalübertragung eingreifen. Die Inhibierung des *RAS*-Signaltransduktionspfades ist eine mögliche Richtung in der Antikrebstherapie.^[133]

Der dritte Ansatz konzentriert sich auf das Studium der Wirkmechanismen karzinogener Substanzen. Ein Karzinogen kann zum Tumorwachstum beitragen, indem es 1) durch Änderung der RNA einer Zelle die Tumorbildung einleitet oder 2) mit der zellulären Maschinerie in einer Art und Weise wechselwirkt, die es problematischen, tumorigen Zellen erlaubt, fortzubestehen und zu proliferieren.^[137] Ein Mechanismus der Tumorphilierung ist das Verhindern der Apoptose.^[138] Obwohl nicht klar ist, in welchem Maße dieses Verhindern der Apoptose in *C. elegans* mit Karzinogenese in Säugetieren korreliert, gibt es doch eine signifikante Überlappung zwischen den Apoptosewegen in Menschen und Würmern.^[139] Aufgrund der Tatsache, dass sowohl die Anzahl der sich bildenden Zellen als auch die Anzahl der sterbenden Zellen im Wurm nicht variiert, ist es möglich, eine Studie zur Unterdrückung der Apoptose durchzuführen, indem einfach die Zahl der „Extrazellen“ im adulten Wurm gezählt wird. Unter Anwendung dieses Verfahrens untersuchten Kokel und Mitarbeiter die Fähigkeit verschiedener Substanzen, die Apoptose in Würmern zu verhindern, die eine zum partiellen

Funktionsverlust führende Mutation in *ced-3* trugen (einem für die Apoptose-unterstützende Kaspase codierenden Gen).^[130,140] In ausgereifter Form weisen *ced-3*-Mutanten eine geringe Anzahl von Extrazellen auf (in Wildtyp-Würmern erfahren 16 Zellen des vorderen Pharynx Apoptose; in *ced-3*-Mutanten überleben eine oder zwei dieser Zellen). Naphthalin, Dichlorbenzol, Benzol und Toluol führten zu einer Erhöhung der Anzahl der persistenten Zellen in *ced-3*-Mutanten – d.h. sie verhinderten zusätzlich die Apoptose in diesen Tieren. Mesitylen (1,3,5-Trimethylbenzol), Cyclohexan und Campher führten hingegen nicht zu einer Erhöhung der Anzahl der Extrazellen.^[130,140] Die Strukturen der Substanzen sind in Schema 1 wiedergegeben.



Metabolismus von Naphthalin



Schema 1. Niedermolekulare Verbindungen, die die Apoptose in *C. elegans* unterbinden – oder auch nicht. Die untere Reihe zeigt die Bildung der reaktiven, potentiell toxischen Metabolite, die beim Abbau von Naphthalin entstehen.^[141] An den Stoffwechselprozessen sind Cytochrome P450 (CYP), Epoxid-Hydrolase (EPH) und Dihydrodiol-Dehydrogenase (DDH) beteiligt.

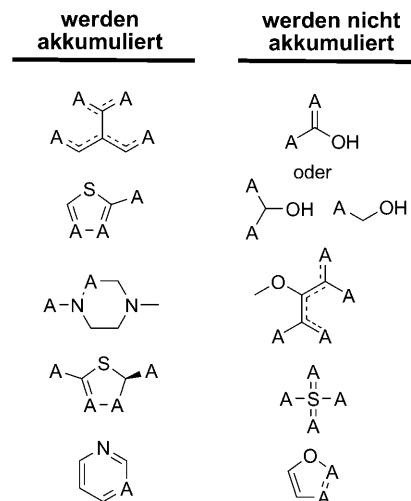
Eine Herausforderung bei der Bestimmung der Wirkmechanismen der Karzinogene besteht darin, dass der stoffwechselkontrollierte Abbau einer Verbindung mehrere verschiedene reaktive Spezies produzieren kann, von denen dann eine oder mehrere Karzinogenen sind. So zeigt die untere Hälfte von Schema 1 einige der Verbindungen, die beim stoffwechselbedingten Abbau von Naphthalin im Menschen

entstehen; das Reaktionsschema zeigt Pfade, die zu reaktiven Spezies wie Chinon oder Arenepoxiden führen.^[141] Reaktive Metaboliten können karzinogene Effekte herbeiführen, indem sie kovalent an Biomoleküle wie Proteine und DNA binden, oder indem sie oxidativen Stress ausüben.^[142] Kokel et al. nutzten einen Satz von genetischen Mutanten in Kombination mit einem Apoptose-Assay und konnten so das Protein CED-3 als das wahrscheinlichste Ziel der apoptose-hemmenden Substanzen ausmachen.^[140] In-vitro-Experimente zeigten, dass nicht Naphthalin selbst die Aktivität des CED-3 (bzw. seines menschlichen Gegenstücks, der Kaspase-3) herabsetzt, sondern Naphthochinon, ein Stoffwechselprodukt des Naphthalins^[141] (Schema 1).^[140] Chinon-artige Derivate des Benzols und des Toluols setzten ebenfalls die Aktivität der menschlichen Kaspase-3 in vitro herab.^[130] Obwohl weiterhin Unsicherheiten bezüglich des Mechanismus bestehen, nach dem die in Schema 1 aufgeführten Substanzen eine Apoptose verhindern – weitere Metaboliten sowie biologische Ziele können beteiligt sein^[141,142] –, demonstriert diese Arbeit doch die potentielle Nützlichkeit von *C. elegans* als einfachen Modellorganismus für Studien, die sich mit den Wechselwirkungen von verschiedenen Klassen von Verbindungen mit der Apoptose-Maschinerie befassen.^[130,140]

3.4.3. Wirkstofffindung mittels *C. elegans*

Die Leichtigkeit, mit der sehr große Populationen von Würmern erhalten und manipuliert werden können, macht *C. elegans* zu einem potentiell nützlichen Organismus für das Hochdurchsatz-Screening zur Wirkstoffentwicklung und -auffindung.^[28,285] Ein entscheidender Aspekt beim Wirkstoff-Screening ist die Bioverfügbarkeit der Substanzen in *C. elegans*, denn damit die Substanzen die potentiellen Zielstrukturen erreichen können, müssen sie zunächst rein physikalisch in den Körper des Wurms gelangen. Die Oberhaut sowie das Verdauungssystem des Wurms bilden eine beträchtliche physikalische Barriere für viele chemische Stoffe.^[143] Eine mögliche Strategie, die auf eine selektive Permeabilität der Oberhaut baut, wäre die Züchtung von mutierten *C. elegans*-Strängen, die eine kompromittierte Oberhaut aufweisen, in allen anderen Belangen jedoch gesund wären;^[110] diese Strategie wurde bislang jedoch nicht verfolgt.

Um die Bioverfügbarkeit zahlreicher Moleküle im Wurm zu charakterisieren, bestimmten Burns und Mitarbeiter den Grad der Anreicherung von über 1000 wirkstoffartigen Substanzen sowie deren Metaboliten im Körper von *C. elegans*.^[143] In Schema 2 sind die fünf häufigsten Strukturmotive von Molekülen gezeigt, die sich in *C. elegans* anreicherten, sowie die fünf häufigsten Strukturmotive der Substanzen, die sich nicht im Körper von *C. elegans* anreicherten. Beinahe die Hälfte der bioakkumulierenden Substanzen enthält eines der Strukturmotive, die in der linken Spalte von Schema 2 aufgeführt sind, und beinahe die Hälfte der nicht-bioakkumulierenden Substanzen enthält eines der Strukturmotive, die in der rechten Spalte von Schema 2 aufgelistet sind.^[143] Burns und Mitarbeiter entwickelten ein computergestütztes Modell, um auf Basis der Molekülstruktur vorherzusagen, ob sich eine Verbindung in *C. elegans* anreichern wird. Das Modell ist frei zugänglich.^[143] Diese Arbeit wird dazu beitragen, Prioritäts-



A: C, N, O oder S

Schema 2. Strukturmotive von Molekülen, die sich in *C. elegans* anreichern – oder auch nicht.^[143]

listen von Molekülen im Hinblick auf Wurm-basierte Screenings zu erstellen, und somit die Wahrscheinlichkeit erhöhen, Wirkstoffe mithilfe von *C. elegans* aufzuspüren.

3.5. *C. elegans* als Modell für parasitäre Würmer

Einer kleiner Bereich der Forschung zur menschlichen Gesundheit, in der *C. elegans* von besonderem Nutzen sein kann, beschäftigt sich mit der Studie parasitärer Würmer. Zu den parasitären Würmern (Helminthe) gehören Nemathelminthe (Rundwürmer) und Plathelminthe (Plattwürmer; Saugwürmer und Bandwürmer).^[144] Auch wenn *C. elegans* nicht parasitär ist, so ist er doch mit parasitären Würmern evolutionär verwandt,^[145] und könnte daher als nützlicher Modellorganismus sowohl zum Verständnis der Biologie der Helminthe als auch zur Entwicklung von Anthelminthika – Wirkstoffen zur Behandlung von helminthischen Infektionen – sowie von Impfstoffen beitragen.^[146,147]

Die Relevanz von *C. elegans* im Bezug auf parasitäre Spezies ist ein wichtiger Punkt: Vorläufige Genomdaten für zahlreiche Spezies infektiöser Helminthe (einschließlich des Nematoden *Trichinella spiralis*, des zur Familie der Filiariidae gehörenden *Brugia malayi*, des Bandwurms *Taenia solium* und der Blutsaugwürmer *Schistosoma mansoni* und *Schistosoma japonicum*)^[145] ermöglichen genetische Vergleiche. Trotz vorhandener genetischer Differenzen – hauptsächlich in Genen, die mit den parasitären Eigenschaften zusammenhängen^[148] – scheint *C. elegans* parasitären Würmern so ähnlich zu sein wie diese sich untereinander ähnlich sind.^[146,147,149] In Bezug auf die Entwicklung eines Breitband-Anthelminthikums scheint *C. elegans* so gut geeignet zu sein wie jeder andere Wurm.^[146] Die relativ enge evolutionäre Beziehung zwischen *C. elegans* und parasitären Würmern, verbunden mit der auffälligen Ähnlichkeit von *C. elegans* zu anderen Würmern (speziell anderen Nematoden) bezüglich Körperbau und Entwicklungsprozess, legt nahe, dass Gene verschiedener

Spezies, die sequenzmäßig überlappen, auch ähnliche Funktionen aufweisen.^[147] Funktionelle Überlappung ist wichtig: Für die Entwicklung von Anthelminthika wird es beispielsweise von Vorteil sein, wenn Wirkstoffe in *C. elegans* und in parasitären Würmern die gleichen physiologischen Effekte haben.

3.5.1. Helminthische Infektionen: vernachlässigte Krankheiten

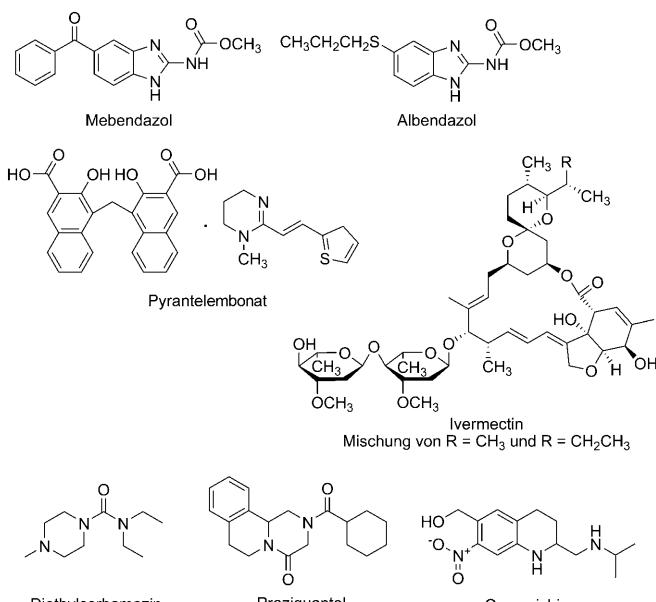
Mehr als zwei Millionen Menschen weltweit sind mit parasitären Würmern infiziert. Diese Infektionen sind eine bedeutende Ursache von Krankheit und Sterblichkeit beim Menschen, vor allem in Entwicklungsländern. Die drei am häufigsten vorkommenden helminthischen Infektionen werden verursacht von Spulwürmern (*Ascaris lumbricoides*), Peitschenwürmern (*Trichuris trichiura*) und Hakenwürmern (*Necator americanus* und *Ancylostoma duodenale*).^[150] Diese Würmer haben in den Entwicklungsregionen Afrikas, Asiens und Lateinamerikas eine hohe Prävalenz.^[144] In Tabelle 5 sind die im Bezug auf die Anzahl der Infektionen problematischsten Spezies parasitärer Würmer aufgeführt.

Tabelle 5: Globale Prävalenz helminthischer Infektionen im Menschen.

Helminth	Infizierte Personen ^[144] (in Millionen)
<i>Ascaris lumbricoides</i> Spulwurm; Übertragung über das Erdreich	807
<i>Trichuris trichiura</i> Peitschenwurm; Übertragung über das Erdreich	604
<i>Necator americanus</i> <i>Ancylostoma duodenale</i> Hakenwürmer; Übertragung über das Erdreich	576
<i>Schistosoma haematobium</i> <i>Schistosoma mansoni</i> <i>Schistosoma japonicum</i> Saugwürmer	207
<i>Wuchereria bancrofti</i> <i>Brugia malayi</i> lymphatische Filariose; Infektion verursacht schmerzhafte Schwellungen der Beine und der Genitalien (Elephantiasis)	120
<i>Strongyloides stercoralis</i> Fadenwurm; Übertragung über das Erdreich	30–100
<i>Clonorchis sinensis</i> <i>Opisthorchis viverrini</i> <i>Paragonimus</i> spp. <i>Fasciolopsis buski</i> <i>Fasciola hepatica</i> Saugwürmer; Übertragung über Nahrungsmittel	> 40
<i>Onchocerca volvulus</i> Blindfilarie; trägt endosymbiotische Bakterien in sich, die Flussblindheit auslösen	37
<i>Loa loa</i> Wanderfilarie, auch Augenwurm, Filarie	13
<i>Taenia solium</i> Schweinebandwurm	0.4
<i>Dracunculus medinensis</i> Medinawurm, auch Guineawurm, Filarie	0.01

Moderate oder schwere helminthische Infektionen haben einen dramatischen Effekt auf die Lebensqualität der infizierten Person. Die Schwere der Erkrankung hängt von der Anzahl der Würmer ab, mit denen der Patient infiziert ist.^[144] Infektionen können Mängelscheinungen (einschließlich Anämie, Vitaminmangel und Proteinverlust), bleibende Gewebeschäden, vermindertes Wachstum, reduzierte Fitness sowie Defizite in Wahrnehmung und Gedächtnis hervorrufen.^[144] Einige Wurmspezies setzen dem Wirt schwer zu: lymphatische Filariose nach Infektion mit Filarien verursacht ein Anschwellen von Beinen und Genitalien; Onchozerkose nach Infektion mit dem Rundwurm *Onchocerca volvulus* kann Blindheit hervorrufen.^[144] Zudem können helminthische Infektionen den Ausbruch sowie den Fortschritt anderer Krankheiten wie HIV/AIDS und Malaria begünstigen.^[144]

Trotz der Tatsache, dass helminthische Infektionen eines der häufigsten Krankheitsbilder beim Menschen darstellen, gibt es nur relativ wenige Anthelminthika.^[151] Vom Benzimidazol abgeleitete Substanzen (Mebendazol und Albendazol), Pyrantelemonat und Ivermectin sind Breitband-Anthelminthika. Diethylcarbamazin wird gegen einige Nematoden der Gattung *Filaridae* eingesetzt, Praziquantel und Oxamnichin gegen Würmer der Gattung *Schistosoma*.^[152] In Schema 3 sind die chemischen Strukturen dieser Wirkstoffe



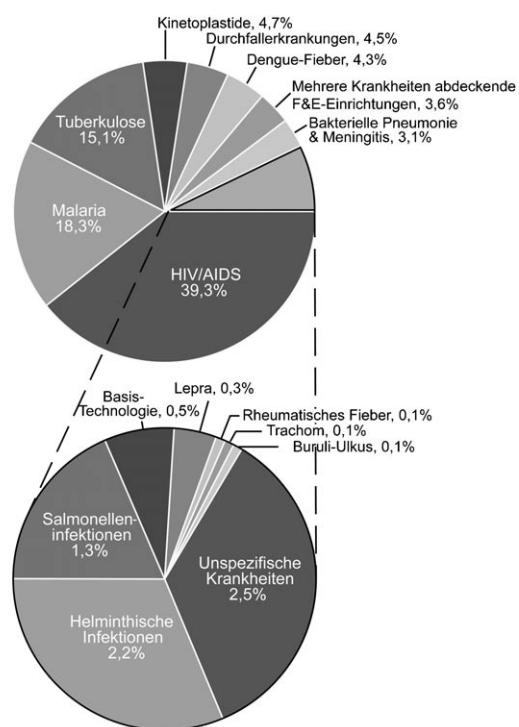
Schema 3: Anthelminthika gegen Infektionen mit parasitären Würmern beim Menschen.

gezeigt. Resistenzen gegen anthelminthische Arzneimittel – ein weit verbreitetes Problem bei Haustieren^[152] – treten auch bei Würmern auf, die die Menschen befallen.^[144] Die in Entwicklungsländern zur Kontrolle von helminthischen Infektionen gängige Praxis, ein einziges Medikament periodisch an alle Mitglieder einer Population oder Subpopulation (z. B. Schulkinder)^[144, 151] auszugeben, könnte zu dem anwachsenden Problem anthelminthischer Resistenzen beitragen.^[144, 152, 153] Es besteht daher die offensichtliche und drin-

gende Notwendigkeit, die Anzahl an Möglichkeiten zur Behandlung helminthischer Infektionen zu vergrößern.

3.5.2. *C. elegans*: ein Modellparasit?

Die Forschung an Helminthen ist mit zwei beträchtlichen Herausforderungen konfrontiert. Erstens, für die Forschung an Helminthen werden weit weniger finanzielle Mittel bereitgestellt als für andere weltweite Gesundheitsprobleme. Die Verteilung der globalen Investitionen in Forschung und Entwicklung an vernachlässigten Krankheiten für das Fiskaljahr 2008 ist in Abbildung 3 zusammengefasst. Die Fi-



Globale Finanzierung der F&E an vernachlässigten Krankheiten im Fiskaljahr 2008
(Gesamtinvestitionen: 3,09 Mrd. USD)

Abbildung 3. Überblick über die weltweiten Investitionen in Forschung und Entwicklung an vernachlässigten Krankheiten im Fiskaljahr 2008.^[154]

nanzierung der Forschung an Helminthen betrug lediglich 2,3% der globalen Ausgaben.^[154] (Die kumulierten Forschungsausgaben für HIV/AIDS, Malaria und Tuberkulose beliefen sich auf > 70% der Gesamtinvestitionen).^[154] Zweitens, es ist schwierig und teuer, mit parasitären Würmern zu arbeiten, da parasitäre Würmer nicht ohne Wirt aufgezogen werden können. Da das Arbeiten mit *C. elegans* im Gegensatz dazu einfach und auch kostengünstig ist, können diese Schwierigkeiten mithilfe des Wurms umgangen werden.

Der grundlegende Vorteil, den *C. elegans* in der Rolle des Modellparasiten besitzt, liegt in der experimentellen Manipulierbarkeit. Die biologischen, chemischen und physikalischen Werkzeuge und Techniken, die für *C. elegans* etabliert sind, lassen sich nicht ohne weiteres auf die Forschung an

parasitären Würmern übertragen.^[155] Die Lebenszyklen parasitärer Würmer sind häufig kompliziert und beinhalten einen oder mehrere Wirtorganismen.^[148] Parasitäre Würmer leben typischerweise nur während eines Teils ihrer Entwicklungszeit außerhalb eines Wirts (Hakenwürmer leben beispielsweise nur als Embryo und zu Beginn des Larvenstadiums außerhalb eines menschlichen Wirts)^[151] und sind daher nicht in allen Entwicklungsstadien zugänglich. Aufgrund der Schwierigkeit, einfache phänotypische Beobachtungen an Würmern zu machen, die sich innerhalb eines Wirts befinden, sind Phänotyp-basierte Assays auf diejenigen Entwicklungsstadien beschränkt, in denen der Wurm außerhalb eines Wirts überleben kann.^[156] Da zudem keine Methoden zur Kultivierung parasitärer Würmer existieren, ist es auch nicht möglich, isogene Bestände von Mutanten parasitärer Würmer anzulegen. Dagegen ist es im Falle von *C. elegans* durchaus möglich, Würmer zu kultivieren, in verschiedenen Entwicklungsstadien zu beobachten und auch isogene Bestände von Mutanten anzulegen. Zudem trägt auch die große Menge an zusammengetragenen Wissen über *C. elegans* zu seiner Nützlichkeit im Hinblick auf die Forschung an Helminthen bei. Das Vorhandensein einer guten Genomannotation für *C. elegans* war hilfreich bei der Identifikation von Genen und deren Funktion innerhalb des Genoms von parasitären Würmern.^[157–159]

3.5.3. *C. elegans* und die Entwicklung von Anthelminthika

C. elegans hat bereits eine bedeutende Rolle bei der Eröffnung molekularer Aspekte anthelminthischer Aktivität und Resistenz gespielt. Genetische Arbeiten an *C. elegans* haben gezeigt, dass Benzimidazol und verwandte Verbindungen wirken, indem sie den Aufbau der Mikrotubuli aus β -Tubulin stören. Später isolierten Kwa und Mitarbeiter β -Tubulin-Gene aus Benzimidazol-sensitiven und Benzimidazol-resistenten Populationen des Schafe befallenden Rundwurms *Haemonchus contortus*. Der hauptsächliche Unterschied zwischen den Genen der sensiblen und der resistenten Population bestand im Austausch von Phenylalanin gegen Tyrosin an Position 200 der vorhergesagten Aminosäuresequenz in den Genen der resistenten Würmer.^[156] Nachdem die Autoren bestätigt hatten, dass es möglich ist, funktionsfähiges β -Tubulin von *H. contortus* in *C. elegans* zu exprimieren, zeigten sie, dass die Mutation von Phenylalanin zu Tyrosin an Position 200 im vom Parasiten stammenden β -Tubulin ausreichte, um eine Benzimidazol-Resistenz in *C. elegans* zu erzeugen.^[156]

Kaminsky und Mitarbeiter nutzten *C. elegans* zur Bestimmung des Wirkmechanismus einer neuen Klasse von potentiellen Anthelminthika – Aminoacetonitriderivaten (AADs).^[161] Tests in parasitären Larven sowie in mit Würmern infizierten Säugetieren (Mäusen und Schafen) führten zur Identifikation mehrerer AADs als vielversprechende Wirkstoffe. Wird *C. elegans* diesen Substanzen ausgesetzt, wird eine Mischung von Phänotypen erhalten, die so nicht als Folge der Verabreichung existierender Anthelminthika beobachtet wurden – Hyperkontraktion der Körpermuskeln, krampfartige Kontraktionen des Pharynx, defekte Häutung sowie nekrotischer Zelltod. Es gelang zudem, diese AADs in Strängen von *C. elegans* zu testen, die gegen Ivermectin,

Benzimidazol und Levamisol resistent waren. Diese Würmer waren trotzdem sensitiv gegen AADs. Die Resultate deuten darauf hin, dass sich der Wirkmechanismus der AADs deutlich von denen existierender Anthelminthika unterscheidet. Ein genetisches Screening identifizierte AAD-resistente *C. elegans*-Mutanten, die die Mutation in einer spezifischen Unterfamilie der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) tragen.^[161] Bedeutsamerweise gelang es den Autoren, die Relevanz dieses Mechanismus für parasitäre Würmer zu verifizieren, indem sie AAD-resistente Larven von *H. contortus* selektierten. Mittels Polymerasekettenreaktionen wurde bestätigt, dass AAD-resistente *H. contortus*-Spezies die Mutation in einem nAChR trugen, der zu einem der in *C. elegans* identifizierten Rezeptoren homolog ist.^[161]

Wie könnte *C. elegans* darüber hinaus zur Erforschung parasitärer Würmer beitragen? *C. elegans* könnte die Identifikation neuartiger molekularer Zielstrukturen in der Entwicklung von Anthelminthika erleichtern, indem er die Bestimmung der Funktion potentieller Zielstrukturen vereinfacht. Um effektiv zu sein, müssen anthelminthische Wirkstoffe eine physiologische Änderung im Wurm herbeiführen, die entweder den Tod des Wurms (direkt oder indirekt) oder das Verlassen des Wirts durch den Wurm zur Folge hat.^[144] Bereits existierende Anthelminthika haben eine Vielzahl von physiologischen Effekten, einschließlich der Störung der Mikrotubulinbildung (Benzimidazol), der Paralyse des Pharynx (Ivermectin) sowie der Unterbindung der Nukleinsäuresynthese (Oxamnichin).^[152] Indem in *C. elegans* die Funktion von Proteinen untersucht wird, die in Würmern generell konserviert sind, sollte die Identifikation vielversprechender Zielstrukturen für die Anthelminthikaentwicklung möglich sein.^[158, 162, 163]

3.5.4. Parasit-Wirt-Beziehungen

Parasitäre Würmer haben Schutzstrategien entwickelt, um die Immunantwort des Wirts zu umgehen oder sogar zu kontrollieren.^[164] Innerhalb des Wirts setzen die Würmer Moleküle frei, die entweder direkt etwaige Aktivitäten des Immunsystems blockieren oder die Aktivität des Immunsystems modulieren, indem sie in Signaltransduktionspfade eingreifen.^[164] So setzen parasitäre Würmer beispielsweise Cystatine frei – Cystein-Proteaseinhibitoren – welche die Produktion von Antigenen unterbrechen und so die Proliferation von T-Zellen unterbinden. Cystatine verändern zudem auch die Zytokin-Signalübertragung im Wirt.^[164] Vom Parasiten ausgeschiedene Substanzen scheinen auch die Aktivität der Makrophagen herunterzuregeln und die Produktion von NO heraufzuregeln, wodurch das Wachstum der Lymphozyten unterbunden wird.^[164] Diese Fähigkeit der Parasiten, das Immunsystem des Wirts zu modulieren, sorgt dafür, dass parasitäre Infektionen über Jahre hinweg bestehen können. (Interessanterweise stellt die Inokulation von Hakenwürmern beim Menschen eine effektive Behandlung von Morbus Crohn dar – einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung. Möglicherweise wird der therapeutische Effekt durch die Unterdrückung des Immunsystems durch den Parasiten erreicht.)^[165]

Obgleich *C. elegans* ein freilebender Wurm ist, kann er dennoch dazu beitragen, die Parasit-Wirt-Beziehungen bei helminthischen Infektionen besser zu verstehen. Im Menschen lösen parasitäre Infektionen eine Typ-2-Immunantwort aus, die sich in einem von T-Helferzellen Typ-2 (Th2) erzeugten, charakteristischen Satz molekularer Reaktionen äußert.^[166] Tawill und Mitarbeiter zeigten, dass sowohl Extrakte von *B. Malayi* (einem parasitären Rundwurm) als auch Extrakte von *C. elegans* eine Typ-2-Immunantwort in Mäusen auslösen.^[166] *C. elegans* scheint daher ein relevantes Modellsystem für das Auffinden molekularer Wechselwirkungen darzustellen, die Typ-2-Immunantworten hervorrufen. Die Behandlung von Mäusen mit fraktionierten Extrakten von *C. elegans* ergab Hinweise drauf, dass die Glykoproteine der Rundwürmer beim Auflösen dieser charakteristischen Immunantwort eine bedeutende Rolle spielen.^[166]

C. elegans könnte auch bei der Entwicklung von Impfstoffen gegen parasitäre Helminthe eingesetzt werden. Unter den Nematoden sind die auf der Oberfläche der Oberhaut exprimierten Proteine und Glykoproteine in hohem Maße konserviert.^[162, 167] Diese Moleküle sind logische Zielobjekte in der Impfstoffforschung, da sie dem Wirtorganismus zugewandt sind. Die an der Oberfläche exprimierten Moleküle ändern sich mit dem Entwicklungsstadium und auch als Reaktion auf Umwelteinflüsse.^[167] Die Studie von temporären oder räumlichen Mustern der Bildung dieser Moleküle in *C. elegans* könnte bei der Selektion von Antigenen für die Impfstoffentwicklung behilflich sein.^[162] Zudem ist es eventuell möglich, vom Parasiten stammende Antigene in *C. elegans* zu exprimieren und so zu untersuchen.^[168]

3.5.5. Ausblick zur Erforschung von Infektionen mit parasitären Würmern mit *C. elegans*

Es gibt natürlich Grenzen für die Verwendung von *C. elegans* in der Erforschung von Parasiten, denn wahrscheinlich existieren Gene und chemische Signalübertragungen, die ausschließlich in parasitären Würmern vorkommen.^[146, 148] Zudem wird es immer notwendig sein, die Relevanz der mit *C. elegans* erhaltenen Ergebnisse im Bezug auf parasitäre Spezies zu validieren. Validierung ist jedoch experimentell einfacher als die Entdeckung an sich.

Die Einfachheit, mit der *C. elegans* im Labor eingesetzt werden kann, sollte Chemiker dazu ermutigen, und darüber hinaus auch in die Lage versetzen, Forschung mit Bezug zur helminthischen Biologie zu betreiben. *C. elegans* kann auch als experimentelle „Einstieghilfe“ für Chemiker dienen, die an der Arbeit mit parasitären Würmern interessiert ist. Alles in allem bietet *C. elegans* Chemikern einen ausgezeichneten Ausgangspunkt für die Erforschung einer der wichtigsten Klassen von Pathogenen weltweit.

4. Welche Mittel stehen Chemikern zur Erforschung des Wurms zur Verfügung?

Forschung mit dem Ziel, chemische Details mit biologischen und organismischen Phänomenen in *C. elegans* in Verbindung zu bringen, braucht Methoden zur Bestimmung

organismischer Phänotypen, Methoden zur Bestimmung molekularer Phänotypen und Methoden zur Erzeugung chemischer, physikalischer und biologischer Perturbationen im Wurm. Dieser Abschnitt beschreibt derartige Methoden. Wir legen einen Schwerpunkt auf mikrofluidische Instrumente, die in der Forschung mit und an *C. elegans* immer beliebter werden.^[109,169–198]

4.1. Mikroinstrumente zur Manipulation und Immobilisierung des Wurms

Mikrofluidische Instrumente haben vier prinzipielle Eigenschaften, die für die Forschung an *C. elegans* besonders hilfreich sind: 1) Sie sind mit der Applikation einer weiten Bandbreite von Stimuli und der Beobachtung sowie der Quantifizierung einer großen Bandbreite von Phänotypen vereinbar; 2) sie erzeugen eine wohldefinierte Umgebung für die Würmer und verringern so die experimentelle Unsicherheit in Bezug auf feine Änderungen der chemischen und physikalischen Umgebung; 3) sie sind entweder skalierbar (paralleles Beobachten mehrerer Würmer) oder für Hochdurchsatzexperimente geeignet (Beobachten vieler Würmer in rascher Folge); 4) sie besitzen Eigenschaften in einer für Würmer angebrachten Größe: adulte Würmer sind ca. 1 mm lang und 50 µm breit, und Kanäle dieser Abmessungen lassen sich problemlos herstellen.^[199,200]

Im Labor leben die Würmer auf der Oberfläche von Agar in mit Agar gefüllten Petrischalen (Abbildung 1a). Ein Bakterienrasen auf der Oberfläche des Agars stellt die Nahrungsquelle der Würmer dar. Während einfache (und nützliche) Beobachtungen an den Würmern in dieser Umgebung gemacht werden können, bedingen viele Experimente eine detailliertere Untersuchung. Erfreulicherweise erleichtert eine Anzahl von Instrumenten die Beobachtung des Wurms durch das physikalische Immobilisieren des Körpers.

Geeignete Instrumente zur Untersuchung des Wurms sind mikrofluidische Instrumente, die mittels Softlithographie aus dem Elastomer Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt werden.^[199,200] PDMS ist gut zur Fertigung derartiger Instrumente geeignet: Es ist bis 230 nm transparent (und daher mit konventioneller Lichtmikroskopie vereinbar), und es ist nicht-toxisch und zudem durchlässig für Gase (und somit kompatibel mit lebenden Organismen).^[200] *C. elegans* kann auf hydratisierten Oberflächen mit Luftkontakt oder in Flüssigkeiten getaucht leben. PDMS-Instrumente zur Erforschung des Wurms können daher entweder aus auf einer Oberfläche aufgebrachten, mit Luft gefüllten Mikrokanälen^[181,190] oder aus geschlossenen, mit Flüssigkeit gefüllten Mikrokanälen bestehen.^[173,184,192]

4.1.1. Immobilisierung und Abbildung des Wurms in mikrofluidischen Apparaturen

Für viele Experimente mit *C. elegans* ist es wünschenswert, den lebendigen Wurm immobilisieren zu können, ohne ihn dabei zu verletzen. Die grundlegende Motivation zur Immobilisierung des Wurms ist die Vereinfachung oder das Ermöglichen der Beobachtung von gewebebezogenen, zel-

lulären sowie subzellulären Phänotypen in intakten Würmern, einschließlich (aber nicht beschränkt auf) 1) Gewebe-morphologie (z. B. Muskeln, Organe) innerhalb des Wurm-körpers, 2) Exprimierungsgrad eines Proteins sowie seiner Lokalisierung mittels genetisch codierter Fluoreszenzrepor-ter (z. B. grün fluoreszierendem Protein, GFP),^[201] 3) Aktivi-tät von Neuronen mittels Aufzeichnung der Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentrationen durch fluoreszierende Indikatoren^[202] sowie 4) biochemische Zusammensetzung des Körpergewebes mittels fluoreszierender organischer Farbstoffe. Zusätzlich ermöglicht die Immobilisierung die Anwendung lasergestützter Mikrochirurgie zum Entfernen spezifischer Gewebe, ohne dem Körper des Tieres weitere Schäden zuzufügen.^[203,204]

Durch den Einsatz paralytischer Wirkstoffe wie Natrium-azid (einem Stoffwechselinhibitor) lassen sich große Wurm-populationen (> 1000) zeitgleich immobilisieren;^[205] für einige Experimente ist es jedoch besser, lebende, nicht-anästhetisierte Würmer einzusetzen – beispielsweise bei der Be-obachtung neuronaler Aktivität mittels Calcium-Bildge-bung.^[202] Eine Lösung besteht in der Verwendung von Cy-anacrylat-Klebstoffen zur Immobilisierung der Würmer auf Agarose; dieser Ansatz ermöglichte eine FRET-basierte Calcium-Bildgebung.^[202,206]

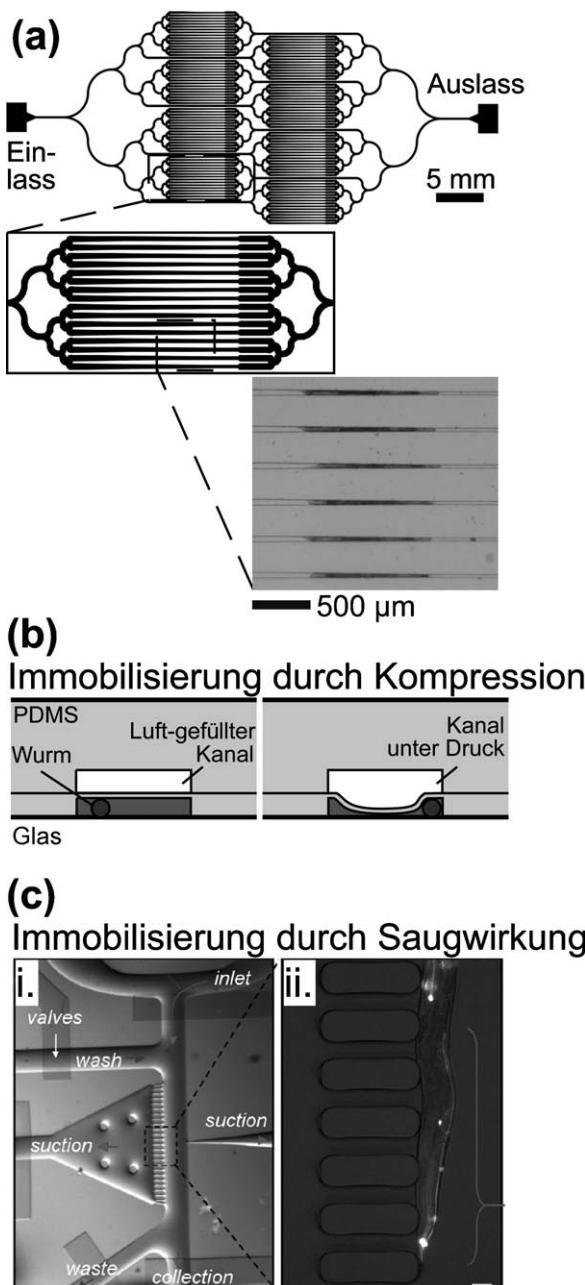
Kürzlich wurde die Immobilisierung der Würmer durch einen neuen Ansatz erreicht, nämlich der Verwendung von aus PMDS hergestellten, mikrofluidischen Instrumen-ten.^[172–174,182,184,188,192,193,195,197] Diese Instrumente machen sich eine Bandbreite von Strategien zur Immobilisierung zunutze. Generell existiert eine Korrelation zwischen der Einfachheit, mit der das Gerät hergestellt und betrieben werden kann, und dem Grad an Immobilisierung, die mit dem Gerät erreicht werden kann.

Chronis und Mitarbeiter veröffentlichten ein einfaches mikrofluidisches Instrument zur Immobilisierung von Würmern, die sogenannte „Wurmfaile“.^[173,195] Diese Falle besteht aus einer einzelnen Mikrokammer, deren Weite etwas größer und deren Höhe etwas kleiner ist als der Durchmesser des Wurms. Der Wurm kann Vorwärts- und Rückwärtsbewe-gungen ausführen, die den Körperbewegungen eines sich frei bewegenden Wurms entsprechen, doch er kann sich nicht effektiv fortbewegen, da die Kammer den Körper geringfügig in einer Dimension zusammendrückt. Der Grad an Immobi-lisierung, der mithilfe der Falle erreicht wird, reicht für die Calcium-Bildgebung an einzelnen Neuronen aus. Da der Wurm in dieser Kammer eine (limitierte) Beweglichkeit be-sitzt, kann darüber hinaus die neuronale Aktivität mit dem lokomotorischen Verhalten korreliert werden.

Wir haben ein Instrument entwickelt, das eine Reihe von mikrofluidischen „Wurmklammern“ aufweist – konisch zu-laufende Kanäle, in denen jeweils einzelne Würmer einge-führt und so physikalisch immobilisiert werden können.^[184] Abbildung 4 zeigt den Aufbau des Instruments sowie ein Mikrobild eines immobilisierten Wurms. Zum Betrieb der Apparatur muss lediglich eine die Würmer enthaltende Sus-pension am Einlass platziert und eine Saugvorrichtung am Auslass angeschlossen werden; aufgrund der Geometrie der Apparatur fängt automatisch jede Klemme einen einzelnen Wurm.^[184] Eine Variante der Apparatur mit 128 Klemmen

ermöglichte die zeitgleiche Beobachtung von über 100 Tieren. Die Wurmklammern haben sich als nützlich für die Immobilisierung der Würmer zum laservermittelten Abtrennen neuronaler Axone^[180] und Synapsen^[169] erwiesen. In diesen Experimenten ermöglichten die Klemmen auch eine Zeitrafferaufnahme des neuronalen Wachstums in immobilisierten Tieren.^[169,180] In einer verwandten Strategie entwickelten Stirman und Mitarbeiter ein mikrofluidisches Instrument, das automatisch Würmer in einzelne Kanäle verteilt, in denen diese teilimmobilisiert werden (wie in der oben beschriebenen Wurmfalle). Das Instrument konnte genutzt werden, um die neuromuskuläre Aktivität mehrerer Würmer gleichzeitig zu beobachten und zu quantifizieren.^[198]

Andere nicht-invasive mikrofluidische Verfahren zur Immobilisierung nutzen Saugwirkung,^[192] Druck^[172,182,188]



oder eine Kombination von beiden.^[193] In Abbildung 4b,c sind diese Herangehensweisen dargestellt. Durch diese Methoden werden die Würmer in einem für lasergestützte Mikrochirurgie sowie für subzelluläre Bildgebungsverfahren ausreichendem Maße immobilisiert.^[182,192,193] Krajniak und Mitarbeiter verwendeten Pluronic F127, ein Blockcopolymer, das nahe Raumtemperatur einen reversiblen Sol-Gel-Übergang erfährt, um Würmer reversibel in einer mikrofluidischen Apparatur zu immobilisieren, indem sie eine Lösung des Polymers in mit Würmern besetzte Kammern fließen ließen, um dann durch Erhöhen der Temperatur das Polymer in der Umgebung des Wurms erstarren zu lassen.^[197]

Obgleich die physikalische Immobilisierung sämtliche Körperbewegungen des Wurms einfriert, behindert sie nicht die Bewegung von Strukturen innerhalb des Wurmkörpers – die Muskeln entlang der Körperwand sowie die pharyngalen Muskeln können sich noch kontrahieren. Diese Eigenschaft könnte von Vorteil sein, wenn beispielsweise die Beobachtung der Muskelbewegung des Pharynx von Interesse ist. Wird *C. elegans* tiefen Temperaturen (4 °C) ausgesetzt oder mit Kohlendioxid behandelt, folgt die vollständige Paralyse des Wurms. Es ist daher möglich, Würmer durch den Einsatz einer zweiten Lage mikrofluidischer Kanäle zu immobilisieren, die sich passgenau über den die Würmer beherbergenden Kanälen befindet und durch die dann die kühlende Flüssigkeit^[174] oder gasförmiges Kohlendioxid^[172] geleitet wird. Ein zusätzlicher Vorteil der Immobilisierung mittels Kohlendioxid ist das gleichzeitige Entfernen von Sauerstoff aus dem System, wodurch das Photobleichen von Fluoreszenzmarkern im Wurm gemindert wird.^[172,207]

Mit Ausnahme der Klebe-Methode sind alle beschriebenen mikrofluidischen Methoden zur Immobilisierung reversibel und erlauben ein Freisetzen der Würmer zur weiteren Analyse. Wir konnten beobachten, dass diejenigen Würmer, die aus der 128er-Wurmklammer nach erfolgter Immobilisierung freigesetzt wurden, eine ähnliche Lebenserwartung

Abbildung 4. Mikrofluidische Methoden zur Immobilisierung von *C. elegans*. a) Eine Apparatur bestehend aus einer Anordnung von 128 Wurmklammern für die zeitgleiche schnelle (< 15 Minuten), temporäre, nicht-invasive Immobilisierung von über 100 Würmern für hochauflösende Mikroskopie und laservermittelte Mikrochirurgie. (Wiedergabe nach Lit. [184].) b) Aus PMDS gefertigte Apparatur mit zwei Lagen von Kanälen, die durch eine dünne PMDS-Membran getrennt sind. Die Würmer werden immobilisiert, indem die obere Lage von Kanälen mittels Luft unter Druck gesetzt wird. Durch den Druck wird die PMDS-Membran ausgelenkt und immobilisiert so die Würmer. (Wiedergabe nach Lit. [172].) c) Durch Saugwirkung mittels einer Anordnung von parallelen Mikrokanälen werden die Würmer an die Kanäle gezogen und so immobilisiert. Die linke Seite (i) zeigt eine Anordnung von Mikrokanälen zur Immobilisierung der Würmer im Zentrum des Bildes (inlet – Einlass, valves – Ventile, wash – Waschen, suction – Saugwirkung, waste – Abfall, collection – Sammeln). Mehrere ventilgesteuerte Mikrokanäle führen zu dieser Kammer hin und von ihr weg. Diese Kanäle ermöglichen das Einbringen der Würmer in den Immobilisierungsraum sowie das Sortieren der Würmer nach erfolgter Immobilisierung (Maßstab: 100 µm). Das rechte Bild (ii) zeigt eine Nahaufnahme eines Wurms, der mittels Saugwirkung an der Anordnung von Mikrokanälen immobilisiert wurde (Maßstab: 10 µm). (Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [192], 2007 National Academy of Science, USA.)

aufwiesen wie Artgenossen, die nicht zwischenzeitlich immobilisiert wurden.^[184] Nach erfolgter Immobilisierung können die Würmer durch pneumatische Ventile nach Phänotypen sortiert und für weitere „On-Chip“^[192] oder „Off-Chip“-Studien^[174,178] in nachgelagerte Behälter geleitet werden.

Als Alternative zur Beobachtung von Würmern und anderen Objekten mittels konventioneller Mikroskopie entwickelten Yang und Mitarbeiter ein „optofluidisches Mikroskop“ – eine Linsen-freie Methode zur Abbildung der Würmer, bei der mikrofluidische Kanäle direkt auf der Oberfläche eines CCD- oder CMOS-Sensorarrays aufgebracht werden.^[179,183] Die einfachste Methode zur Abbildung eines Objekts ohne Mikroskop mittels CCD- oder CMOS-Sensorarrays ist das Aufzeichnen einer direkten Projektion des Objekts auf dem Array. Bei dieser Technik ist die Auflösung des resultierenden Bildes durch die Abmessungen der Pixel im Sensorarray limitiert. Yang und Mitarbeitern konnten jedoch eine Methode zur Umgehung dieser Limitierung entwickeln. In dem von ihnen vorgestellten optofluidischen Mikroskop erreicht das Licht nur durch eine Reihe kleiner Löcher ($\leq 1 \mu\text{m}$ im Durchmesser) in einer dünnen Metallplatte das Array. Die Lochreihen sind diagonal auf dem Boden der mikrofluidischen Kanäle angeordnet, und in Querrichtung der Kanäle sind die Löcher um die Hälfte ihres Durchmessers versetzt. In Längsrichtung der Kanäle sind die Löcher derart voneinander getrennt angebracht, dass jedes Loch mit einem einzelnen Pixel des Sensorarrays verbunden ist. Diese geometrische Anordnung ermöglicht es, ein Bild des Forschungsobjekts basierend auf den Signalen des Sensorarrays zu konstruieren, nachdem das Objekt entlang des Kanals über die diagonale Reihe von Löchern hinweg gewandert ist.^[179,183] In dieser Anordnung ist die räumliche Auflösung nicht durch die Größe der Pixel, sondern durch die Größe der Löcher festgelegt. Eine Limitierung des optofluidischen Mikroskops ist es, dass keine sich bewegenden Objekte abgebildet werden können – es ist daher notwendig, die Würmer vor der Bildgebung zu paralysieren. Das Instrument kann allerdings die Würmer in rascher Folge von bis zu 40 Würmern pro Minute abbilden.^[183]

Es gibt ein kommerziell erhältliches Gerät zum schnellen Screening mit anschließender Sortierung von Würmern nach Phänotypen: Der COPAS-Biosorter (Union Biometrica, Holliston, MA) ermöglicht Durchfluszytometrie mit großen Objekten, einschließlich Würmern.^[209] Das COPAS-System kann optische Dichten und Vielfarbenfluoreszenzintensitäten als Funktion der Körperlänge eines Wurms messen, und kann somit Änderungen auf Gewebe-Ebene in Phänotypen identifizieren. Die räumliche Auflösung des COPAS-Systems ist zwar geringer als die standardmäßiger Mikroskope, doch sammelt dieses automatisierte System Phänotyp-bezogene Daten von Wurmpopulationen mit zehntausenden von Individuen.^[209]

4.1.2. Einsperren von Würmern in mikrofluidischen Instrumenten

Neben den Instrumenten zur Immobilisierung von Würmern existiert auch eine Vielzahl von Mikroapparaturen zum Einsperren von Würmern, ohne diese vollständig zu immo-

bilisieren. Diese Apparaturen lassen sich in zwei grundlegende Kategorien einteilen: 1) Apparaturen, die einzelne Würmer in individuellen Kammern^[109,172,188,192,197] oder Tröpfchen^[177,196,210–212] beherbergen, und 2) Apparaturen, die die Würmer in „Arena“-artigen Kammern beherbergen – das heißt, einzelne Kammern enthalten mehrere Würmer.^[170,171,181,187,189–191,194,195] In Abbildung 2 und Abbildung 5 sind Beispiele für derartige Instrumente gezeigt. Das Einsperren des Wurms in einer Mikroapparatur ermöglicht die Beobachtung von Merkmalen auf Organismusebene, hauptsächlich dem Verhalten und dem Überleben. Im Falle von *C. elegans* beinhaltet das Verhalten Lokomotion, Fressen, Ausscheidung, Eiablage und, falls Männchen in der Population vorhanden sind, Paarung.^[59] Es ist möglich, all diese Verhaltensweisen der Würmer und auch ihr Überleben in einem mikrofluidischen Instrument zu beobachten.

Mikroinstrumente ermöglichen es, die Ausbreitung von Wurmpopulationen auf die Fläche einzuzgrenzen, die von einem Mikroskopobjektiv erfasst werden kann, sodass sich eine ganze Population zeitgleich beobachten lässt. In Arena-artigen Kammern können einzelne Individuen mittels automatischer Zielverfolgungs-Software überwacht werden.^[213] Das Einsperren einzelner Würmer innerhalb einer festgelegten Fläche in einem mikrofluidischen Instrument erleichtert die Kultivierung und die räumliche Beobachtung von *C. elegans*.^[185,186] Apparaturen, die individuelle Würmer in Kammern und Tröpfchen beherbergen, erleichtern das Beobachten von Individuen über längere Zeiträume hinweg auch ohne Zielverfolgungs-Software. Wir haben ein mikrofluidisches Instrument entwickelt, das die Erhaltung einzelner Würmer in individuellen Kammern über deren gesamte adulte Lebenszeit hinweg ermöglichte (Abbildung 2).^[109] Mit dieser Apparatur waren wir in der Lage, Zusammenhänge zwischen altersbedingten Änderungen der Lokomotion, der Körpergröße und der Lebenserwartung herzustellen.^[109] In anderen Fällen ist es gelungen, Würmer vom Embryonenstadium bis zum Erwachsenenalter in einzelnen Tröpfchen aufzuziehen.^[177,196]

Mehrere Forschungsgruppen haben Einsperrkammern mit Mechanismen zur Immobilisierung in einem Instrument kombiniert, um so das Verhalten und das Überleben innerhalb der Kammer zu verfolgen und dann die Würmer kurzzeitig für ein Bildgebungsverfahren mit hoher Auflösung zu immobilisieren.^[109,172,188,192,197] Dieser Ansatz ermöglichte die Untersuchung der Beziehungen zwischen Lokomotion und neuronalem Tod.^[188]

4.1.3. Erzeugung wohldefinierter Umgebungen in mikrofluidischen Geräten

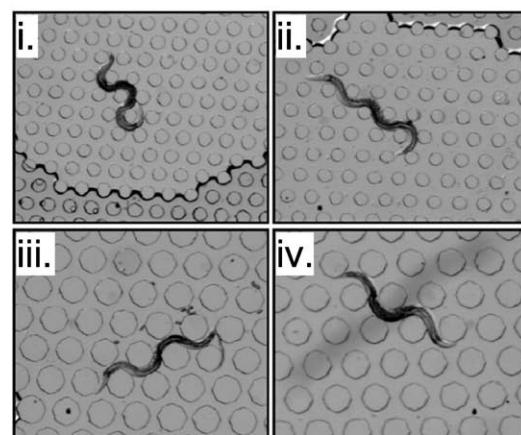
Durch Mikrofertigung lassen sich gleichförmige und wohldefinierte Umgebungen für den Wurm herstellen. Zum Vergleich ist in Abbildung 1a das konventionelle Umfeld von *C. elegans* im Labor dargestellt – eine mit Agar gefüllte Petrischale, wobei sich auf der Agaroberfläche ein *E.-coli*-Rasen befindet. Die chemische und physikalische Umgebung in der Petrischale lässt sich nicht einfach kontrollieren. Feuchtigkeit kann mit der Zeit aus dem Agar verdampfen, und der Hydrationsgrad des Agar kann das Verhalten von *C. elegans*

beeinflussen.^[205] Zudem ist die Verteilung der Nahrung auf der Oberfläche nicht gleichförmig. Typischerweise werden die Agarplatten in der Weise mit Bakterien bestückt, dass sich im Zentrum der Platte Bakterienrasen befindet, der jedoch nicht bis an die Plattenränder heranreicht. Zudem kann der Sauerstoffverbrauch durch die Bakterien eine unausgewogene Sauerstoffkonzentration auf der Agaroberfläche zur Folge haben.^[181] Die Würmer kriechen über die Oberfläche des Agar (und bohren sich manchmal auch in diesen hinein); aufgrund der ungleichmäßigen Umgebung auf der Oberfläche erfahren die Würmer zeitabhängige Änderungen ihrer Umgebung, und verschiedene Würmer erfahren möglicherweise leicht unterschiedliche Bedingungen. Diese Unterschiede können die Tier-zu-Tier-Unsafeheiten innerhalb der Experimente erhöhen.

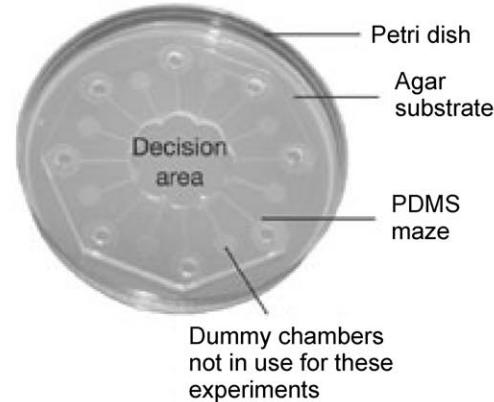
Mikrofluidische Instrumente ermöglichen die Bereitstellung von wohldefinierten und modulierbaren chemischen Umgebungen und lassen sich darüber hinaus mit der Anwendung einer großen Bandbreite an physikalischen Stimuli vereinbaren. So lässt sich beispielsweise die Nahrungsmittelversorgung – ein relevanter Parameter in der Erforschung von Nahrungsrestriktionen und des Alterungsprozesses – auf einer Agarplatte nicht einfach modifizieren, kann aber innerhalb einer Flüssigkultur von Würmern in einem mikrofluidischen Instrument leicht kontrolliert werden.^[109] Zudem ist es mit einer mikrofluidischen Apparatur möglich, die chemische Umgebung des Wurms einfach durch einen Wechsel der Zusammensetzung der durch die Apparatur fließenden Flüssigkeit zu modifizieren. Rhode und Mitarbeiter entwickelten einen mikrofluidischen Multiplexadapter, um den Einlass der mikrofluidischen Apparatur mit einer Tüpfelplatte verbinden zu können.^[192] Chronis und Mitar-

Abbildung 5. Mikrofluidische Kammern und Tröpfchen zur Beobachtung von *C. elegans*. a) Eine Anordnung von Pfosten bietet den Würmern die Umgebung eines „künstlichen Erdreichs“, in dem die Würmer umherkriechen können. Das Instrument besteht aus einer flüssigkeitsgefüllten PDMS-Kammer, die luftdicht mit einer Glasscheibe verschlossen ist. Obwohl die Bilder nur einen Wurm zeigen, ermöglicht das Instrument die Beobachtung des lokomotorischen Verhaltens mehrerer Würmer gleichzeitig. Die runden Pfosten in (i) und (ii) sind 100 µm stark; die Pfosten in (iii) und (iv) sind 200 µm stark. (Wiedergabe nach Lit. [187].) b) Ein „Mikroirrgarten“ zur Bestimmung bakterieller Präferenzen von *C. elegans* (Petri dish – Petrischale, Agar substrate – Agar, PDMS maze – PDMS-Maske, Dummy chambers not in use for this experiment – in diesem Experiment ungenutzte Kammern, Decision area – Entscheidungsfläche). Das Gerät besteht aus in PDMS geprägten Kanälen, die winkelgetreu auf einer Agaroberfläche aufgebracht sind. Die Kanäle sind mit Luft gefüllt; die Würmer kriechen über die Agaroberfläche und sind durch die Kanäle räumlich eingeschränkt. Zhang und Mitarbeiter platzierten Proben verschiedener Bakterien am Ende der radial verlaufenden Mikrokanäle, setzten den Wurm in das Zentrum der Apparatur und beobachteten so, welche Bakterien vom Wurm bevorzugt werden.^[194] (Wiedergabe mit Genehmigung durch Macmillan Publishers Ltd.; *Nature* 2005, 438, 179–184.) c) Eine Ansammlung frei beweglicher Mikrotröpfchen zur Beobachtung der Lokomotion in *C. elegans*. Indem sie mit Duftstoffen versehene Luft über die Ansammlung von Tröpfchen fließen ließen, konnten Luo und Mitarbeiter die zeitliche Dynamik der lokomotorischen Reaktion der Würmer auf Duftstoffe aufzeichnen. Die Tröpfchen beschränkten das Schwimmen der Würmer auf eine spezifische Fläche. (Wiedergabe mit Genehmigung nach Lit. [210].)

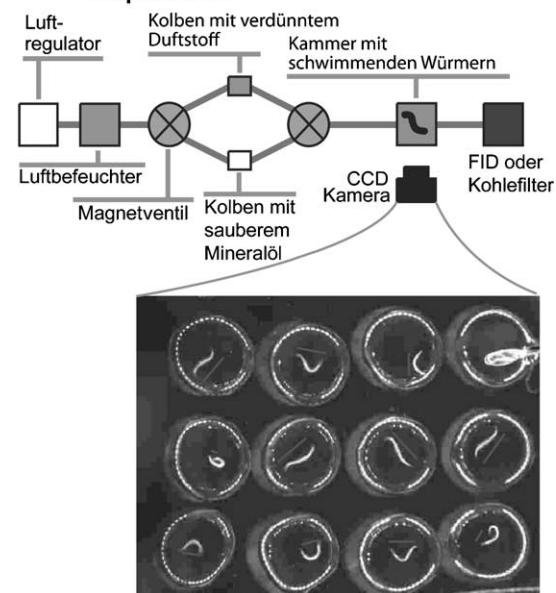
(a) Flüssigkeitsgefülltes PDMS auf Glas



(b) Luftgefülltes PDMS auf Agar



(c) frei bewegliche Flüssigkeitströpfchen



beiter verwendeten laminare Strömungen in mikrofluidischen Instrumenten zu Entwicklung eines Fließschemas, mit dessen Hilfe sich das chemische Milieu in der Nähe der Nase immobilisierter Würmer schnell austauschen lässt.^[173] Mikrofluidische Instrumente ermöglichen das Erzeugen von: 1) räumlichen Gradienten von mit Bakterien assoziierten Duftstoffen in luftgefüllten Mikrokanälen auf Agaroberflächen zum Studium der bakteriellen Präferenzen und des Gedächtnisses von *C. elegans*,^[190,194] 2) räumlicher Gradienten von Sauerstoff in luftgefüllten Mikrokanälen auf Agaroberflächen zur einfacheren Auffindung und Erforschung der Aerotaxis von *C. elegans* – der Bewegung der Tiere in Richtung einer spezifischen Sauerstoffkonzentration^[170,171,181,195] – und 3) eines zeitlichen Gradienten von Duftstoffen in der Luft, die über eine Anordnung von Tröpfchen fließt, die jeweils einzelne Würmer enthielten, um so die Erforschung der Chemotaxis zu ermöglichen.^[210]

Die Permeabilität von PMDS gegen Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid kann genutzt werden, um die Konzentration dieser Gase in der Umgebung des Wurms zu steuern. Mithilfe von Instrumenten, in denen die flüssigkeitsgefüllten Kanäle, die die Würmer beherbergen, durch eine dünne Schicht von PMDS von den gasgefüllten Kanälen getrennt sind, ließ sich die Zusammensetzung der Gasmischungen kontrollieren, die in der die Würmer umgebenden Flüssigkeit gelöst sind, indem die Zusammensetzung der Gasmischung in den Gaskanälen variiert wurde. Dieser Ansatz erwies sich als nützlich im Zuge der Immobilisierung der Würmer mittels Kohlendioxid^[172] und im Zuge einer Studie zur neuronalen Reaktion auf Änderungen der Sauerstoffkonzentration in *C. elegans*.^[195]

Die wichtigste Gruppe von Stimuli, denen die Würmer innerhalb von mikrofluidischen Instrumenten ausgesetzt wurden, sind gelöste chemische Substanzen und Gase. Die Würmer zeigen aber auch verhaltenstechnische und biochemische Veränderungen als Reaktion auf verschiedene physikalische Stimuli wie elektrische Felder,^[191,214] Temperatur,^[211–215] und ionisierende Strahlung (UV-Licht, Protonen, Gammastrahlung und Eisen-Atome).^[216,218] Es sollte möglich sein, diese Stimuli in mikrofluidische Instrumente zu integrieren; so nutzten Rezai und Mitarbeiter kürzlich ein mikrofluidisches Instrument, um die Lokomotion von Würmern in einem elektrischen Feld zu untersuchen.^[191]

4.2. Werkzeuge zur Beobachtung von Phänotypen

4.2.1. Die Beobachtung des Wurms mittels Mikroskopie

Es existiert eine Reihe von Techniken für die mikroskopische Beobachtung der Würmer. Mittels Hellfeldmikroskopie können die Lebenszeit, das Verhalten und die Morphologie studiert werden. Bilder von sich bewegenden Würmern können in starker Vergrößerung mit einem Mikroskop mit motorisierter Trägerplatte inklusive einer Software zur Verfolgung des Massenschwerpunkts des Wurms aufgenommen werden. Es gibt Software zur Aufzeichnung und Verfolgung kriechender Würmer.^[213,219] Lokomotorisches Verhalten ist ein leicht zu beobachtender Phänotyp in *C. elegans* und kann

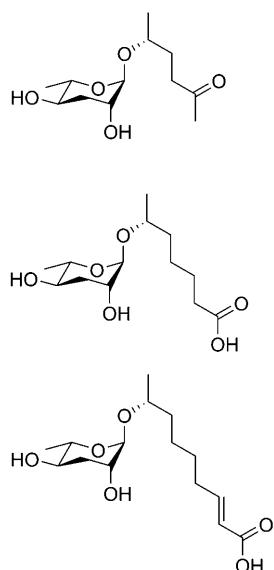
als Informationsquelle für neuronale und muskuläre Funktion, Überleben und Chemotaxis dienen.

Die Nomarski-Mikroskopie (Differentialinterferenzkontrastmikroskopie) ermöglicht eine detaillierte Abbildung von Körperstrukturen in *C. elegans*. Zum Beispiel kann jeder einzelne Zellkern im Wurm abgebildet werden,^[13] Zellleichen können nach erfolgter Apoptose identifiziert werden,^[14] und interne Bewegungen wie die rhythmische Muskelkontraktion des Pharynx lassen sich im Detail beobachten.^[220] Polarisationslichtmikroskopie kann ebenfalls bei der Visualisierung bestimmter Körperstrukturen hilfreich sein. So lassen sich beispielsweise die gordneten Strukturen der Myofilamente in den Muskeln von *C. elegans* besser mittels Polarisationslichtmikroskopie erkennen als mit konventioneller Hellfeldmikroskopie.^[221] Für spezifische Bildgebungsprozesse können nichtlineare optische Techniken eingesetzt werden. Kohärente Anti-Stokes-Ramanstreuung (CARS) ermöglichte beispielsweise das Abbilden von Fettspeichern innerhalb des Wurms ohne Einsatz lipophiler Färbereagenzien.^[222] Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die Visualisierung von neuronaler Aktivität (unter Verwendung FRET-basierter Ca^{2+} -Farbstoffe)^[202] und der Gen-Exprimierung (unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Proteinen). Die Transmissionsselektronenmikroskopie (TEM) zur Abbildung von Körperquerschnitten (erhalten durch Ultramikrotomie) ist eine klassische Technik in der Wurmbiologie. Diese Technik ermöglichte die mikroskopische Rekonstruktion des gesamten Nervensystems von *C. elegans* in den 1970er Jahren.^[15,223]

4.2.2. Chemische und biochemische Charakterisierungstechniken

In Abschnitt 3.3 ist der Einsatz von HPLC, SDS-PAGE, MS sowie der Immunchemie zur Identifizierung von exprimierten Proteinen in *C. elegans* beschrieben. Biochemische Arbeitstechniken haben die Identifizierung und Charakterisierung von Metaboliten erleichtert, die vom Wurm ausgeschieden werden.^[224] Würmer scheiden konstitutiv das Dauer-Pheromon, eine Mischung von Monosaccharidderivaten, ab. Die Konzentration des Pheromons dient als Indikator für die Populationsdichte: Eine hohe Konzentration an Pheromon lässt *C. elegans*-Larven in das Dauer-Larvenstadium fallen – der alternativen dritten Entwicklungsstufe, in der das Wachstum ausgesetzt ist. Das Dauer-Pheromon kann durch Filtrieren des Mediums, das zur Kultivierung von *C. elegans* eingesetzt wurde, erhalten werden. Das so erhaltene Rohpheromon lässt sich anschließend durch Chromatographie fraktionieren. Indem die Würmer mit den verschiedenen Fraktionen behandelt werden und man anschließend bestimmt, welche davon die Ausbildung des Dauer-Stadiums auslösen^[225] oder das Verlassen des Dauer-Stadiums verhindern, können diejenigen Fraktionen identifiziert werden, die aktive Komponenten des Pheromons enthalten.^[224] $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und LCMS ermöglichen die Identifizierung der chemischen Strukturen der einzelnen aktiven Komponenten der Pheromonmischung.^[224,225] In Schema 4 sind drei aktive Komponenten des Dauer-Pheromons abgebildet.

Technische Fortschritte in der Festkörper-NMR-Spektroskopie haben die chemische Charakterisierung von komplexen, inhomogenen Proben möglich gemacht. Blaise und



Schema 4. Drei aktive Bestandteile des das Dauer-Larvenstadium induzierenden Pheromons von *C. elegans*.^[224]

Mitarbeiter nutzten hochauflösende ¹H-MAS-NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung des Stoffwechselprofils, d.h. des molekularen Phänotyps intakter Würmer.^[226,227] Die Autoren identifizierten die molekularen Unterschiede zwischen drei Strängen von *C. elegans*: Wildtyp-Würmern, *sod-1*-Mutanten und *ctl-1*-Mutanten.^[226,227] Sowohl *sod-1* als auch *ctl-1* codieren für Proteine, die an der Zerstörung von ROS beteiligt sind. Würmer, die diese Mutationen in sich tragen, sind rein visuell nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Im Vergleich mit NMR-Spektren des Wildtyps weisen die Spektren der *sod-1*- und *ctl-1*-Mutanten schwächere Signale der Lipidresonanzen und stärkere Signale der Aldehydresonanzen auf.^[226] Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass bei Abwesenheit von antioxidativen Enzymen wie SOD-1 oder CTL-1 die Lipide gegen eine Oxidation durch ROS ungeschützt sind.^[226] Obgleich es eine relativ neue Technik ist,^[226,227] hat die NMR-spektroskopische Aufnahme ganzer Organismen ein großes Potential, um zum Verständnis der Phänotypen auf molekularer Ebene in *C. elegans* beizutragen.

4.2.3. Biophysikalische Charakterisierungstechniken

Pruitt und Mitarbeiter entwickelten Instrumente zur Messung der mechanischen Formfestigkeit von Wurmkörpern^[228] und zur Messung der mechanischen Kräfte, die durch kriechende Würmer erzeugt werden.^[229] Diese Werkzeuge können zur Auffindung von noch unbekannten Phänotypen in *C. elegans* beitragen.

Die Stoffwechselgeschwindigkeit ist ein wichtiges physiologisches Maß. Es gibt eine Reihe von Ansätzen zur Bestimmung der Stoffwechselgeschwindigkeit in *C. elegans*, darunter die Messung 1) der CO₂-Produktion einer Population von ca. 50 Würmern mittels Massenspektrometrie,^[230] 2) des O₂-Verbrauchs einzelner Würmer mittels Fluorimetrie,^[231] 3) der Wärmeproduktion einer Wurmpopulation

mittels Mikrokalorimetrie^[232] und 4) der Konzentration von ATP in lebenden Würmern mittels transgener Stränge, die Luciferin und Luciferase exprimieren.^[232,233]

Es ist möglich, sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre elektrophysiologische Aufzeichnungen der Aktivität intakter Neuronen und Muskeln in *C. elegans* durchzuführen. Intrazelluläres Aufzeichnen erfordert, dass der Experimentator den lebendigen Wurm präpariert und die Elektroden direkt an seine internen Strukturen anschließt. Dies ist eine größere experimentelle Herausforderung, ermöglicht aber die Aufnahme von quantitativen Daten zur Wanderung von Ionen in das Innere lebender Zellen und aus ihnen heraus.^[234] Raizen und Avery entwickelten eine einfache Methode, um die Aktivität der Neuronen in der Pharynx von *C. elegans* extrazellulär aufzuzeichnen.^[235] Extrazelluläre Aufnahmen sind im Hinblick auf das tatsächliche Zellpotential weniger informativ als intrazelluläre, sie sind jedoch viel einfacher durchzuführen.^[234,235]

4.3. Genetische Perturbationen

Nicht alle Chemiker sind am Erlernen von Techniken und Arbeitsweisen zur genetischen Manipulation interessiert. Für diejenigen, die interessiert sind, ist *C. elegans* ein überaus geeigneter Organismus für Genetik und reverse Genetik.^[38] Glücklicherweise gibt es für all diejenigen, die sich mit genetischen Techniken nicht auskennen, zahlreiche Möglichkeiten, Forschung an und mit mutierten Tieren durchzuführen. Erstens ist es möglich, bereits mutierte Stränge von *C. elegans* entweder von anderen Wissenschaftlern oder aus Beständen mutierter Stränge zu erhalten. Es gilt zu beachten, dass nicht jedes Gen durch eine Mutation repräsentiert ist. Das Caenorhabditis Genetics Center an der University of Minnesota, ein von den amerikanischen National Institutes of Health finanziertes Zentrallager für mutierte Würmer, hat tausende Stränge vorrätig. Zweitens ist es möglich, Gene in Wildtyp-Würmern durch RNA-Interferenz mittels dsRNA stummzuschalten. Die Behandlung der Würmer mit dsRNA ist sehr einfach: Sowohl das Eintauchen der Würmer in eine Lösung der dsRNA als auch die Verfütterung von *E. coli*, welche die dsRNA exprimieren, haben Würmer mit stummgeschalteten Genen zur Folge.^[236] In Tabelle 2 sind Internetseiten von Organisationen aufgeführt, über die mutierte Stränge von *C. elegans* und dsRNA gegen Wurmgenen bezogen werden können.

4.3.1. Genetik und chemische Genetik

Der Ansatz der chemischen Genetik kann für Forscher interessant sein, die den Wurm erforschen und einen chemischen Hintergrund haben. Zwischen den Ansätzen des chemisch-genetischen und des konventionellen genetischen Screenings gibt es Parallelen. Innerhalb eines genetischen Screenings erzeugt eine beliebige Mutagenese eine Population von Mutanten, die auf eine Änderung innerhalb des gewünschten Phänotyps hin durchsucht werden kann. Die Identifizierung der mutierten Gene, die die Änderung des Phänotyps hervorgerufen haben, erzeugt einen direkten oder

indirekten Zusammenhang zwischen deren Funktion und dem Phänotyp. In einem vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Screening ersetzt die Behandlung des Organismus mit einer Bibliothek kleiner Moleküle die ungelenkte Mutation. Der Erfolg eines solchen vorwärtsgerichteten chemisch-genetischen Screenings hängt von der Hypothese ab, dass die Substanzen der Chemikalienbibliothek befähigt sind, die Aktivität von Proteinen in einer spezifischen Weise abzuändern. Im Prinzip hat eine aus der Bibliothek stammende Substanz, die eine Änderung des gewünschten Phänotyps zur Folge hat, ein Protein gestört oder zerstört, dessen Funktion direkt oder indirekt mit dem gewünschten Phänotyp zusammenhängt.^[237] In einem reversen genetischen Screening ermöglicht eine Mutation in einem gewünschten Gen das Beobachten der daraus resultierenden Änderung des Phänotyps. In einem reversen chemisch-genetischen Screening werden mittels In-vitro-Methoden Mitglieder einer Chemikalienbibliothek identifiziert, die an ein gewünschtes Protein binden. Die Behandlung eines Organismus mit niedermolekularen Verbindungen, die an das gewünschte Protein binden, ermöglicht es, die resultierenden Änderungen des Phänotyps zu beobachten.^[237]

Viele der experimentellen Herausforderungen innerhalb der chemischen Genetik sind chemischer Natur. Die Identifizierung des Proteins, das durch die niedermolekulare Verbindung angegriffen wird, und die Validierung der Spezifität dieses Angriffs sind typischerweise die schwierigsten Aufgaben innerhalb des chemisch-genetischen Screenings.^[237] Biochemische Ansätze sind gut geeignet, um diese Probleme anzugehen. Eine weitere Herausforderung bei der Entwicklung einer guten Chemikalienbibliothek ist der derzeitige Mangel an tieferem Verständnis der Korrelation von chemischer Struktur niedermolekularer Verbindungen und ihrer Fähigkeit zur Proteinbindung. Die Vorhersage und der gezielte Entwurf von Ligand-Protein-Spezifitäten ist ein wichtiges und aktives Gebiet der chemischen Forschung.^[238]

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Modellorganismen für Chemiker: Alternativen zum Wurm?

Für manche Forschungsfragen sind Würmer und andere mehrzellige Organismen wahrscheinlich zu komplex, und einzellige Organismen wie Hefen oder *E. coli* werden sicher ihre Stellung als leistungsstarke biochemische Modelle verteidigen. Zum Studium grundlegender interzellulärer Wechselwirkungen werden auch in Zukunft filmbildende Bakterien (wie *Pseudomonas aeruginosa*) oder Schleimpilze, die sich zu mehrzelligen Blöcken zusammenschließen (wie *Dictyostelium discoideum*), gegenüber höheren, komplexen Organismen bevorzugt werden. *Mycoplasma genitalium*, das Bakterium mit dem kleinsten Genom aller freilebenden Organismen (580 kb, für weniger als 500 Proteine codierend), hat sich als nützliches Modell für die Identifizierung des Minimalsatzes von für das Leben essenziellen Genen erwiesen.^[5] Im Jahre 2010 haben Venter und Mitarbeiter chemisch synthetisierte Kopien des *M.-genitalium*-Genoms in Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eingepflanzt.^[239] Diese Arbeit reprä-

sentiert einen Schritt hin zur chemischen Spezifikation eines lebenden Organismus.

Um den großen Schritt vom Verständnis der Funktionsweise einer Zelle hin zum Verständnis der Funktionsweise eines menschlichen Wesens zu bewerkstelligen, sind mehrzellige Organismen notwendig. Die wahre Leistungsfähigkeit von *C. elegans* liegt darin, dass es der *einfachste* Modellorganismus zum Studium mehrzelligen Lebens ist. *C. elegans* ist simpel, sowohl in biologischer Hinsicht – die Würmer sind klein; sie bestehen aus weniger als 1000 Zellen; sie besitzen einen einfachen Bauplan – als auch mit Blick auf die praktische Nutzung – die Haltung der Würmer ist viel einfacher und billiger im Vergleich zu mehrzelligen Organismen höherer Komplexität oder gar von Säugetier-Zellkulturen. *C. elegans* hat zudem viele Vorteile im Hinblick auf Zugänglichkeit und Ressourcen.

Einige mehrzellige Organismen weisen spezifische Eigenschaften auf, die diese als besonders geeignet für bestimmte Forschungsprojekte werden lassen. So weist beispielsweise der Kugelfisch (*Fugu rubripes*) eines der kleinsten Genome unter Vertebraten auf und ist daher bei der Identifizierung der für Vertebraten notwendigen Gene von Nutzen.^[240] Frösche (*Xenopus spp.*) und Hühner (*Gallus gallus*) besitzen große Embryonen, die sich außerhalb der Mutter entwickeln, und sind daher ausgezeichnete Modellorganismen für Entwicklungsstudien.^[241, 242] Planarien (*Schmidtea mediterranea* und andere Spezies) sind speziell für Studien zur Geweberegeneration interessant.^[243, 244] Zur Beantwortung fundamentaler Fragen bezüglich der Natur mehrzelligen Lebens jedoch, und speziell zum Verständnis der molekularen Basis von Phänomenen auf der Ebene des Gesamtorganismus, scheint *C. elegans* der beste aller derzeitig verfügbaren Modellorganismen zu sein.

5.2. Relevanz des Wurms im Bezug auf die menschliche Gesundheit

Wie relevant sind die Würmer mit Blick auf die menschliche Gesundheit? Forschung an und mit *C. elegans* kann nicht alle Aspekte der menschlichen Biologie abdecken. Es gibt jedoch zahlreiche Beispiele für Entdeckungen, die mithilfe von *C. elegans* erzielt wurden, die mit Blick auf die menschliche Biologie informativ waren.^[245] So wurden beispielsweise die Gene, die den Alterungsprozess steuern,^[245] und die Gene, die die Apoptose regulieren,^[246] zuerst in *C. elegans* entdeckt.^[245, 246] Aus wissenschaftlicher Sicht wird es faszinierend sein zu sehen, ob die Chemie, die Phänomene auf der Ebene des Gesamtorganismus zugrunde liegt, zwischen so unterschiedlichen Spezies wie Würmern und Menschen konserviert ist – und dies auch in den Fällen, in denen die Mechanismen der genetischen Kontrolle verschieden sind. Das „System“ *C. elegans* hat das Potential, zum Verständnis der molekularen Mechanismen menschlicher Krankheiten beizutragen, sowie auch, um die Aktivität – und Toxizität – potentieller Wirkstoffe zu testen. Um *C. elegans* für das Screening von potentiellen Wirkstoffen nutzbar zu machen, muss gezeigt werden, dass die mithilfe des Wurms gewonnenen experimentellen Befunde auf den Menschen

übertragbar sind.^[247] Eine wichtige Forschungsrichtung ist die Verwendung von *C. elegans* als Modell, um ein besseres Verständnis von parasitären Würmern und Infektionen mit parasitären Würmern zu erlangen. Erste Arbeiten haben bereits die Nützlichkeit von *C. elegans* bei der Entwicklung neuer, in Säugetieren wirksamer antihelminthischer Wirkstoffe demonstriert.^[161]

5.3. Wie kann die Chemie in der Wurmforschung instrumentalisiert werden?

Häufig werden neue biologische Entdeckungen dank neuer Instrumente und Arbeitsmethoden gemacht. Welche zusätzlichen Instrumente und Fähigkeiten brauchen wir? Im Folgenden schlagen wir potentielle Entwicklungsfelder für Chemiker vor.

Ein eindeutig chemiebezogenes Gebiet innerhalb der Forschung an und mit *C. elegans* ist die Entwicklung von gewebe- und molekülspezifischen Farbstoffen. Die zur Untersuchung von *C. elegans* am häufigsten eingesetzte molekulare Markierung ist das grün fluoreszierende Protein (GFP); es gibt jedoch Grenzen der Anwendbarkeit des GFP – viele zelluläre Komponenten sind keine Genprodukte. Kleine organische Farbstoffe, die zur Kennzeichnung subzellulärer Komponenten in der In-vitro-Forschung eingesetzt werden, sind nicht unbedingt für einen Einsatz in der *C. elegans*-Forschung geeignet, da die Aufnahme des Farbstoffs durch die Oberhaut oder die Darmbeschichtung (oder auch die Eierschale im Falle der Embryonen) behindert wird.^[201] Der Bedarf an Farbstoffen bietet Chemikern eine Gelegenheit, neue Strategien zur Markierung von Bestandteilen des Wurms zu entwickeln. Die Arbeiten von Bertozzi und Mitarbeitern, in denen mittels einer Kombination aus modifizierten Zuckern und Klick-Chemie Glykane markiert werden, sind exzellente Beispiele für die Instrumentalisierung der Chemie in der Wurmforschung.^[120] Um die Entwicklung neuer, den Wurm durchdringender Farbstoffe in richtige Bahnen zu lenken, scheint es zudem sinnvoll zu sein, die Permeabilität sowie die chemische Selektivität der Oberhaut und der Darmbeschichtung in *C. elegans* zu charakterisieren.

Die Chemie könnte Ansätze zur Entdeckung neuer Gene bereithalten. Mehr als die Hälfte der Gene im Genom von *C. elegans* haben eine unbekannte Funktion.^[248] Dies sind Gene, die weder ortholog zu Genen bekannter Funktion sind, noch in Phänotyp-basierten Screenings identifiziert werden konnten. Die für genetische Screenings am besten geeigneten Phänotypen sind diejenigen, die einfach und schnell zu identifizieren sind – etwa Defekte in der Lokomotion oder Entwicklung. Ein chemischer Ansatz könnte die Identifizierung neuer Phänotypen in Mutanten auf Basis chemischer Reaktivitäten ermöglichen (so könnte beispielsweise eine geänderte Reaktivität der Oberhaut auf eine Änderung der chemischen Zusammensetzung der Oberhaut hindeuten). Mit dieser Strategie könnte die Chemie zur Identifizierung neuer Klassen von Mutationen beitragen.

Eine chemische Herangehensweise könnte auch in der Entwicklung bakterienfreier, chemisch-definierter Medien für *C. elegans* von Nutzen sein. Würmer, die im bakterien-

freien Medium nach derzeitiger Rezeptur aufgezogen werden, weisen eine langsamere Entwicklung auf als Artgenossen, an die Bakterien verfüttert werden; dies deutet darauf hin, dass das chemisch-definierte Medium derzeit nicht den gleichen Nährwert hat wie die bakterielle Ernährung. Die Entwicklung eines chemisch-definierten Mediums, das den Würmern eine Entwicklung wie im Falle einer Bakteriendiät erlaubte, wäre nützlich und äußerst informativ im Hinblick auf den Nährstoffbedarf von *C. elegans*. Es ist möglich, dass der hohe Nährwert der Bakterien seine simple Ursache in der Tatsache hat, dass die Würmer Filtrierer sind und daher die Konsistenz der Nahrung eine Rolle spielt. Die Einkapselung eines chemisch-definierten Mediums in Vesikel oder in verdaubare, bakteriengroße Körner könnte *C. elegans* möglicherweise helfen, das chemisch-definierte Medium besser als Nahrungsquelle zu nutzen.

Eine weitere potentielle Richtung für Chemiker ist die Untersuchung simpler organischer Reaktionen in vivo, um die Wechselwirkungen chemischer Reaktionen mit lebenden Systemen zu untersuchen. Branda und Mitarbeiter behandelten Würmer beispielsweise mit einer photoschaltbaren Substanz, einem Derivat von Bis(pyridinium)thionylethen, das einen reversiblen, photoinduzierten Wechsel vom farblosen, offenkettigen Isomer zum farbigen, ringförmig geschlossenen Isomer durchlaufen kann. Der Wechsel hin zum ringförmigen Isomer induzierte eine reversible Paralyse innerhalb eines signifikanten Teils einer Wurmpopulation, deren Mitglieder die photoschaltbaren Moleküle in sich trugen.^[249] Obwohl der Mechanismus der Paralyseinduktion unbekannt bleibt (die Autoren mutmaßen, dass die Paralyse mit der Tatsache zusammenhängen könnte, dass die geschlossenen, ringförmigen Isomere einfacher zu reduzieren sind als die offenkettige Form), zeigt diese Arbeit auf, dass die Untersuchung, inwieweit organische Chemie mit mehrzelligen Organismen wechselwirkt, eine vielversprechende Richtung in der chemischen Forschung sein kann.

5.4. Wofür sollten Chemiker den Wurm nutzen?

Welche der Forschungsfragen, die sich mithilfe des Wurms angehen lassen, sind für Chemiker interessant?

In der pharmazeutischen Forschung kann der Wurm eingesetzt werden, um die Aktivität und Toxizität von Wirkstoffkandidaten zu testen. Die Vorhersagekraft von Wirkstoffstudien im Wurm im Bezug auf die Wirksamkeit im Menschen ist jedoch noch nicht vollständig bekannt; *C. elegans* ist zum Hochdurchsatz-Screening und zum hypothesenbasierten Screening geeignet und kann daher dazu dienen, Wirkstoffkandidaten in einem komplexen mehrzelligen Organismus zu testen, der verschiedene Zell- und Gewebetypen aufweist.^[250] Es sollte sicher möglich sein, die Wechselwirkung von Würmern mit einfachen Xenobiotika und Toxinen wie Schwermetallen zu untersuchen. Würmer ebnen eventuell auch den Weg zur Erforschung anderer Phänomene – Auswirkungen von Hunger, Strahlung, hohen und tiefen Temperaturen, Vitaminmangel, Anoxie und Reperfusionsschäden –, in denen der Mechanismus der Verletzung sowie die biologische Reaktion darauf eher von genereller Natur als orga-

nismusspezifisch sind. Dagegen sind die Würmer wahrscheinlich von geringerem Nutzen, wenn die Auswirkungen von Xenobiotika auf Enzyme, Rezeptoren, Pfade oder Systeme zu untersuchen sind, die spezifisch für einen Organismus oder eine Klasse von Organismen sind.

Trotz der Komplexität des Wurms sollte es möglich sein, einen reduktionistischen Ansatz beizubehalten. Der Wurm sollte Chemiker in die Lage versetzen, die Auswirkungen 1) einfacher Moleküle (wie O_2 , H_2S , NO , CO , CO_2), 2) universeller chemischer Phänomene (ionisierende Strahlung, Radikalbildung, Bildung und Nutzung aktiver Sauerstoffspezies, Reduktion und Oxidation), 3) fundamentaler chemischer Aspekte (Kinetik, Thermodynamik, Stereochemie, Reaktivität, pH) und 4) grundlegender physikalischer Parameter (Temperatur, Druck) auf das Leben zu erforschen.

Die Forschung an und mit *C. elegans* hat gerade erst begonnen, die Geheimnisse des Alterns, des Todes, des Verhaltens, des Lernens und des Erinnerungsvermögens zu entschlüsseln. Wir sind der Überzeugung, dass die Untersuchung der zugrundeliegenden chemischen Zustände und Reaktionen, die mit diesen Prozessen korrelieren, ein attraktives Ziel für Chemiker darstellt.

Abkürzungen

TGF-β, transformierender Wachstumsfaktor β (transforming growth factor β); **IGF-1**, Insulin-artiger Wachstumsfaktor 1 (insulin-like growth factor 1); **ROS**, reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species); **SOD**, Superoxid-Dismutase (superoxide dismutase); **DOG**, 2-Desoxy-D-glucose; **MS**, Massenspektrometrie; **GLC**, Gas-Flüssigkeitschromatographie (gas-liquid chromatography); **LC**, Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography); **CE**, Kapillarelektrophorese (capillary electrophoresis); **SDS-PAGE**, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

Diese Forschung wurde unterstützt durch finanzielle Zuschüsse des US-amerikanischen Department of Energy (DOE-FG02-00ER4585) sowie durch finanzielle Zuschüsse von Vertex Pharmaceuticals an die Harvard University.

Eingegangen am 1. September 2010
Online veröffentlicht am 15. April 2011

Book, doi/10.1895/wormbook.1.101.1, <http://www.wormbook.org>.

- [9] A. Capes-Davis, G. Theodosopoulos, I. Atkin, H. G. Drexler, A. Kohara, R. A. MacLeod, J. R. Masters, Y. Nakamura, Y. A. Reid, R. R. Reddel, R. I. Freshney, *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 1.
- [10] S. Brenner, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 683.
- [11] S. Brenner in *The Nematode Caenorhabditis elegans* (Hrsg.: W. B. Wood), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **1988**, S. ix-xiii.
- [12] S. Brenner, L. Wolpert, *My Life in Science*, BioMed, London, **2001**.
- [13] J. E. Sulston, H. R. Horvitz, *Dev. Biol.* **1977**, *56*, 110.
- [14] J. E. Sulston, E. Schierenberg, J. G. White, J. N. Thomson, *Dev. Biol.* **1983**, *100*, 64.
- [15] J. G. White, E. Southgate, J. N. Thomson, S. Brenner, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1986**, *314*, 1.
- [16] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806.
- [17] The *C. elegans* Sequencing Consortium, *Science* **1998**, *282*, 2012.
- [18] L. W. Hillier, A. Coulson, J. I. Murray, Z. Bao, J. E. Sulston, R. H. Waterston, *Genome Res.* **2005**, *15*, 1651.
- [19] I. Antoshechkin, P. W. Sternberg, *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 518.
- [20] *Wormatlas* (Hrsg.: Z. F. Altun, L. A. Herndon, C. Crocker, R. Lints, D. H. Hall), **2002–2010**, <http://www.wormatlas.org>.
- [21] R. C. Cassada, R. L. Russell, *Dev. Biol.* **1975**, *46*, 326.
- [22] D. Gems, J. J. McElwee, *Mech. Ageing Dev.* **2005**, *126*, 381.
- [23] S. Brenner, *Genetics* **1974**, *77*, 71.
- [24] D. Garigan, A. L. Hsu, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer, C. Kenyon, *Genetics* **2002**, *161*, 1101.
- [25] D. A. Garsin, J. M. Villanueva, J. Begun, D. H. Kim, C. D. Sifri, S. B. Calderwood, G. Ruvkun, F. M. Ausubel, *Science* **2003**, *300*, 1921.
- [26] A. Barriere, M. A. Felix, *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 1176.
- [27] N. J. Szewczyk, E. Kozak, C. A. Conley, *BMC Biotechnol.* **2003**, *3*, 19.
- [28] T. Kaletta, M. O. Hengartner, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 387.
- [29] G. M. Rubin, M. D. Yandell, J. R. Wortman, G. L. Gabor Miklos, C. R. Nelson, I. K. Hariharan, M. E. Fortini, P. W. Li, R. Apweiler, W. Fleischmann et al., *Science* **2000**, *287*, 2204.
- [30] E. Kim, A. Magen, G. Ast, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 125.
- [31] A. C. Carrano, Z. Liu, A. Dillin, T. Hunter, *Nature* **2009**, *460*, 396.
- [32] C. Morck, L. Olsen, C. Kurth, A. Persson, N. J. Storm, E. Svensson, J. O. Jansson, M. Hellqvist, A. Enejder, N. J. Fagerman, M. Pilon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18285.
- [33] M. E. Forsythe, D. C. Love, B. D. Lazarus, E. J. Kim, W. A. Prinz, G. Ashwell, M. W. Krause, J. A. Hanover, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 11952.
- [34] J. G. Lawrence, *Cell* **2002**, *110*, 407.
- [35] T. Blumenthal, D. Evans, C. D. Link, A. Guffanti, D. Lawson, J. Thierry-Mieg, D. Thierry-Mieg, W. L. Chiu, K. Duke, M. Kiraly, S. K. Kim, *Nature* **2002**, *417*, 851.
- [36] J. Spieth, D. Lawson, Overview of Gene Structure (January 18, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.65.1, <http://www.wormbook.org>.
- [37] H. H. Kazazian, Jr., *Science* **2004**, *303*, 1626.
- [38] *Scientific Frontiers in Developmental Toxicology and Risk Assessment* (Hrsg.: Committee on Developmental Toxicology, Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences, National Research Council), National Academies Press, Washington, **2000**, S. 296–308.
- [39] G. Ruvkun, O. Hobert, *Science* **1998**, *282*, 2033.
- [40] Y. Wang, D. E. Levy, *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 89.
- [41] S. H. Panowski, A. Dillin, *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20*, 259.

- [42] S. Wolff, A. Dillin, *Exp. Gerontol.* **2006**, *41*, 894.
- [43] L. Partridge, D. Gems, *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 165.
- [44] R. B. Beckstead, C. S. Thummel, *Cell* **2006**, *124*, 1137.
- [45] C. R. Gissendanner, K. Crossgrove, K. A. Kraus, C. V. Maina, A. E. Sluder, *Dev. Biol.* **2004**, *266*, 399.
- [46] J. M. Maglich, A. Sluder, X. Guan, Y. Shi, D. D. McKee, K. Carrick, K. Kamdar, T. M. Willson, J. T. Moore, *Genome Biol.* **2001**, DOI: 10.1186/gb-2001-2-8-research0029.
- [47] D. B. Magner, A. Antebi, *Trends Endocrinol. Metab.* **2008**, *19*, 153.
- [48] D. L. Motola, C. L. Cummins, V. Rottiers, K. K. Sharma, T. Li, Y. Li, K. Suino-Powell, H. E. Xu, R. J. Auchus, A. Antebi, D. J. Mangelsdorf, *Cell* **2006**, *124*, 1209.
- [49] A. Mimoto, M. Fujii, M. Usami, M. Shimamura, N. Hirabayashi, T. Kaneko, N. Sasagawa, S. Ishiura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *364*, 883.
- [50] T. Bacaj, M. Tevlis, Y. Lu, S. Shaham, *Science* **2008**, *322*, 744.
- [51] B. H. Cheung, M. Cohen, C. Rogers, O. Alayram, M. de Bono, *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 905.
- [52] H. Schulenburg, C. L. Kurz, J. J. Ewbank, *Immunol. Rev.* **2004**, *198*, 36.
- [53] J. E. Mellem, P. J. Brockie, D. M. Madsen, A. V. Maricq, *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 865.
- [54] S. R. Lockery, M. B. Goodman, *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 377.
- [55] S. J. Husson, I. Mertens, T. Janssen, M. Lindemans, L. Schoofs, *Prog. Neurobiol.* **2007**, *82*, 33.
- [56] M. Nguyen, A. Alfonso, C. D. Johnson, J. B. Rand, *Genetics* **1995**, *140*, 527.
- [57] R. Ranganathan, E. R. Sawin, C. Trent, H. R. Horvitz, *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 5871.
- [58] V. J. Simpson, T. E. Johnson, *Int. Rev. Neurobiol.* **1996**, *39*, 223.
- [59] M. de Bono, A. Villu Maricq, *Annu. Rev. Neurosci.* **2005**, *28*, 451.
- [60] C. H. Rankin, *Curr. Biol.* **2004**, *14*, R617.
- [61] E. M. Hedgecock, R. L. Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 4061.
- [62] B. P. Braeckman, K. Houthoofd, J. R. Vanfleteren, *Intermediary Metabolism* (February 16, 2009), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.146.1, <http://www.wormbook.org>.
- [63] S. J. Holt, D. L. Riddle, *Mech. Ageing Dev.* **2003**, *124*, 779.
- [64] J. J. McElwee, E. Schuster, E. Blanc, J. Thornton, D. Gems, *Mech. Ageing Dev.* **2006**, *127*, 458.
- [65] A. G. Tielens, C. Rotte, J. J. van Hellemond, W. Martin, *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 564.
- [66] A. F. Cooper, S. D. Van Gundy, *J. Nematol.* **1970**, *2*, 305.
- [67] J. L. Watts, *Trends Endocrinol. Metab.* **2009**, *20*, 58.
- [68] J. Kühnl, T. Bobik, J. B. Procter, C. Burmeister, J. Hoppner, I. Wilde, K. Luersen, A. E. Torda, R. D. Walter, E. Liebau, *FEBS J.* **2005**, *272*, 1465.
- [69] K. D. Kimura, H. A. Tissenbaum, Y. Liu, G. Ruvkun, *Science* **1997**, *277*, 942.
- [70] T. V. Kurzchalia, S. Ward, *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 684.
- [71] A. U. Rao, L. K. Carta, E. Lesuisse, I. Hamza, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4270.
- [72] W. A. Van Voorhies, S. Ward, *J. Exp. Biol.* **2000**, *203*, 2467.
- [73] G. L. Anderson, D. B. Dusenberry, *J. Nematol.* **1977**, *9*, 253.
- [74] T. G. Nystul, M. B. Roth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 9133.
- [75] A. R. Mendenhall, B. LaRue, P. A. Padilla, *Genetics* **2006**, *174*, 1173.
- [76] P. A. Padilla, T. G. Nystul, R. A. Zager, A. C. Johnson, M. B. Roth, *Mol. Biol. Cell* **2002**, *13*, 1473.
- [77] V. A. Hajeri, J. Trejo, P. A. Padilla, *BMC Cell Biol.* **2005**, *6*, 47.
- [78] R. L. Föll, A. Pleyers, G. J. Lewandowski, C. Wermter, V. Heggemann, R. J. Paul, *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **1999**, *124*, 269.
- [79] H. Jiang, R. Guo, J. A. Powell-Coffman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7916.
- [80] A. K. Corsi, *Anal. Biochem.* **2006**, *359*, 1.
- [81] S. Q. Cai, F. Sesti, *Nat. Neurosci.* **2009**, *12*, 611.
- [82] F. Sesti, S. Liu, S. Q. Cai, *Trends Cell Biol.* **2010**, *20*, 45.
- [83] T. Finkel, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 247.
- [84] Y. Shibata, R. Branicky, I. O. Landaverde, S. Hekimi, *Science* **2003**, *302*, 1779.
- [85] Z. A. Medvedev, *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* **1990**, *65*, 375.
- [86] S. Rea, T. E. Johnson, *Dev. Cell* **2003**, *5*, 197.
- [87] K. Ashrafi, F. Y. Chang, J. L. Watts, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer, G. Ruvkun, *Nature* **2003**, *421*, 268.
- [88] K. Houthoofd, B. P. Braeckman, I. Lenaerts, K. Brys, A. De Vreese, S. Van Eygen, J. R. Vanfleteren, *Exp. Gerontol.* **2002**, *37*, 1359.
- [89] M. R. Klass, *Mech. Ageing Dev.* **1977**, *6*, 413.
- [90] L. S. Tain, E. Lozano, A. G. Saez, A. M. Leroi, *BMC Dev. Biol.* **2008**, *8*, 28.
- [91] B. Lakowski, S. Hekimi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13091.
- [92] M. Hansen, A. Chandra, L. L. Mitic, B. Onken, M. Driscoll, C. Kenyon, *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e24.
- [93] K. Jia, B. Levine, *Autophagy* **2007**, *3*, 597.
- [94] K. Houthoofd, B. P. Braeckman, T. E. Johnson, J. R. Vanfleteren, *Exp. Gerontol.* **2003**, *38*, 947.
- [95] S. J. Lee, C. T. Murphy, C. Kenyon, *Cell Metab.* **2009**, *10*, 379.
- [96] A. Schlotterer, G. Kukudov, F. Bozorgmehr, H. Hutter, X. Du, D. Oikonomou, Y. Ibrahim, F. Pfisterer, N. Rabbani, P. Thorvalley et al., *Diabetes* **2009**, *58*, 2450.
- [97] T. J. Schulz, K. Zarse, A. Voigt, N. Urban, M. Birringer, M. Ristow, *Cell Metab.* **2007**, *6*, 280.
- [98] J. R. Cypser, P. Tedesco, T. E. Johnson, *Exp. Gerontol.* **2006**, *41*, 935.
- [99] M. H. Chuang, S. H. Chiou, C. H. Huang, W. B. Yang, C. H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7831.
- [100] Y. Honda, S. Honda, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *959*, 466.
- [101] M. G. Benedetti, A. L. Foster, M. C. Vantipalli, M. P. White, J. N. Sampayo, M. S. Gill, A. Olsen, G. J. Lithgow, *Exp. Gerontol.* **2008**, *43*, 882.
- [102] N. Ishii, N. Senoo-Matsuda, K. Miyake, K. Yasuda, T. Ishii, P. S. Hartman, S. Furukawa, *Mech. Ageing Dev.* **2004**, *125*, 41.
- [103] N. Saul, K. Pietsch, R. Menzel, S. R. Sturzenbaum, C. E. Steinberg, *J. Gerontol. Ser. A* **2010**, *65*, 626.
- [104] M. A. Wilson, B. Shukitt-Hale, W. Kalt, D. K. Ingram, J. A. Joseph, C. A. Wolkow, *Aging Cell* **2006**, *5*, 59.
- [105] A. Dillin, A. L. Hsu, N. Arantes-Oliveira, J. Lehrer-Graiwer, H. Hsin, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer, C. Kenyon, *Science* **2002**, *298*, 2398.
- [106] S. S. Lee, R. Y. Lee, A. G. Fraser, R. S. Kamath, J. Ahringer, G. Ruvkun, *Nat. Genet.* **2003**, *33*, 40.
- [107] J. Feng, F. Bussiere, S. Hekimi, *Dev. Cell* **2001**, *1*, 633.
- [108] L. A. Herndon, P. J. Schmeissner, J. M. Dudaronek, P. A. Brown, K. M. Listner, Y. Sakano, M. C. Paupard, D. H. Hall, M. Driscoll, *Nature* **2002**, *419*, 808.
- [109] S. E. Hulme, S. S. Shevkoplyas, A. P. McGuigan, J. Apfeld, W. Fontana, G. M. Whitesides, *Lab Chip* **2010**, *10*, 589.
- [110] M. J. Gravato-Nobre, H. R. Nicholas, R. Nijland, D. O'Rourke, D. E. Whittington, K. J. Yook, J. Hodgkin, *Genetics* **2005**, *171*, 1033.
- [111] M. Christensen, A. Estevez, X. Yin, R. Fox, R. Morrison, M. McDonnell, C. Gleason, D. M. Miller III, K. Strange, *Neuron* **2002**, *33*, 503.
- [112] J. S. Duerr, *Immunohistochemistry* (June 19, 2006), *WormBook*, ed. *WormBook*, The *C. elegans* Research Community, doi/10.1895/wormbook.1.105.1, <http://www.wormbook.org>.

- [113] A. Mádi, S. Mikkat, C. Koy, B. Ringel, H.-J. Thiesen, M. O. Glocker, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2008**, *1784*, 1763.
- [114] B. B. J. Tops, S. Gauci, A. J. R. Heck, J. Krijgsveld, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 341.
- [115] M.-Q. Dong, J. D. Venable, N. Au, T. Xu, S. K. Park, D. Cocciova, J. R. Johnson, A. Dillin, J. R. Yates III, *Science* **2007**, *317*, 660.
- [116] J. Krijgsveld, R. F. Ketting, T. Mahmudi, J. Johansen, M. Artal-Sanz, C. P. Verrijzer, R. H. Plasterk, A. J. Heck, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 927.
- [117] J. Li, T. Cai, P. Wu, Z. Cui, X. Chen, J. Hou, Z. Xie, P. Xue, L. Shi, P. Liu, J. R. Yates III, F. Yang, *Proteomics* **2009**, *9*, 4539.
- [118] K. Nishiwaki, Y. Kubota, Y. Chigira, S. K. Roy, M. Suzuki, M. Schwarzstein, Y. Jigami, N. Hisamoto, K. Matsumoto, *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 31.
- [119] J. A. Hanover, M. E. Forsythe, P. T. Hennessey, T. M. Brodigan, D. C. Love, G. Ashwell, M. Krause, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11266.
- [120] S. T. Laughlin, C. R. Bertozzi, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 1068.
- [121] C. M. Dempsey, S. M. Mackenzie, A. Gargus, G. Blanco, J. Y. Sze, *Genetics* **2005**, *169*, 1425.
- [122] F. U. Hartl, M. Hayer-Hartl, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 574.
- [123] J. Drake, C. D. Link, D. A. Butterfield, *Neurobiol. Aging* **2003**, *24*, 415.
- [124] C. Y. Ewald, C. Li, *Brain Struct. Funct.* **2009**, *214*, 263.
- [125] S. M. Yatin, S. Varadarajan, C. D. Link, D. A. Butterfield, *Neurobiol. Aging* **1999**, *20*, 325.
- [126] T. Gidalevitz, A. Ben-Zvi, K. H. Ho, H. R. Brignull, R. I. Morimoto, *Science* **2006**, *311*, 1471.
- [127] J. F. Morley, H. R. Brignull, J. J. Weyers, R. I. Morimoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10417.
- [128] J.-C. Rochet, P. T. Lansbury, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 60.
- [129] C. D. Link, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9368.
- [130] D. Kokel, D. Xue, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 2010.
- [131] J. M. Pinkston, D. Garigan, M. Hansen, C. Kenyon, *Science* **2006**, *313*, 971.
- [132] J. Pinkston-Gosse, C. Kenyon, *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 1403.
- [133] J. Downward, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11.
- [134] G. J. Beitel, S. G. Clark, H. R. Horvitz, *Nature* **1990**, *348*, 503.
- [135] S. G. Clark, M. J. Stern, H. R. Horvitz, *Nature* **1992**, *356*, 340.
- [136] M. Han, A. Golden, Y. Han, P. W. Sternberg, *Nature* **1993**, *363*, 133.
- [137] G. Ludewig, L. Lehmann, H. Esch, L. W. Robertson, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2008**, *25*, 241.
- [138] G. I. Evan, K. H. Vousden, *Nature* **2001**, *411*, 342.
- [139] M. M. Metzstein, G. M. Stanfield, H. R. Horvitz, *Trends Genet.* **1998**, *14*, 410.
- [140] D. Kokel, Y. Li, J. Qin, D. Xue, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 338.
- [141] A. Buckpitt, B. Boland, M. Isbell, D. Morin, M. Shultz, R. Baldwin, K. Chan, A. Karlsson, C. Lin, A. Taff, J. West, M. Fanucchi, L. Van Winkle, C. Plopper, *Drug Metab. Rev.* **2002**, *34*, 791.
- [142] R. Snyder, C. C. Hedli, *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104* (Suppl. 6), 1165.
- [143] A. R. Burns, I. M. Wallace, J. Wildenhain, M. Tyers, G. Giaever, G. D. Bader, C. Nislow, S. R. Cutler, P. J. Roy, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 549.
- [144] P. J. Hotez, P. J. Brindley, J. M. Bethony, C. H. King, E. J. Pearce, J. Jacobson, *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 1311.
- [145] P. J. Brindley, M. Mitreva, E. Ghedin, S. Lustigman, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2009**, *3*, e538.
- [146] T. G. Geary, D. P. Thompson, *Vet. Parasitol.* **2001**, *101*, 371.
- [147] J. S. Gilleard, D. J. Woods, J. A. Dow, *Trends Parasitol.* **2005**, *21*, 302.
- [148] C. Dieterich, R. J. Sommer, *Trends Genet.* **2009**, *25*, 203.
- [149] M. Mitreva, M. L. Blaxter, D. M. Bird, J. P. McCarter, *Trends Genet.* **2005**, *21*, 573.
- [150] D. T. Jamison, A. Creese, T. Prentice, *The World Health Report 1999: Making a Difference*, The World Health Organization, Geneva, **1999**.
- [151] J. Bethony, S. Brooker, M. Albonico, S. M. Geiger, A. Loukas, D. Diemert, P. J. Hotez, *Lancet* **2006**, *367*, 1521.
- [152] S. Geerts, B. Gryseels, *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13*, 207.
- [153] M. Albonico, Q. Bickle, M. Ramsan, A. Montresor, L. Savioli, M. Taylor, *Bull. World Health Organ.* **2003**, *81*, 343.
- [154] M. Moran, J. Guzman, K. Henderson, A.-L. Ropars, A. McDonald, L. McSherry, L. Wu, B. Omune, A. Illmer, T. Strum et al., *Neglected Disease Research & Development: New Times, New Trends*, The George Institute for International Health, Sydney, **2009**.
- [155] D. P. Knox, P. Geldhof, A. Visser, C. Britton, *Trends Parasitol.* **2007**, *23*, 105.
- [156] M. S. Kwa, J. G. Veenstra, M. Van Dijk, M. H. Roos, *J. Mol. Biol.* **1995**, *246*, 500.
- [157] A. L. Scott, E. Ghedin, *Parasitol. Int.* **2009**, *58*, 6.
- [158] C. Britton, L. Murray, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *122*, 21.
- [159] S. Ranganathan, R. Menon, R. B. Gasser, *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 439.
- [160] M. Driscoll, E. Dean, E. Reilly, E. Bergholz, M. Chalfie, *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 2993.
- [161] R. Kaminsky, P. Ducray, M. Jung, R. Clover, L. Rufener, J. Bouvier, S. S. Weber, A. Wenger, S. Wieland-Berghausen, T. Goebel et al., *Nature* **2008**, *452*, 176.
- [162] S. Hashmi, W. Tawe, S. Lustigman, *Trends Parasitol.* **2001**, *17*, 387.
- [163] P. McVeigh, T. G. Geary, N. J. Marks, A. G. Maule, *Trends Parasitol.* **2006**, *22*, 385.
- [164] S. Hartmann, R. Lucius, *Int. J. Parasitol.* **2003**, *33*, 1291.
- [165] J. Croese, J. O'Neil, J. Masson, S. Cooke, W. Melrose, D. Pritchard, R. Speare, *Gut* **2006**, *55*, 136.
- [166] S. Tawill, L. Le Goff, F. Ali, M. Blaxter, J. E. Allen, *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 398.
- [167] S. M. Politz, M. Philipp, *Parasitol. Today* **1992**, *8*, 6.
- [168] L. Murray, P. Geldhof, D. Clark, D. P. Knox, C. Britton, *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37*, 1117.
- [169] P. B. Allen, A. E. Sgro, D. L. Chao, B. E. Doeppker, J. Scott Edgar, K. Shen, D. T. Chiu, *J. Neurosci. Methods* **2008**, *173*, 20.
- [170] A. J. Chang, C. I. Bargmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 7321.
- [171] A. J. Chang, N. Chronis, D. S. Karow, M. A. Marletta, C. I. Bargmann, *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e274.
- [172] T. V. Chokshi, A. Ben-Yakar, N. Chronis, *Lab Chip* **2009**, *9*, 151.
- [173] N. Chronis, M. Zimmer, C. I. Bargmann, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 727.
- [174] K. Chung, M. M. Crane, H. Lu, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 637.
- [175] K. Chung, H. Lu, *Lab Chip* **2009**, *9*, 2764.
- [176] S. Chung, D. Clark, C. Gabel, E. Mazur, A. Samuel, *BMC Neurosci.* **2006**, *7*, 30.
- [177] J. Clausell-Tormos, D. Lieber, J. C. Baret, A. El-Harrak, O. J. Miller, L. Frenz, J. Blouwolff, K. J. Humphry, S. Koster, H. Duan, C. Holtze, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, C. A. Merten, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 427.
- [178] M. M. Crane, K. Chung, H. Lu, *Lab Chip* **2009**, *9*, 38.
- [179] X. Cui, L. M. Lee, X. Heng, W. Zhong, P. W. Sternberg, D. Psaltis, C. Yang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10670.
- [180] B. Pinan-Lucarre, C. V. Gabel, S. E. Hulme, S. S. Shevkoplyas, R. D. Slone, J. Xue, Y. Qiao, S. Weisberg, G. M. Whitesides, A. D. T. Samuel, et al., *Nature Neurosci.*, eingereicht.
- [181] J. M. Gray, D. S. Karow, H. Lu, A. J. Chang, J. S. Chang, R. E. Ellis, M. A. Marletta, C. I. Bargmann, *Nature* **2004**, *430*, 317.

- [182] S. X. Guo, F. Bourgeois, T. Chokshi, N. J. Durr, M. A. Hilliard, N. Chronis, A. Ben-Yakar, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 531.
- [183] X. Heng, D. Erickson, L. R. Baugh, Z. Yaqoob, P. W. Sternberg, D. Psaltis, C. Yang, *Lab Chip* **2006**, *6*, 1274.
- [184] S. E. Hulme, S. S. Shevkoplyas, J. Apfeld, W. Fontana, G. M. Whitesides, *Lab Chip* **2007**, *7*, 1515.
- [185] N. Kim, C. M. Dempsey, J. V. Zoval, J.-Y. Sze, M. J. Madou, *Sens. Actuators B* **2007**, *122*, 511.
- [186] D. Lange, C. W. Storment, C. A. Conley, G. T. A. Kovacs, *Sens. Actuators B* **2005**, *107*, 904.
- [187] S. R. Lockery, K. J. Lawton, J. C. Doll, S. Faumont, S. M. Coulthard, T. R. Thiele, N. Chronis, K. E. McCormick, M. B. Goodman, B. L. Pruitt, *J. Neurophysiol.* **2008**, *99*, 3136.
- [188] H. Ma, L. Jiang, W. Shi, J. Qin, B. Lin, *Biomicrofluidics* **2009**, *3*, 044114.
- [189] S. Park, H. Hwang, S. W. Nam, F. Martinez, R. H. Austin, W. S. Ryu, *PLoS One* **2008**, *3*, e2550.
- [190] J. Qin, A. R. Wheeler, *Lab Chip* **2007**, *7*, 186.
- [191] P. Rezai, A. Siddiqui, P. R. Selvaganapathy, B. P. Gupta, *Lab Chip* **2010**, *10*, 220.
- [192] C. B. Rohde, F. Zeng, R. Gonzalez-Rubio, M. Angel, M. F. Yanik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13891.
- [193] F. Zeng, C. B. Rohde, M. F. Yanik, *Lab Chip* **2008**, *8*, 653.
- [194] Y. Zhang, H. Lu, C. I. Bargmann, *Nature* **2005**, *438*, 179.
- [195] M. Zimmer, J. M. Gray, N. Pokala, A. J. Chang, D. S. Karow, M. A. Marletta, M. L. Hudson, D. B. Morton, N. Chronis, C. I. Bargmann, *Neuron* **2009**, *61*, 865.
- [196] W. Shi, J. Qin, N. Ye, B. Lin, *Lab Chip* **2008**, *8*, 1432.
- [197] J. Krajniak, H. Lu, *Lab Chip* **2010**, *10*, 1862.
- [198] J. N. Stirman, M. Brauner, A. Gottschalk, H. Lu, *J. Neurosci. Methods* **2010**, *191*, 90.
- [199] D. B. Weibel, W. R. DiLuzio, G. M. Whitesides, *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 209.
- [200] Y. Xia, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 568; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 550.
- [201] H. Hutter in *C. elegans. Methods and Applications*, Vol. 351 (Hrsg.: K. Strange), Humana, Totowa, **2006**, S. 155–174.
- [202] R. Kerr, V. Lev-Ram, G. Baird, P. Vincent, R. Y. Tsien, W. R. Schafer, *Neuron* **2000**, *26*, 583.
- [203] C. I. Bargmann, L. Avery, *Methods Cell Biol.* **1995**, *48*, 225.
- [204] M. F. Yanik, H. Cinar, H. N. Cinar, A. D. Chisholm, Y. Jin, A. Ben-Yakar, *Nature* **2004**, *432*, 822.
- [205] A. C. Hart, ed., Behavior (July 3, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.87.1, http://www.wormbook.org.
- [206] M. A. Hilliard, A. J. Apicella, R. Kerr, H. Suzuki, P. Bazzicalupo, W. R. Schafer, *EMBO J.* **2005**, *24*, 63.
- [207] J. D. Corbett, M. R. Cho, D. E. Golan, *Biophys. J.* **1994**, *66*, 25.
- [208] M. A. Unger, H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S. R. Quake, *Science* **2000**, *288*, 113.
- [209] R. Pulak in *C. elegans. Methods and Applications*, Vol. 351 (Hrsg.: K. Strange), Humana, Totowa, **2006**, S. 275–286.
- [210] L. Luo, C. V. Gabel, H. I. Ha, Y. Zhang, A. D. Samuel, *J. Neurophysiol.* **2008**, *99*, 2617.
- [211] W. S. Ryu, A. D. T. Samuel, *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 5727.
- [212] D. A. Clark, C. V. Gabel, T. M. Lee, A. D. Samuel, *J. Neurophysiol.* **2007**, *97*, 1903.
- [213] D. Ramot, B. E. Johnson, T. L. Berry, Jr., L. Carnell, M. B. Goodman, *PLoS One* **2008**, *3*, e2208.
- [214] C. V. Gabel, H. Gabel, D. Pavlichin, A. Kao, D. A. Clark, A. D. T. Samuel, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 7586.
- [215] I. Mori, H. Sasakura, A. Kuhara, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2007**, *17*, 712.
- [216] G. A. Nelson, T. A. Jones, A. Chesnut, A. L. Smith, *J. Radiat. Res.* **2002**, *43 Suppl*, S199.
- [217] A. Ward, J. Liu, Z. Feng, X. Z. S. Xu, *Nat. Neurosci.* **2008**, *11*, 916.
- [218] H. Ye, B. Ye, D. Wang, *Neurobiol. Learn. Mem.* **2008**, *90*, 10.
- [219] S. H. Simonetta, D. A. Golombek, *J. Neurosci. Methods* **2007**, *161*, 273.
- [220] C. Fang-Yen, L. Avery, A. D. Samuel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20093.
- [221] J. M. Zengel, H. F. Epstein, *Cell Motil.* **1980**, *1*, 73.
- [222] T. Hellerer, C. Axang, C. Brackmann, P. Hillertz, M. Pilon, A. Enejder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 14658.
- [223] S. Ward, N. Thomson, J. G. White, S. Brenner, *J. Comp. Neurol.* **1975**, *160*, 313.
- [224] R. A. Butcher, J. R. Ragains, E. Kim, J. Clardy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14288.
- [225] P. Y. Jeong, M. Jung, Y. H. Yim, H. Kim, M. Park, E. Hong, W. Lee, Y. H. Kim, K. Kim, Y. K. Paik, *Nature* **2005**, *433*, 541.
- [226] B. J. Blaise, J. Giacomotto, B. Elena, M. E. Dumas, P. Toulhoat, L. Segalat, L. Emsley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 19808.
- [227] B. J. Blaise, J. Giacomotto, M. N. Triba, P. Toulhoat, M. Piotto, L. Emsley, L. Segalat, M. E. Dumas, B. Elena, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 2542.
- [228] S. J. Park, M. B. Goodman, B. L. Pruitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17376.
- [229] J. C. Doll, N. Harjee, N. Klejwa, R. Kwon, S. M. Coulthard, B. Petzold, M. B. Goodman, B. L. Pruitt, *Lab Chip* **2009**, *9*, 1449.
- [230] W. A. Van Voorhies, S. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11399.
- [231] H. Suda, T. Shouyama, K. Yasuda, N. Ishii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 839.
- [232] K. Houthooft, B. P. Braeckman, I. Lenaerts, K. Brys, F. Matthijssens, A. De Vreese, S. Van Eygen, J. R. Vanfleteren, *Neurobiol. Aging* **2005**, *26*, 689.
- [233] C. Lagido, J. Pettitt, A. J. Porter, G. I. Paton, L. A. Glover, *FEBS Lett.* **2001**, *493*, 36.
- [234] J. E. Richmond, Electrophysiological Recordings from the Neuromuscular Junction of *C. elegans* (October 6, 2006), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, http://www.wormbook.org.
- [235] D. M. Raizen, L. Avery, *Neuron* **1994**, *12*, 483.
- [236] J. Ahringer, Reverse Genetics (August 20, 2005), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.47.1, http://www.wormbook.org.
- [237] B. R. Stockwell, *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 116.
- [238] G. M. Whitesides, V. M. Krishnamurthy, *Q. Rev. Biophys.* **2005**, *38*, 385.
- [239] D. G. Gibson, G. A. Benders, C. Andrews-Pfankoch, E. A. Denisova, H. Baden-Tillson, J. Zaveri, T. B. Stockwell, A. Brownley, D. W. Thomas, M. A. Algire et al., *Science* **2008**, *319*, 1215.
- [240] S. Aparicio, J. Chapman, E. Stupka, N. Putnam, J. M. Chia, P. Dehal, A. Christoffels, S. Rash, S. Hoon, A. Smit et al., *Science* **2002**, *297*, 1301.
- [241] M. Asashima, Y. Ito, T. Chan, T. Michiue, M. Nakanishi, K. Suzuki, K. Hitachi, K. Okabayashi, A. Kondow, T. Ariizumi, *Dev. Dyn.* **2009**, *238*, 1309.
- [242] B. De Groef, S. V. Grommen, V. M. Darras, *Mol. Cell. Endocrinol.* **2008**, *293*, 17.
- [243] S. N. Austad, *J. Gerontol. Ser. A* **2009**, *64*, 192.
- [244] A. Sánchez Alvarado, *C. R. Biol.* **2007**, *330*, 498.
- [245] C. Kenyon, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2011**, *366*, 9.
- [246] M. O. Hengartner, H. R. Horvitz, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1994**, *345*, 243.
- [247] J. Giacomotto, L. Segalat, *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *160*, 204.
- [248] R. S. Kamath, A. G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D. P. Welchman, P. Zipperlen, J. Ahringer, *Nature* **2003**, *421*, 231.
- [249] U. Al-Atar, R. Fernandes, B. Johnsen, D. Baillie, N. R. Branda, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15966.

- [250] L. Ségalat, *ACS Chem. Biol.* **2007**, 2, 231.
- [251] F. R. Blattner, G. Plunkett 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew et al., *Science* **1997**, 277, 1453.
- [252] P. Stragier, R. Losick, *Annu. Rev. Genet.* **1996**, 30, 297.
- [253] N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, 35, 322.
- [254] D. R. Smith, L. A. Doucette-Stamm, C. Deloughery, H. Lee, J. Dubois, T. Aldredge, R. Bashirzadeh, D. Blakely, R. Cook, K. Gilbert et al., *J. Bacteriol.* **1997**, 179, 7135.
- [255] P. Renesto, H. Ogata, S. Audic, J. M. Claverie, D. Raoult, *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, 29, 99.
- [256] P. D. Curtis, Y. V. Brun, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, 74, 13.
- [257] R. D. Adam, *Clin. Microbiol. Rev.* **2001**, 14, 447.
- [258] D. F. Mandoli, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1998**, 49, 173.
- [259] D. Elrad, A. R. Grossman, *Curr. Genet.* **2004**, 45, 61.
- [260] M. Schmidt, G. Gessner, M. Luff, I. Heiland, V. Wagner, M. Kaminski, S. Geimer, N. Eitzinger, T. Reissenweber, O. Voytsekh et al., *Plant Cell* **2006**, 18, 1908.
- [261] S. J. Annesley, P. R. Fisher, *Mol. Cell. Biochem.* **2009**, 329, 73.
- [262] L. K. Fritz-Laylin, S. E. Prochnik, M. L. Ginger, J. B. Dacks, M. L. Carpenter, M. C. Field, A. Kuo, A. Paredez, J. Chapman, J. Pham et al., *Cell* **2010**, 140, 631.
- [263] I. Hershkowitz, *Microbiol. Rev.* **1988**, 52, 536.
- [264] S. Leonelli, *Endeavour* **2007**, 31, 34.
- [265] R. L. Wallace, *Integr. Comp. Biol.* **2002**, 42, 660.
- [266] *The Nematode Caenorhabditis elegans* (Hrsg.: W. B. Wood), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988.
- [267] M. T. Yamamoto, *Exp. Anim.* **2010**, 59, 125.
- [268] R. L. Morris, M. P. Hoffman, R. A. Obar, S. S. McCafferty, I. R. Gibbons, A. D. Leone, J. Cool, E. L. Allgood, A. M. Musante, K. M. Judkins et al., *Dev. Biol.* **2006**, 300, 219.
- [269] A. R. Kriegstein, V. Castellucci, E. R. Kandel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, 71, 3654.
- [270] R. Dahm, R. Geisler, C. Nüsslein-Volhard in *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, Vol. 15, 2nd ed. (Hrsg.: R. A. Meyers), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**, S. 593–626.
- [271] *Biology of the Laboratory Mouse* (Hrsg.: E. L. Green), Dover, New York, **1968**.
- [272] The Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium, *Nature* **2005**, 437, 69.
- [273] B. R. Ellerbrock, E. M. Coscarelli, M. E. Gurney, T. G. Geary, *J. Biomol. Screening* **2004**, 9, 147.
- [274] C. D. Link, C. J. Johnson, V. Fonte, M. Paupard, D. H. Hall, S. Styren, C. A. Mathis, W. E. Klunk, *Neurobiol. Aging* **2001**, 22, 217.
- [275] P. W. Faber, C. Voisine, D. C. King, E. A. Bates, A. C. Hart, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 17131.
- [276] C. Voisine, H. Varma, N. Walker, E. A. Bates, B. R. Stockwell, A. C. Hart, *PLoS One* **2007**, 2, e504.
- [277] P. Cao, Y. Yuan, E. A. Pehek, A. R. Moise, Y. Huang, K. Palczewski, Z. Feng, *PLoS One* **2010**, 5, e9312.
- [278] M. Lakso, S. Virtainen, A. M. Moilanen, J. Sirvio, J. H. Thomas, R. Nass, R. D. Blakely, G. Wong, *J. Neurochem.* **2003**, 86, 165.
- [279] C. Bessou, J. B. Giugia, C. J. Franks, L. Holden-Dye, L. Segalat, *Neurogenetics* **1998**, 2, 61.
- [280] A. Gaud, J. M. Simon, T. Witzel, M. Carre-Pierrat, C. G. Wermuth, L. Segalat, *Neuromuscul. Disord.* **2004**, 14, 365.
- [281] S. S. Siddiqui, S. Loganathan, S. Krishnaswamy, L. Faoro, R. Jagadeeswaran, R. Salgia, *Cancer Biol. Ther.* **2008**, 7, 856.
- [282] R. Francis, M. K. Barton, J. Kimble, T. Schedl, *Genetics* **1995**, 139, 579.
- [283] R. A. Alegado, M. C. Campbell, W. C. Chen, S. S. Slutz, M. W. Tan, *Cell. Microbiol.* **2003**, 5, 435.
- [284] N. Ventura, S. L. Rea, R. Testi, *Exp. Gerontol.* **2006**, 41, 974.
- [285] M. Markaki, N. Tavernarakis, *Biotechnol. J.* **2010**, 5, 1261–1276.