

# ein fadenwurm bereichert die systembiologie

*Caenorhabditis elegans* ist einer der elegantesten Modellorganismen

von Marlon Stoeckius

*Caenorhabditis elegans* ist ein etwa 1 Millimeter langer, transparenter, im Boden vorkommender Fadenwurm (Abb.1). Er wurde in den 60er Jahren vom Biologen Sydney Brenner anfangs als Modell zur Erforschung der Nervenentwicklung genutzt. In den darauffolgenden Jahren etablierte sich *C. elegans* als ein Modellsystem für die Zellteilung und die Embryonalentwicklung. Viele grundlegende Mechanismen funktionieren im Wurm sehr ähnlich wie im Menschen. So ist er heute einer der beliebtesten Modellorganismen für Entwicklungsbiologen und ebenso ein weit verbreitetes Modellsystem für die Erforschung der molekularen Grundlagen von vielen Krankheiten wie zum Beispiel Krebs, Diabetes, Parkinson und Alzheimer. Ein weiteres und eher junges Forschungsfeld ist die Funktion von kleinen RNAs, wie zum Beispiel microRNAs, die in *C. elegans* erstmals entdeckt wurden. Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung des Wurms sind sehr gut etabliert und bieten den Forschern viele Ansätze, grundlegende Phänomene und Mechanismen zu analysieren. Dies führte nicht zuletzt dazu, dass für Entdeckungen in *C. elegans* bereits drei Nobelpreise vergeben wurden.

## Randvoller Werkzeugkasten für Systembiologen

Auch aus der Systembiologie ist *C. elegans* seit jüngster Zeit nicht mehr wegzudenken. Der Hauptgrund dafür ist, dass sein molekularbiologischer und biochemischer Werkzeugkasten üppig ausgestattet ist. Die Grundsteine legte ein Konsortium von Wissenschaftlern, das 1998 das Erbgut (Genom) des Wurms als ersten vielzelligen Organismus vollständig entschlüsselte (Sequencing Consortium, 1998). Noch heute, auch 10 Jahre nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms, ist das vergleichsweise kleine Genom des Wurms (etwa 100 Megabasen) das am besten kartierte Genom eines Vielzelllers. Das Erbgut des Wurms kann mit modernen Methoden relativ einfach manipuliert werden. So können fremde oder veränderte Gene zielgenau in das Genom eingebaut werden (MosSCI; Frøkjær-Jensen *et al.*, 2008). Für die Veränderung von Genen können sich Wurmforscher ‚Genbanken‘ zunutze machen, in denen fast alle Gene (ORFeome; Lamesch *et al.*, 2004) und regulatorischer Elemente (Promoterome; Dupuy *et al.*, 2004, 3'UTRome; F. Piano Labor) aus dem Genom des Wurms isoliert wurden. Diese können dann wie in einem Baukasten frei kombiniert werden. Gene können in *C. elegans* durch Fütterung mit speziellen Bakterien vergleichsweise einfach ausgeschaltet werden (RNAi feeding; Boutros and Ahringer, 2008). Darüber hinaus können ebenfalls spezifische Regionen aus dem Genom gelöscht werden (MosDEL; Frøkjær-Jensen *et al.*, 2010). Der Wurm

Abbildung 1: *Caenorhabditis elegans*



Der ein Millimeter große Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist ein beliebter Modellorganismus.



Marlon Stoeckius nutzt den Fadenwurm für die Erforschung der molekularen Grundlagen der frühen Embryonalentwicklung (Photo: Alexander Baltz @ BIMSB).

kann auf Agarplatten mit bis zu 384 Kammern, wie in separaten Lebensräumen, kultiviert werden. Das erlaubt die Durchführung von parallelisierten automatisierten Hochdurchsatzscreens, in denen etwa jedes Gen des Wurms im Zeitraum von nur einer Woche einzeln ausgeschaltet wird. Sowohl der Embryo als auch der erwachsene Wurm ist bei *C. elegans* transparent, und seine Entwicklung verläuft immer stereotyp. Das erlaubt die Beobachtung einzelner Zellen im lebenden Embryo und Wurm unter dem Mikroskop. So ist der Ursprung und das Schicksal einer jeden Zelle, vom Einzell-Stadium zur schlüpfenden Larve mit 558 Zellen bis zum erwachsenen Wurm mit 959 somatischen Zellen, beschrieben (Sulston *et al.*, 1983). Heute kann die Embryonalentwicklung mithilfe bildgebender Verfahren automatisiert überwacht werden. In Kombination mit dem Ausschalten von bestimmten Genen im Embryo können Veränderungen der charakteristischen Zellteilungsmuster automatisch erkannt werden. Damit können Hypothesen zur Funktion des Gens aufgestellt werden. Über 13.000 genetisch manipulierte Würmer (CGC, März 2011) wurden in den vergangenen Jahrzehnten von Wissenschaftlern generiert, in denen einzelne Gene gelöscht, mutiert oder mit einem Fluoreszenzmarker markiert wurden. Dadurch ist eine enorme Ressource entstanden, die nach dem 'open-access' Prinzip unter den Wissenschaftlern geteilt wird. Im Gegensatz zu vielen anderen Modellorganismen können diese Würmer einfach im Tiefkühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Neben den Ressourcen an Labor-Methoden stehen mittlerweile auch hunderte von Datensätzen aus Hochdurchsatzexperimenten in Datenbanken zur Verfügung. Ein kürzlich beendetes Projekt für die systematische Kartierung von regulatorischen Elementen im Genom hat neben der Etablierung neuer Methoden auch mehrere Terabytes an Daten produziert, die nun frei zur Verfügung stehen (ModENCODE; Gerstein *et al.*, 2010). Zusammen genommen machen diese Ressourcen *C. elegans* zu einem idealen vielzelligen Modell für die Systembiologie.

### Woran es fehlt(e)

Moderne DNA-Sequenzieretechnologien erlauben quantitative Analysen von allen eingeschalteten Genen (RNA-Expression) in sämtlichen Organismen. Das quantitative Erfassen von Proteinen, wie es seit einigen Jahren in der Zellkultur genutzt wird (SILAC; Ong *et al.*, 2002),

kann bislang in den meisten Modellorganismen noch nicht angewendet werden. So wurden bislang Hypothesen über die Funktion von bestimmten Genen nur durch mikroskopische Veränderungen am Wurm, durch RNA-Expressionsänderung und durch die Messung von einzelnen wenigen ausgewählten Proteinen aufgestellt.

Letztendlich müssen für das Verständnis von biologischen Prozessen auch die Menge, die Identität und die Dynamik der Stoffwechselprodukte in einem Organismus quantitativ bestimmt werden. Der Stoffwechsel ist sowohl in einzelligen als auch in vielzelligen Modellsystemen ein unzureichend erschlossenes Forschungsgebiet. (Metabolomics; Oliver, 2006). Hochdurchsatz-Forschungsprojekte in *C. elegans* erfordern hier sowohl die Optimierung der Methoden als auch eine neuartige Herangehensweise an die Datenanalyse. Nachdem der Wurm geschlüpft ist, kann er über seinen Lebenszyklus hinweg synchron in großen Mengen kultiviert werden, wodurch genug Untersuchungsmaterial (z.B. RNA und Proteine) für Analysen von gleichalten Würmern zur Verfügung steht. Quantitative Analysen beruhen bisher allerdings überwiegend auf Messungen des kompletten Wurms, was zu einem Vermischen der verschiedenen Gewebe führt. So ist es beispielsweise schwer, auseinanderzuhalten, welche Gene spezifisch in Muskeln oder Nerven eingeschaltet sind. In Zukunft werden Methoden etabliert werden müssen, die Hochdurchsatzmessungen gezielt in den einzelnen Geweben und Zellen erlauben.

Ähnliche Hürden müssen für die Erforschung der Embryonalentwicklung überwunden werden. Der erwachsene Wurm trägt Embryonen unterschiedlichen Alters in sich – von der einzelligen Zygote bis zur schlüpfenden Larve mit 558 Zellen. Materialintensive Messungen beruhen stets auf heterogenen Populationen von Embryonen unterschiedlicher Zellstadien. Für genauere Untersuchungen der Abfolge von zeitlichen Ereignissen während der Embryonalentwicklung mussten bisher Embryonen nach Alter unter dem Mikroskop sortiert werden. Bei diesem zeitaufwendigen manuellen Sortieren können nicht die Mengen an Embryonen isoliert werden, die für Analysen der RNA-Expression oder Proteinexpression benötigt werden. Mit einer ruhigen Hand können etwa 500 Embryonen am Tag gesammelt werden, moderne Hochdurchsatzanalysen benötigen jedoch über 100.000 Embryonen.

Einzellige *C. elegans* Embryonen.

### Automatisiertes Sortieren von Embryonen gleichen Alters

Wir haben eine Methode entwickelt, mit der zehntausende Embryonen gleichen Entwicklungsstadiums innerhalb kurzer Zeit mithilfe eines klassischen Zellsortierers (FACS) isoliert werden können (Abb. 2). Grundvoraussetzung für das Verfahren, welches wir eFACS taufte, ist ein Wurmstamm, der ein fluoreszierendes Protein in nur einem bestimmten Zellstadium spezifisch produziert. Die Fluoreszenz dient dann als Marker für das gewünschte Stadium und wird vom Zellsortierer spezifisch erkannt. Wir nutzen diese Methode, um große Mengen von einzelligen und zweizelligen Embryonen sortieren zu können. Grundsätzlich kann die Methode aber für die Isolierung von Embryonen jedes beliebigen Entwicklungsstadiums eingesetzt werden. Dadurch eröffnet eFACS das Tor zur systematischen Erforschung der Embryonalentwicklung mit modernen Hochdurchsatzmethoden in *C. elegans* (Stoeckius *et al.*, 2009).

### Quantifizieren von tausenden Proteinen

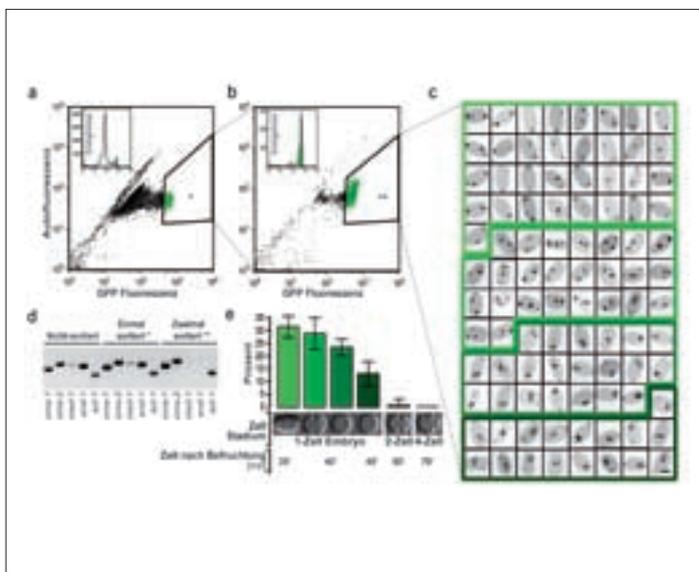
In Zusammenarbeit mit dem Labor von Matthias Selbach (MDC Berlin) haben wir im Labor von Nikolaus Rajewsky (BIMSB@MDC) eine neue Methode entwickelt, die es erlaubt, die Aktivität und

Menge tausender Proteine im Vergleich zweier *C. elegans*-Proben zu quantifizieren (Thierfelder *et al.*, in Vorbereitung). Dies eröffnet erstmalig Einblicke in Mengenveränderungen von Tausenden von Proteinen und erlaubt dadurch Rückschlüsse auf deren Funktion im lebenden Organismus. So kann nun untersucht werden, wie sich die Proteinmengen während der Entwicklung des Wurms verändern und wie sich gewisse Proteine verhalten, wenn ein bestimmtes Gen ausgeschaltet wird. Die Methode ermöglicht außerdem, die durch Signalketten aktivierten Proteine quantitativ zu messen (Phosphoproteom) und die Sensitivität von anderen im Wurm verwendeten Methoden zu verbessern (z.B. Co-IP).

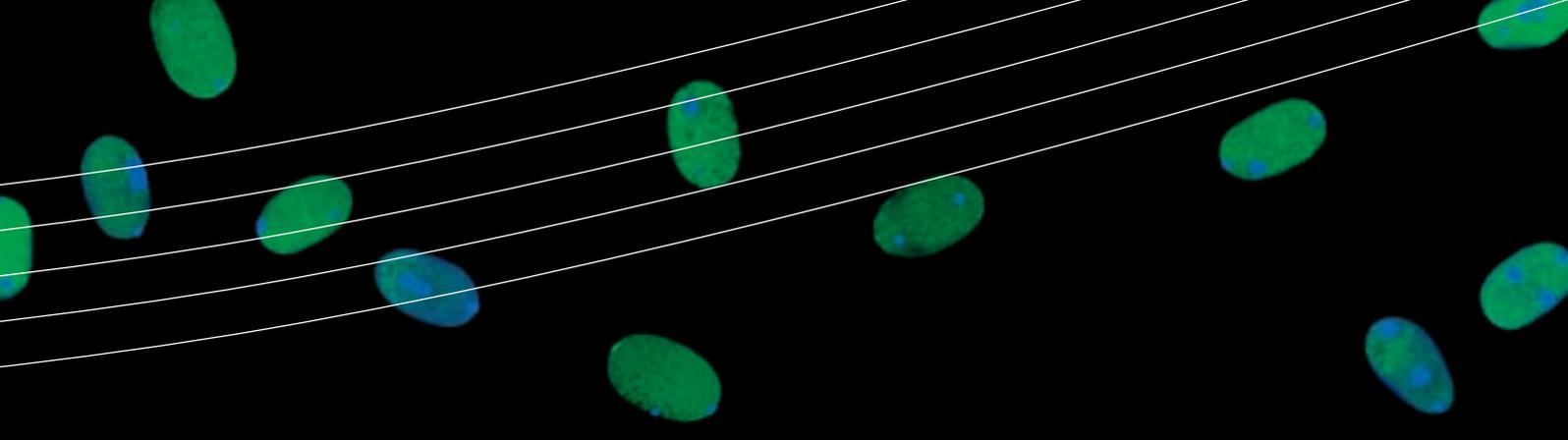
### Wie wird aus Spermium und Eizelle ein Embryo?

Die Fusion von zwei hochspezialisierten Zellen - Spermium und Eizelle - führt in kurzer Zeit zur Entstehung einer sich teilenden Zelle - der Zygote - aus der ein vollständiger Organismus hervorgeht. Es ist weitgehend unverstanden, wie dieser fundamentale Prozess in der Entwicklung jedes Lebewesens funktioniert. Zwar sind viele essentielle Faktoren bekannt, beispielsweise sind etwa 600 Gene für die Embryonalentwicklung von *C. elegans* essentiell (Sönnichsen *et al.*, 2005), die globalen Vorgänge bleiben hingegen

Abbildung 2: eFACS



Wir nutzen eFACS, um große Mengen von ein- und zweizelligen Embryonen zu sortieren. Dafür nutzen wir einen Wurmstamm, der ein Gen exprimiert, welches spezifisch für den einzelligen Embryo ist und an einen Fluoreszenzmarker (OMA-1-GFP) gekoppelt wurde. Die Methode hat routinemäßig eine Ausbeute von mehreren zehntausend Embryonen mit einer Reinheit größer als 98% (a). Der Scatterplot zeigt den ersten Sortierungsschritt von einzelligen OMA-1-GFP-Embryonen. Die GFP-positive Population (~3-5% einzellige Embryonen) wird selektiert und sortiert (b). Die GFP-positive Population hat nach der ersten Sortierung eine Reinheit von etwa 70% und muss erneut sortiert werden. Die Reinheit der zweifach sortierten GFP-positiven Population wird dann durch mikroskopische Untersuchung (c und e) und RT-PCRs (d) untersucht. Diese bestätigen eine Reinheit von mehr als 98% einzelliger Embryonen. (Bild aus Stoeckius *et al.*, 2009. Copyright Nature Methods).



ungeklärt. Interessanterweise werden diese 'frühen' Prozesse in allen studierten Lebewesen von Faktoren kontrolliert, die bereits vor der Befruchtung in Eizelle und Spermium vorhanden sind. Das wirft die Frage auf, wie groß bzw. wie essentiell der Anteil der Genprodukte von Eizelle und Spermium ist.

Im Labor von Nikolaus Rajewsky (BIMSB@MDC) nutzen wir *C. elegans* und die hier etablierten Methoden, um im genomweiten Ansatz Aufschluss über diese fundamentalen Reorganisations- und Reprogrammierungsprozesse zu bekommen. Für dieses Projekt messen wir sowohl kodierende- als auch nicht-kodierende RNAs und Proteine in Eizellen, Spermien, einzelligen und zweizelligen Embryonen. Die Daten geben uns nie dagewesene Einblicke in ein Zeitfenster der ersten Minuten in der frühen Embryonalentwicklung. Wir beobachten dynamische Mengenänderungen von RNAs und knapp 5.000 Proteinen. RNAs und Proteine verhalten sich sehr unterschiedlich, was auf ein großes Maß an posttranskriptioneller Genregulation schließen lässt. Darüber hinaus beobachten wir dynamische Veränderungen innerhalb und zwischen allen bekannten kleinen nicht-kodierenden RNA-Klassen (miRNAs, 21U-RNAs, 22G-RNAs, 26G-RNAs, und andere endo-siRNAs). Die Daten lassen die Hypothese zu, dass eine große Anzahl von kleinen RNAs, mRNAs und Proteinen im Embryo vermeintlich aus dem Spermium stammen. Dies weist auf einen unerforschten väterlichen Beitrag zur frühen Embryonalentwicklung hin. Außerdem legen die Daten den Schluss nahe, dass der einzellige *C. elegans*-Embryo möglicherweise schon transkriptionell aktiv ist. Die riesigen Datensätze werden zurzeit ausgewertet und in unabhängigen Versuchen validiert.

---

### Steckbrief Forschungsprojekt:

„Hochdurchsatzuntersuchungen des Proteoms und Transkriptom während der Reprogrammierung von Eizelle zur Zygote und der frühen Embryonalentwicklung von *C. elegans*“ in der Gruppe von Nikolaus Rajewsky, BIMSB Berlin. Förderung seit 2009 durch das BIMSB/NYU-PhD Austauschprogramm ([www.mdc-berlin.de/en/bimbs/index.html](http://www.mdc-berlin.de/en/bimbs/index.html)). Diese Arbeit ist Teil einer langjährigen Kollaboration mit Fabio Piano (NYU, USA).

### Danksagung:

Dieses Projekt ist Teil meiner Promotion im Labor von Nikolaus

Rajewsky. Ich danke meinen Kollegen Jonas Maaskola (Co-Erstautor der Nature Methods Publikation) und Dominic Grün (Co-Erstautor der in Vorbereitung befindlichen Publikation) für alle bioinformatischen und statistischen Analysen.

---

### Referenzen:

- Boutros M, and Ahringer J (2008) The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nature Reviews Genetics*, 9, 554-66.
- Dupuy D, *et al.* (2004) A first version of the *Caenorhabditis elegans* Promoterome. *Genome Research*, 14, 69-75.
- Frøkjær-Jensen C, *et al.* (2010) Targeted gene deletions in *C. elegans* using transposon excision. *Nature Methods*, 7, 451-53.
- Frøkjær-Jensen C, *et al.* (2008) Single-copy insertion of transgenes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Genetics*, 40, 1375-83.
- Gerstein MB *et al.* (2010) Integrative analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome by the modENCODE project. *Science*, 307, 1775-87.
- Lamesch P *et al.* (2004) *C. elegans* ORFeome version 3.1: increasing the coverage of ORFeome resources with improved gene predictions. *Genome Research* 14, 2064-9.
- Oliver SG (2006) From genomes to systems: the path with yeast. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 361, 477-82.
- Ong SE *et al.* (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, silac, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular Cellular Proteomics*, 1, 376-86.
- Sönnichsen B *et al.* (2005) Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 434, 462-69.
- Stoeckius M *et al.* (2009) Large-scale sorting of *C. elegans* embryos reveals the dynamics of small RNA expression. *Nature Methods*, 6, 745-51.
- Sulston JE *et al.* (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100, 64-119.

---

### Kontakt:

#### Marlon Stoeckius

Berlin Institute for Medical Systems Biology

MDC-Berlin

[marlon.stoeckius@mdc-berlin.de](mailto:marlon.stoeckius@mdc-berlin.de)

[www.mdc-berlin.de/en/bimbs](http://www.mdc-berlin.de/en/bimbs)