T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NEMATOD *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) MODEL ORGANİZMASINDA mTOR İNHİBİTÖRLERİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğba DEMİREL
(20209247003)

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK

SİVAS
TEMMUZ 2023

Tuğba DEMİREL'ın hazırladığı ve **"NEMATOD *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) MODEL ORGANİZMASINDA mTOR İNHİBİTÖRLERİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI"** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı **Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK**

……

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Necati ÖZPINAR**

……..……

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi

Jüri Üyesi **Doç. Dr. Binnur BAĞCI**

……..……...

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır

Prof. Dr. NEVCİHAN GÜRSOY

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 20.08.2014 tarihli ve 7 sayılı kararı ile kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Komisyonu tarafından F-2021-652 Nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

ETİK

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tez Yazım Kılavuzu (Yönerge)'nda belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- ✓ Bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- ✓ Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- ✓ Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere, bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu ve atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- ✓ Bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ✓ Tezin herhangi bir bölümünü, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi veya bir başka üniversitede, bir başka tez çalışması olarak sunmadığımı; beyan ederim.

13.07.2023

Tuğba DEMİREL

KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden sürekli yararlandığım, tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, çalışmamda büyük emeği olan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK ve çalışma arkadaşım Özgür Ülkü ÖZDEMİR'e çok teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi eğitimim boyunca yanımda olan ve beni destekleyen aileme özellikle annem Dürdane ALTUNBAYRAK, babam Ahmet Turan ALTUNBAYRAK ve Arif DEMİREL'e teşekkürü borç bilirim. Her konuda yanımda olduğu gibi tez çalışmamı hazırlarken de desteğini esirgemeyen ve yardımcı olan sevgili eşim Süleyman Akif DEMİREL'e ve kızıma çok teşekkür ederim.

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji ve Araştırma Merkezi'ne (CÜTAM) süregelen desteği için çok teşekkür ederim.

ÖZET

NEMATOD *Caenorhabditi elegans* (*C. elegans*) MODEL ORGANİZMASINDA mTOR İNHİBİTÖRLERİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Tuğba DEMİREL

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK

2023

TOR veya mTOR, besin ve diğer ipuçlarındaki değişikliklere yanıt olarak protein sentezi, otofaji ve diğer çoklu hücresel süreçleri modüle ederek büyüme, gelişme ve davranışları düzenleyen bir serin/treonin kinazdır. Son yıllarda TOR, büyüme, metabolizma, kanser ve yaşlanmadaki önemi nedeniyle memeli hücre kültürü ve genetik sistemlerinde yoğun olarak çalışılmıştır. İnsan kullanımı için lisanslanmış oldukça seçici ve iyi tanımlanmış bir ilaç olan Rapamisin, bu sistemin ana bileşeni olan TOR kinazı hedefler. FDA onaylı bir ilaç olan Rapamisin'in çeşitli türlerde ömrü uzattığı ve memelilerde yaşa bağlı hastalıkların gelişimini geciktirdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, rapamisinin yaşa bağlı patofizyolojiyi ve sağkalımı nasıl etkilediğine dair bir dizi temel endişe henüz çözülmemiştir.

Nematod *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) temin edilmesi ve yetiştirilmesindeki kolaylıklar, etik olarak uygunluğu, yapısal avantajları, genlerinin insan genlerine olan yüksek homolojileri sayesinde araştırmacılar için önemli bir model organizmadır. *C. elegans*'ın sağladığı avantajlar ile solucan gelişimi, metabolik düzenleme, yaşlanma ve nöronal işlevlerdeki araştırmalar için olağanüstü bir model sistem oluşturmaktadır. *C. elegans*'ın besin mevcudiyeti ve bu fizyolojik fonksiyonlar arasındaki bağlantılar sayesinde TOR fonksiyonlarını içeren birçok çözülmemiş hastalıkla ilgili biyolojik problem sunduğundan TOR komplekslerinin fizyolojik fonksiyonları hakkında bilgi edinmek için eşsiz fırsatlar sunmaktadır. *C. elegans*'ta yapılan araştırmalar, TOR aktivitesini azaltarak metazoan yaşam süresinin nasıl artırılabileceği çalışmalarına öncülük etmiştir. *C. elegans*'taki ortologu *lin-35*/*Rb* olan tümör baskılayıcı *Rb*'nin,

doğrudan veya dolaylı olarak hemen hemen tüm insan kanserlerinde yer aldığı tahmin edilmektedir.

Bu çalışmada yabanıl tip N2 ve kanser ile ilişkili genleri içeren mutant *lin-35 C. elegans* suşlarıyla çalışılmıştır. Kanser araştırmalarında hedef haline gelmiş ilgi çeken TOR inhibitörleri olan rapamisin, temsirolimus, everolimus uygun konsantrasyonlar belirlenerek uygulanmıştır. İnibitörlerin *C. elegans* model organizmasında ömür uzunluğuna olan etkileri ömür uzunluğu testleri ile araştırılmıştır. *C. elegans* rapamisin, temsirolimus veya everolimus vermenin *lin-35* ve N2 suşlarında yaşam süresinin uzamasına ve yumurtlama kapasitesinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda inhibitör uygulanmadan önceki ve sonraki etkilerini ortaya koymak için TOR ile ilişkili önemli genlerin gen expresyonu seviyeleri RT-PCR analizi yapılmıştır. Rapamisin ve analoglarının sağlığın uzamasını düzenleyen moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, insan yaşlanması ve yaşa bağlı bozuklukların tedavisinde terapötik uygulanabilirliğini genişletecektir.

Anahtar kelimeler: *Caenorhabditis elegans*, model organizma, mTOR, rapamisin, temsirolimus, everolimus, RT-qPCR

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF mTOR INHIBITORS IN THE MODEL ORGANISMS OF NEMATOD *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

Tuğba DEMİREL

Master of Science Thesis

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Şeyda BERK

2023

TOR or mTOR is a serine/threonine kinase that regulates growth, development, and behavior by modulating protein synthesis, autophagy, and other multiple cellular processes in response to changes in nutrients and other cues. In recent years, TOR has been extensively studied in mammalian cell culture and genetic systems due to its importance in growth, metabolism, cancer and aging. Rapamycin, a highly selective and well-defined medication licensed for human use, targets the major component of this system, TOR kinase. Rapamycin, an FDA-approved medicine, has been shown to increase longevity in various species and delay the development of age-related illnesses in mammals. However, a number of fundamental concerns about how rapamycin impacts age-related pathophysiology and survival remain unsolved.

The Nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) is an important model organism for researchers thanks to its ease of obtaining and breeding, its ethical suitability, structural advantages, and high homology of its genes to human genes. The advantages of *C. elegans* provide an outstanding model system for research in animal development, metabolic regulation, aging, and neuronal function. The links between nutrient availability and these physiological functions offer unique opportunities to learn about the physiological functions of TOR complexes, as they present many unresolved disease-related biological problems involving TOR functions. Studies in *C. elegans* led to the study of how metazoan lifespan could be increased by reducing TOR activity. *C. elegans* has continued to make an important contribution to the understanding of the mechanisms involved. The tumor suppressor *Rb*, whose ortholog in *C. elegans* is *lin-35*/*Rb*, is predicted to be involved in almost all human cancers, either directly or indirectly.

In this study, wild type N2 and *lin-35 C. elegans* strains containing cancer-related genes will be studied. Rapamycin, temsirolimus, everolimus, which are interesting TOR

inhibitors that have become targets in cancer research, will be applied by determining appropriate concentrations. The effects of inhibitors on longevity in the *C. elegans* model organism will be investigated by longevity tests. We show that giving *C. elegans* rapamycin, temsirolimus, or everolimus resulted in increased lifespan and decreased spawning capacity in *lin-35* and N2 worms.At the same time, RT-PCR analysis of gene expression levels of important genes associated with TOR will be performed to reveal their effects before and after inhibitor administration. The elucidation of molecular mechanisms of rapamycin and its analogues regulating health prolonging will expand its therapeutic applicability in the treatment of human aging and age-related disorders.

Key Words: *Caenorhabditis elegans*, model organism, mTOR, rapamysin, temsirolimus, everolimus, RT-qPCR

İÇİNDEKİLER

ETİK ..... **iv**
KATKI BELİRTME VE TEŞEKKÜR ..... **v**
ÖZET ..... **vi**
ABSTRACT ..... **viii**
İÇİNDEKİLER ..... **x**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Nematod Caenorhabditis elegans 1
1.1.1. Büyüme ve bakım 2
1.1.2. Cinsel formlar ve önemi 3
1.1.3. Yaşam döngüsü 5
1.1.4. Neden *C. elegans?* 8
1.2. mTOR Sinyal Yolağı 9
1.2.1. *C. elegans*'ta korunan TOR sinyal kompleksleri 13
1.2.2. *LET-363/ TOR* 14
1.2.3. *DAF-15/Raptor* 15
1.2.4. *RICT-1/Rictor* 16
1.2.5. *4E-BP1*/ ökaryotik başlatma faktörü 4E 16
1.2.6. SGK-1 17
1.2.7. S6K/RSKS-1 17
1.3. mTOR İnhibitörleri 18
1.3.1. Rapamisin 18
1.3.2. Temsirolimus 19
1.3.3. Everolimus 20
1.4. *C. elegans'ta lin-35/Rb* 21
2. AMAÇ **24**
3. MATERYAL VE METOD **25**
3.1. *C. elegans* Suşlarının Seçimi ve Temin Edilmesi 25
3.2. *C. elegans* Kültür Koşulları 27
3.2.1. *C. elegans* kültürü için gerekli olan stok çözeltiler ve hazırlanması için kullanılan kimyasallar 27
3.2.2. *C. elegans* kültürü için kullanılan stok çözeltiler 28
3.2.3. Bakteriyel besin kaynağının hazırlanması 30
3.2.4. NGM petri kaplarının hazırlanması 31
3.2.5. NGM petri kaplarında büyüyen solucanların yeni NGM petri kaplarına aktarılması (pasajlama) 32
3.3. *C. elegans* Senkronize Kültürlerinin Elde Edilmesi (Senkronizasyon) 33
3.4. *C. elegans* Suşlarının Dondurulması ve Geri Kazanılması 35
3.4.1. *C. elegans* suşlarının dondurulması işlemi 35
3.4.2. *C. elegans* suşlarının dondurma işleminden geri kazanılması 36
3.5. *C. elegans*'ın Sıvı Büyüme Ortamının Hazırlanması ve Pasajlanması 36
3.6. İlaçların Hazırlanması ve Uygulanması 36
3.6.1. Stok konsantrasyonunun, ara stok konsantrasyonunun ve seyreltme konsantrasyonlarının hazırlanışı 37
3.7. Ömür Uzunluğu (Lifespan) Deneyleri 38
3.8. *C. elegans* Yumurtlama (Fertilizasyon) Deneyleri 39

3.9. RNA İzolasyonu....39
3.10. RNA'nın Kantitatif Analizi....42
3.11. cDNA Sentezi....43
3.12. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) 45
3.13. İstatiksel Analiz....48
4. BULGULAR....49
4.1. mTOR İnhibitörlerinin *C. elegans* Fertilizasyonu Üzerindeki Etkileri....49
4.2. *C. elegans*'ın Ömür Uzunluğuna Etkileri İçin mTOR İnhibitörlerinin Taranması....51
4.3. Boyut Analizi....55
4.4. *C. elegans*'ta mTOR Sinyal Yolağı Bileşenlerinin mRNA İfadesi....57
5. TARTIŞMA....59
6. SONUÇ....63
7. KAYNAKÇA....64
ÖZGEÇMİŞ....73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. *C. elegans* model organizması.....2
Şekil 2. *C. elegans* anatomisi.....4
Şekil 3. *C. elegans*'ın yaşam döngüsü. 8
Şekil 4. *C. elegans* model organizmasında TOR sinyalinin temel bileşenleri. 10
Şekil 5. mTORC1 ve mTORC2.....12
Şekil 6. *C. elegans'*ta TORC1 ve TORC2 hücresel süreçleri. 13
Şekil 7. *C. elegans* TOR Homologunun Tanımlanması. 14
Şekil 8. Geç *C. elegans* embriyolarında DRM kompleksinin kromatin ilişkisi. 22
Şekil 9. N2 ve *lin-35* solucanlarına morfolojik genel bakış. 26
Şekil 10. NGM agar petri kaplarının hazırlanışı.....32
Şekil 11. *E. coli* OP50 suşunun mikropipet yardımıyla alınarak *C. elegans* suşlarının bulunduğu petrilere aktarılması. 32
Şekil 12. Pastör pipetlerinin dH_2O ve ethanol yardımıyla yıkanması 33
Şekil 13. *C. elegans* içeren petri kaplarının yıkanması 33
Şekil 14. Santrifüj işlemi 33
Şekil 15. Pelet eldesi.....34
Şekil 16. Yumurtaların eldesi için kullanılan kimyasallar 34
Şekil 17. Kimyasallardan arındırma işlemi 34
Şekil 18. M9(1X) tamponuna alınma işlemi 35
Şekil 19. RNA izolasyonu aşamaları ve kullanılan malzemelere genel bakış.....42
Şekil 20. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve PCR analizine deneysel genel bakış...45
Şekil 21. PCR çalışma koşullarının cihazda görüntülenmesi 47
Şekil 22. PCR çalışma koşullarının cihaza bağlı bilgisayar ortamında görüntülenmesi.....48
Şekil 23. mTOR inhibitörlerinin etkileri. 50
Şekil 24. mTOR inhibitörlerinin varlığında ömür uzunluğu eğrileri.....52
Şekil 25. mTOR inhibitörlerinin C. elegans ömrü üzerindeki etkileri. 53
Şekil 26. mTOR inhibitörlerinin ortamında yetiştirilen suşların boyut analizi. 56
Şekil 27. mTOR inhibitörlerinin ortamında yetiştirilen suşların temsili fotomikrografları. 57
Şekil 28. N2 ve *lin-35* solucanlarında *Let-363* ve *rsks-1* mRNA ifadesi. 58

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. *C. elegans* suşları 26
Tablo 2. *C. elegans* kültürü için gerekli olan stok çözeltilerin hazırlanması için kullanılan kimyasallar 27
Tablo 3. *C. elegans* deneyleri için kültür ortamı, çözelti ve tampon içerikleri 30
Tablo 4. LB Agar içeriği 31
Tablo 5. LB Broth içeriği 31
Tablo 6. NGM Agar içeriği 31
Tablo 7. Kullanılan ilaçlar için gerekli bilgiler 37
Tablo 8. mTOR inhibitörlerinin final ilaç konsantrasyonları ve *C. elegans* suşlarına verilmek üzere hazırlanışı 38
Tablo 9. Nanodrop ölçüm sonuçları 43
Tablo 10. cDNA kit içeriği 44
Tablo 12. cDNA reaksiyon protokolü 44
Tablo 13. BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix kit içeriği 45
Tablo 14. qPCR için eklenecek olan bileşenler ve miktarları 46
Tablo 15. qPCR çalışma koşulları 46
Tablo 16. RT-qPCR için primer dizileri ve gen bilgileri 47

KISALTMALAR DİZİNİ

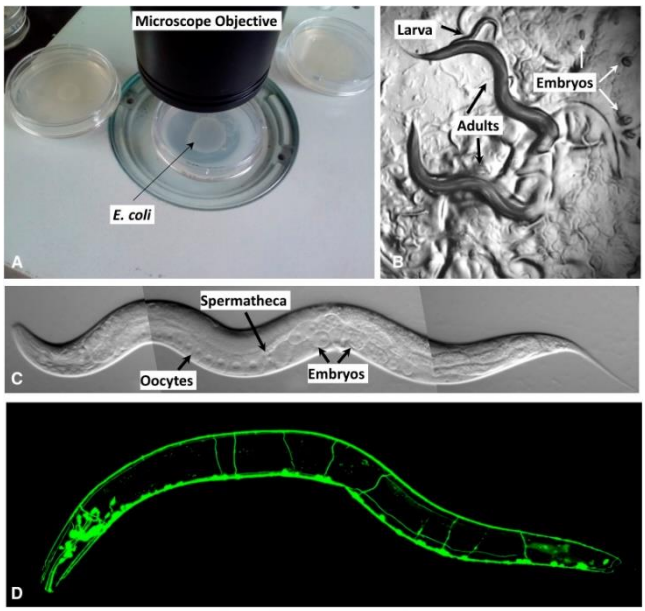
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
DIC	Diferansiyel Girişim Kontrast Mikroskobu
E. Coli	*Escherichia coli*
GFP	Green fluorescent protein
DNC	Dorsal sinir kordonu
VNC	ventral sinir kordonu
ADF	Amfid sensillumunda silli nöron
ASG	Amfid sensillada silli nöron
ASİ	Amfid sensillada silli nöron
ASJ	Amfid sensillada silli nöron
TOR	Rapamisin hedefi serin/treonin kinaz
mTOR	Memeli rapamisin hedefi serin/treonin kinaz
TORC1	TOR ve Raptor içeren kompleks
TOR2	TOR ve Rictor içeren kompleks
PIKK	PI3K ile ilişkili kinaz
mLST8	GβL olarak da bilinen Sec13 protein 8 ile memeli öldürücü
AKT	Protein kinaz B
PRAS40	40 kDa'lık prolin bakımından zengin Akt substratı
DEPTOR	mTOR etkileşimli protein içeren DEP alanı
CeTOR	C. elegans rapamisin hedefi
pRb	Retinoblastoma proteini
NGM	Nematod Gowth Medium
LB Agar	Laury Tryptose Broth agar
DMSO	Dimetil sülfoksit
S6K	Ribozomal protein S6 kinaz
Hsp70	70 kilodaltonluk ısı şoku proteinleri
Protor-1	Rictor-1 ile gözlemlenen protein
Daf-15	Raptor'un *C. elegans* homoloğu
Rict-1	Rictor'ün *C. elegans* ortologu
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
lin-35	*Rb* ilişkili *C. elegans*'ta bulunan cep proteini

1. GİRİŞ

1.1. Nematod Caenorhabditis elegans

Caenorhabditis elegans, dünyanın birçok yerinde yaşayan ve başta bakteriler olmak üzere mikroplarla beslenerek yaşamını sürdüren küçük, serbest yaşayan bir toprak nematodudur. Genomik, hücre biyolojisi, nörobilim ve yaşlanma gibi birçok alanda biyolojik araştırma için önemli bir model organizmadır (Brenner, 1974). Çalışma için birçok avantajı arasında kısa yaşam döngüsü, kompakt genomu, saptanmış gelişimi, yayılma kolaylığı ve küçük boyutu vardır. Yetişkin vücut planı, yaklaşık 1000 somatik hücre ile anatomik olarak basittir. *C. elegans* genetik çaprazlamalara yatkındır ve çok sayıda soy üretir. Optimal koşullar altında yaklaşık 3 günlük bir yaşam döngüsü ile çoğalır. Besin kaynağı olarak *E. coli* ile agar tabaklarında veya sıvı kültürlerde yetiştirilebilir. Yaşam döngüsü boyunca şeffaf olduğundan, diferansiyel girişim kontrast (DIC) mikroskobu ile canlı preparatlarda hücresel düzeyde incelenebilir (Brenner, 1974; Byerly et al., 1976; Sulston & Hodgkin, 1988)

Yumurtadan yeni çıkan larvalar 0.25 milimetre, erginler ise 1 milimetre boyundadır. Küçük boyutları, genellikle 100X'e kadar büyütmeye izin veren diseksiyon mikroskopları veya 1000X'e kadar büyütmeye izin veren bileşik mikroskoplarla gözlemlenebilmektedir (Corsi et al., 2015). Diseksiyon mikroskobu hareket ederken, yemek yerken, gelişirken, çiftleşirken ve yumurtlarken petri kaplarındaki canlıları (Şekil 1, A ve B) gözlemlemek için kullanılmaktadır. Birleşik veya konfokal mikroskop, çok daha iyi çözünürlükte gözlemeye olanak sağlarken (Şekil 1C), araştırmacıların hücre gelişimi ve işlevi ile ilgili soruları tek hücre çözünürlüğünde ele alan deneyler yapmalarına izin vermektedir. *C. elegans* şeffaf olduğundan, tek tek hücreler ve hücre altı ayrıntılar Nomarski (diferansiyel girişim kontrastı, DIC) optikleri kullanılarak kolayca görselleştirilebilir (Şekil 1C). Ayrıca floresan proteinler kullanılarak proteinler veya hücre altı bölmeler etiketlenebilir ve ayrıntılı bir görüntü elde edilebilmektedir (Şekil 1D). Floresan proteinler ayrıca gelişimsel süreçleri incelemek, hücre gelişimini ve işlevini etkileyen mutantları taramak, hücreleri izole etmek ve *in vivo* protein etkileşimlerini karakterize etmek için kullanılabilmektedir (Boulin et al., 2006; Chalfie et al., 1994; Feinberg et al., 2008)



Şekil 1. *C. elegans* model organizması. (A) Bir diseksiyon stereomikroskopu ve Petri kabı görüntüsü. (B) *C. elegans*, diseksiyon mikroskobuyla elde edilen görüntüsü. (C) Yetişkin bir hermafrodit bileşik mikroskopta elde edilen görüntüsü. (D) GFP (Green fluorescent protein- Yeşil Floresan Protein) ile etiketlenmiş sinir sistemini gösteren floresan görüntüsü (Corsi et al., 2015).

1.1.1. Büyüme ve bakım

C. elegans, genellikle bir toprak nematodu olarak tanımlansa da, en kolay şekilde, bakteriyel besin kaynaklarının bol miktarda bulunduğu çürüyen bitkisel maddelerden izole edilebilir (Barrière & Félix, 2014). Laboratuarda, solucanlar normalde *Escherichia coli* bakterisi besini içeren agar petrilerde yetiştirilir. Solucanlar bakterileri tükettikten sonra, yağ kaynaklarını kullanırlar. Yiyecek olmadan, genç larva aşamasındaki solucanların gelişimi durdurulur. Bu durağanlığa girmenin bir sonucu olarak, solucanlar en az bir ay hayatta kalabilirler (genellikle aç bırakılan solucanlar 15 °C 'de 6 aya kadar tutulabilir) ve stok olarak saklanabilirler, sürekli beslenmeye ihtiyaç duymazlar. Sağlıklı, büyüyen solucanlara ihtiyaç duyulduğunda, eski petrilerdeki agardan bir parça bakteri içeren yeni bir petriye aktarılabilir. Solucanlar yeni petriye geçer ve gelişimlerine devam eder (Corsi et al., 2015).

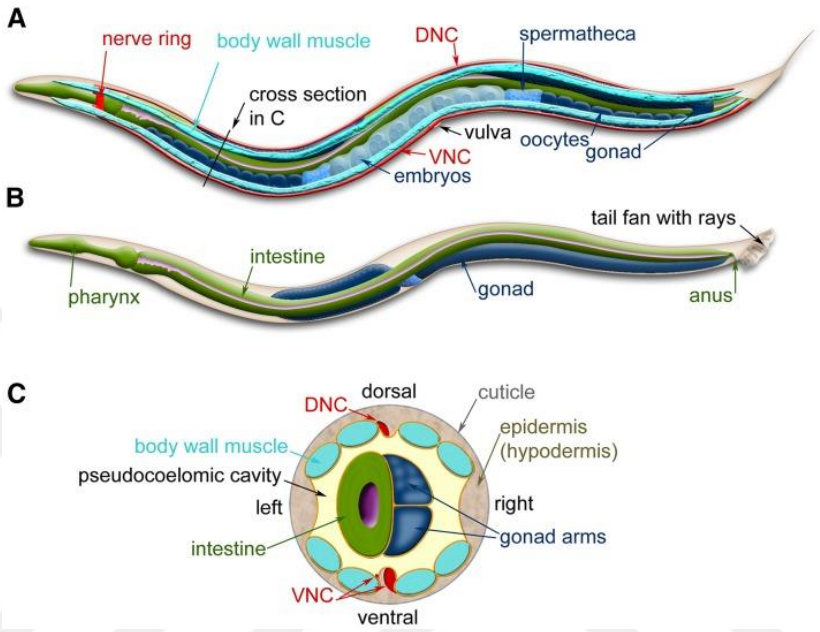
C. elegans stoklarının bakımı ve deneysel kullanımları büyük ölçüde kolaylıklar sağlar. İlk olarak, *C. elegans* kendi kendini dölleyen bir hermafrodit olduğu için, tek bir solucan bir petriyi doldurabilir (Corsi et al., 2015). İkincisi, solucan popülasyonları yıllarca dondurulabilir ve gerektiğinde yeniden canlandırılabilir (Corsi et al., 2015). Üçüncüsü, solucanın küçük boyutu, birçoğunun küçük bir alanda yetiştirilebileceği anlamına gelir (Corsi et al., 2015). Dördüncüsü, solucanlar 12 °C ila 25 °C arasında değişen sıcaklıklarda

büyütülebilir; Q_{10} büyüme için ∼2'dir (yani, 10°'lik bir artış büyümeyi iki kat hızlandırır) (Corsi et al., 2015). Farklı sıcaklıklarda büyüme, solucan gelişim hızının kontrol edilmesini mümkün kılar ve sıcaklığa duyarlı mutantların izolasyonuna ve kullanımına yardımcı olur. Solucanlar 25 °C 'nin üzerinde kısırlaştığı için sürekli büyüme mümkün değildir. Solucanlar çok sıcak odalarda (sıcaklık kontrollü inkübatörler yerine) tezgahlarda tutulursa, üst sıcaklık sınırı sorun olabilir. Isı şoku deneyleri ve erkeklerin üretimini artırmak için daha yüksek sıcaklıklara daha kısa maruz kalmalar mümkündür (Corsi et al., 2015). Beşincisi, solucanlar yumurtadan yeni çıkmış larvaları izole ederek veya hamile yetişkinlere çamaşır suyu (embriyolar dışında her şeyi öldürerek dekontamine eden) ve ağartma işlemine dirençli yumurtaları izole ederek senkronize edilebilir (Corsi et al., 2015). Altıncı olarak, biyokimyasal çalışmaları kolaylaştırmak için solucanlar sıvı ortamda toplu olarak büyütülebilir. COPAS Biosorter gibi "solucan ayırıcılar" da, istenen özelliklere sahip büyük miktarlarda bireysel solucanı hızlı bir şekilde seçmek için kullanılabilir (Corsi et al., 2015). Son olarak, bu solucanla çalışmak için iyi bir diseksiyon mikroskobu ve bileşik bir mikroskop dışında özellikle pahalı ekipmanlara ihtiyaç yoktur. Genel olarak, solucanlar ucuzdur ve bakımı uygundur (Corsi et al., 2015).

1.1.2. Cinsel formlar ve önemi

Yabani tip *C. elegans*'ın iki cinsel formu vardır: kendi kendini dölleyen hermafroditler (XX) ve erkekler (XO) (Şekil 2 , A ve B) (Zarkower, 2006). Hermafroditlerin gonadı, önce L4 evresinde spermatekada depolanan haploid amoeboid sperm üreten bir ovotestis oluşturur ve daha sonra yetişkinliğe yakın germ hattı, çok daha büyük oositler üretmek için kaderi değiştirir. Esasen hermafroditler, gonadları oosit üretmeden önce geçici olarak sperm üreten dişilerdir. Hermafroditler, depolanan sperm tarafından döllenen 300'e kadar kendi soyunu üretebilir. Erkeklerle çiftleştirilirse, hermafroditler ∼ 1200-1400 yavru üretebilir, bu da hermafrodit tarafından üretilen spermin kendi kendine döllenmede sınırlayıcı bir faktör olduğunu gösterir. Her iki cinsiyet de beş otozomal kromozom için diploiddir. Cinsiyetler, hermafroditlerin iki X kromozomuna ve erkeklerin tek bir X kromozomuna sahip olması bakımından farklılık gösterir. *C. elegans*'ın Y kromozomu yoktur ve erkeklerin genotipine XO denir. Cinsiyet, X'in otozoma (X:A) oranıyla belirlenir (Zarkower, 2006). Kendi kendine döllenme ile üretilen yavruların çoğu hermafrodittir; X kromozomunun nadiren mayozla ayrılmaması nedeniyle neslin yalnızca %0,1-0,2'si erkektir. Hermafroditler kendi spermlerini ürettikleri için, genetik

çaprazlamalarda kendi kendine döl (hermafroditin spermi tarafından döllenen oositler) çapraz dölden ayırt edilmelidir. Örneğin, görünür bir mutant fenotipe neden olan resesif bir mutasyon için homozigot hermafroditler, yabanıl tip erkeklerle çiftleştiğinde, kendi kendine döl olan hermafroditler mutant fenotipi gösterir ve çapraz soy hermafroditler göstermez (Zarkower, 2006).



Şekil 2. *C. elegans* anatomisi. Bir hermafroditin (A) ve erkeğin (B) başlıca anatomik özellikleri. (A) Dorsal sinir kordonu (DNC) ve ventral sinir kordonu (VNC), sinir halkasından solucanın tüm uzunluğu boyunca uzanır. Vücut duvarı kaslarının dört kadranından ikisi gösterilmiştir. (B) Bu görünümde sinir sistemi ve kaslar çıkarılmıştır, farinks ve bağırsak daha açık bir şekilde ortaya çıkar. (C) C. elegans hermafroditinin (A'da siyah bir çizgiyle işaretlenmiş konum) ön bölgesinden enine kesit, epidermis ve kütikül ile çevrili dört kas kadranını, bağırsak ve psödoselomik boşluk içinde yer alan gonad ile gösterir (Corsi et al., 2015).

Kendi kendini dölleyen hermafroditler, genetik analiz için çeşitli avantajlar sağlar. İlk olarak, kendi kendine döllenme (genellikle kendi kendine üreme olarak anılır), tek bir solucan tüm bir popülasyona yol açabileceğinden stokların bakımını kolaylaştırır. İkincisi solucanlar homozigotluğa yönlendirilir, yani hermafrodit popülasyonları heterozigotları kaybetme eğilimindedir (çünkü hermafroditler diğer hermafroditlerle çiftleşemez). Bu nedenle, mutajenize edilmiş suşlar esas olarak izojeniktir (Brenner, 1974). Üçüncüsü, kendi kendine üreme, standart Mendelci ayırma kurallarına uyar. Bu nedenle resesif bir özellik için heterozigot olan bir ebeveyn standart 1:2:1 ayrışma modelini üretecektir. Öyle ki dölün %25'i mutant aleli için homozigot olacak ve otozomal resesif özelliği gösterecektir. Dördüncüsü, çiftleşme yeteneğini bozan nöromüsküler kusurları olan mutantlar hala laboratuvarda tutulabilir. Aslında hermafroditin 302 sinir hücresinden

sadece 11'i: grup olarak öldürüldüğünde solucanların dauer larvalarına dönüşmesine neden olan sekiz ADF, ASG, ASI ve ASJ nöronu (Bargmann & Horvitz, 1991), iki nöron hücresinin (Forrester & Garriga, 1997) ve farinksteki M4 nöronunun (Avery & Horvitz, 1989) üreme yetişkin aşamasına gelişimi desteklemek için gerekli olduğu bilinmektedir. Beşincisi, ciddi şekilde kusurlu mutantların yaşayabilirliği ve kendi kendini dölleme yetenekleri, değiştirici (güçlendirici ve baskılayıcı) mutasyonlar için kolay taramalara izin verir.

Erkekler önemlidir, çünkü farklı genetik bileşimlere sahip solucanların üretilmesi ve genlerin haritalanması için gerekli olan genetik materyalin değiş tokuşuna izin verirler. Gerçekten de solucan, hermafrodit spermini kullanmadan önce erkek sperm kullanarak nadir erkeklerin genetik katkısından yararlanmak üzere evrimleşmiştir (Ward & Carrel, 1979). Bu nedenle, eğer erkekler çiftleşme yeteneğine sahipse, çapraz döl hakim olur (erkeklerin hermafroditleri bulmasına yardımcı olmak için araştırmacılar, küçük bir bakteri damlası olan Petri plakalarını kullanır).

1.1.3. Yaşam döngüsü

Diğer nematodlara benzer şekilde, *C. elegans*'ın yaşam döngüsü embriyonik aşama, dört larva aşaması (L1-L4) ve yetişkinlikten oluşur. Her larva aşamasının sonu, yeni aşamaya özgü bir kütikülün sentezlendiği ve eskisinin döküldüğü bir deri değiştirme ile işaretlenir. Bu süre zarfında faringeal pompalama durur ve solucan kısa bir uyuşukluğa girer. *C. elegans* embriyogenezi 22°'de yaklaşık 16 saat sürer. Döllenmeden sonra neredeyse geçirimsiz bir yumurta kabuğu yapılır ve embriyonun anneden tamamen bağımsız olarak gelişmesini sağlar (Raizen et al., 2008).

C. elegans'ta embriyogenez kabaca proliferasyon ve organogenesis/morfogenesis olmak üzere iki aşamaya ayrılır (Sulston & Hodgkin, 1988). Proliferasyon (22 °C'de fertilizasyondan 0 ila 330-350 dakika sonra), "16 E evresi"nin sonunda tek bir hücreden yaklaşık 550 esasen farklılaşmamış hücreye hücre bölünmelerini içerir. Bu aşama ayrıca iki aşamaya ayrılır. İlk aşama (0-150 dakika), zigot oluşumu ile embriyonik kurucu hücrelerin oluşumu arasındaki süreyi kapsar. İkinci aşama ise (150-350 dakika), organogenezin başlangıcına kadar hücre bölünmelerini ve gastrulasyonu kapsar (Bucher & Seydoux, 1994). 150 dakikalık proliferasyon anne rahminde gerçekleşir ve embriyo yaklaşık 30 hücreli aşamaya (gastrulasyonda) ulaştığında dışarıya bırakılır.

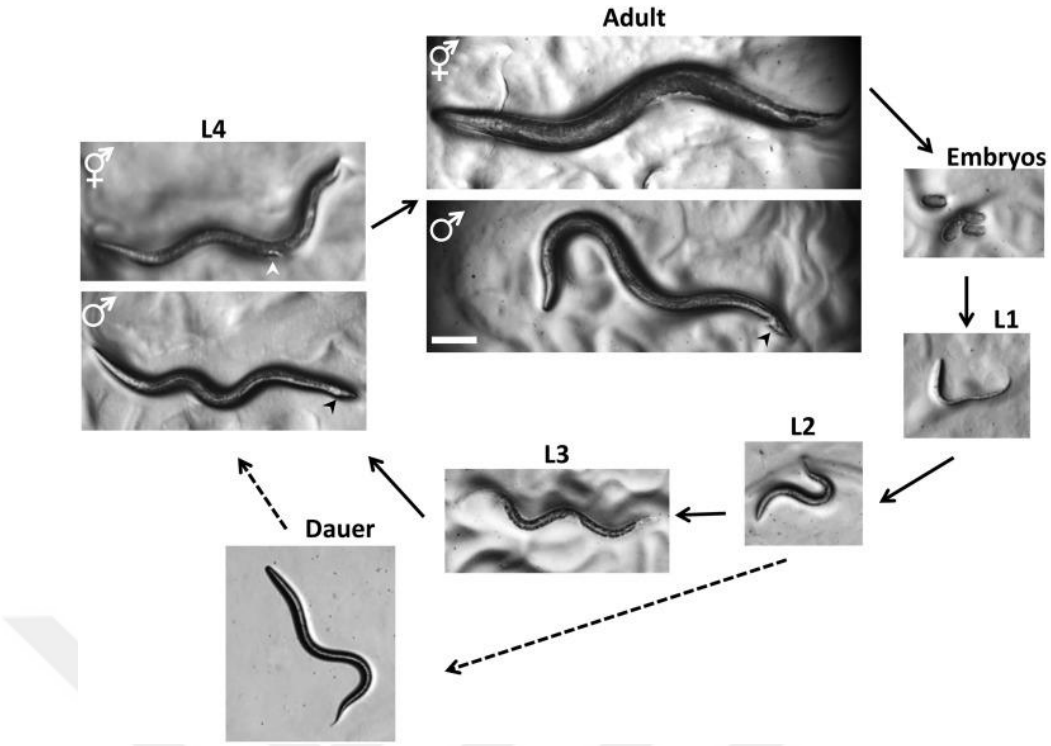
Gastrulasyon başladığında spesifik hücre göçü sebebiyle hücrelerde önemli ölçüde yeniden düzenleme gerçekleşir. Hücre göçleri tamamlandıktan sonra, hücrelerin göç ettiği ventral yarık, arkadan (230 dakika) öne doğru ilerleyerek kapanır. Bu andan itibaren embriyonik alt aşamalar, spesifik hücre göçleri, hücre sayısında artış ve senkronize kök hücre bölünme aşamalarıyla ile tanımlanabilir. Çoğalma aşamasının sonunda embriyo; hipodermise ve nöronlara yol açan ektoderm, farenks ve kas oluşturan mezoderm, germ hattı ve bağırsağa yol açan endoderm olmak üzere üç tabaka halinde organize edilmiş küremsi bir hücredir (Sulston & Hodgkin, 1988).

Organojenez/morfojenez aşaması sırasında (5-6 saat ila 12-14 saat), hücrelerin terminal farklılaşması pek çok ek hücre bölünmesi olmaksızın gerçekleşir. Embriyo üç kat uzar ve tamamen farklılaşmış doku ve organlara sahip bir solucan şeklini alır. Morfogenez "lima bean" aşaması ile başlar. İlk kas seğirmeleri, ilk hücre bölünmesinden 430 dakika sonra gözlenir. Cinsel dimorfizm 510 dakikada ilk kez görünür hale gelir. Embriyo, ilk hücre bölünmesinden 760 dakika sonra faringeal pompalamaya başlar ve 800 dakika sonra yumurtadan çıkar (Ehrenstein, 1980; Schierenberg, 1980; Sulston & Hodgkin, 1988).

Post-embriyonik gelişim, yumurtadan çıktıktan sonra beslenme ile tetiklenir. Yiyecek varlığında, hücre bölünmeleri yeniden başlar ve yumurtadan çıktıktan 3 saat sonra embriyonik sonrası gelişim programı başlar (Ambros, 2000). Solucan yetişkinliğe ulaşmak için dört larva aşamasından geçer. Yumurtadan çıktıkları ilk aşama (L1) larva olurlar. Solucanlar dört larva evresi (L1-L4) boyunca beslenmeye ve gelişmeye başlar (Nelson & Raizen, 2013). L1 aşaması ~16 saat uzunluğundadır; diğer aşamalar ~12 saat uzunluğundadır. L4 yaklaşık 12 saat sonra, yetişkin hermafroditler, kendi ürettikleri spermlerinin tamamını kullanana kadar 2-3 günlük bir süre boyunca yeni nesiller üretmeye başlarlar; spermi tükenmiş hermafrodit bir erkekle çiftleşirse ek soy üretilebilir. Üreme döneminden sonra, hermafroditler yaşlanmadan ölmeden önce birkaç hafta daha yaşayabilirler. Besin tükendiğinde ve solucanlar kalabalık olduğunda, L2 larvaları alternatif bir yaşam döngüsünü aktive eder (Hu, 2007) ve "dauer" larva adı verilen alternatif bir L3 larva aşamasına dönüşürler. Dauer larva kütikülü solucanı tamamen çevreler ve ağzı tıkayarak solucanın yemesini engeller ve böylece gelişimi durdurur. Dauer kütikülü kimyasallara karşı gelişmiş bir dirence sahiptir, bu nedenle dauer'e çevresel streslere ve kostik ajanlara karşı daha fazla koruma sağlar. Dauer larvaları aylarca hayatta kalabilir ve yabanıl doğada en sık karşılaşılan dağılma şeklidir. Dauer larvaları bakteri besin içeren plate içerisine aktarıldığında ağız tıkaçlarını döker ve biraz

farklı L4 larvaları olarak gelişimlerini sürdürürler (Golden & Riddle, 1984). Bahsedilen bu , dört larva aşaması (L1-L4) Şekil 3'de verilmiştir.

22 °C-25 °C'de kuluçkadan yaklaşık 45-50 saat sonra, yeni olgunlaşmış bir hermafrodit ilk yumurtalarını bırakır ve böylece 3 günlük üreme yaşam döngüsünü tamamlar (Byerly et al., 1976). Yetişkin hermafrodit yaklaşık 4 gün oosit üretir ve bu 3-4 günlük doğurganlık döneminden sonra olgun yetişkin 10-15 gün daha yaşar. Kendi kendini dölleyen bir hermafrodit, sperm sayısının sınırlı olması nedeniyle yaklaşık 300 döl verebilir, ancak bir erkekle çiftleşirse yavru sayısı 1200-1400'e kadar çıkabilir. Erkekler, son larva tüy dökümünden sonra 6 gün boyunca bir hermafrodit ile başarılı bir şekilde çiftleşebilir ve yaklaşık 3000 döl verebilir (Hodgkin, 1988). Hermafrodit gelişimi sırasında üretilen 1090 somatik hücreden 131'i, karakteristik zamanlarda programlanmış hücre ölümüne maruz kalır (Driscoll, 1995). Bu nedenle yetişkin *C. elegans* hermafroditi, 302'si nöron ve 95'i vücut duvarı kas hücresi olmak üzere 959 somatik çekirdeğe sahiptir. Erişkin erkek ise 1031 somatik çekirdeğe sahiptir ve bunların 381'i nöronlardır (ekstra nöronlar çoğunlukla erkek çiftleşme davranışına ayrılmıştır) (White, 1988). Daha fazla hücreye sahip olmasına rağmen, yetişkin *C. elegans* erkeği, hermafroditten (daha ince ve biraz daha kısadır (yaklaşık 0,8 mm).



Şekil 3. *C. elegans*'ın yaşam döngüsü. Solucanlar, dört larva aşaması boyunca boyut olarak büyürler. Ancak cinsiyetleri L4 aşamasına kadar kolaylıkla ayırt edilemez. L4 aşamasında, hermafroditlerin konik bir kuyruğu vardır ve gelişmekte olan (beyaz ok başı) karın tarafının merkezinde net bir yarım daire olarak görülebilir. Erkeklerin kuyruğu daha geniştir (siyah ok başı) ancak bu aşamada fark edilebilir bir yelpazeleri yoktur. Yetişkinlerde bu iki cinsiyet hermafroditin daha geniş çevresi ve sivri uçlu kuyruğu, erkeğin daha ince çevresi ve yelpaze şeklindeki kuyruğu (siyah ok ucu) ile ayırt edilebilir. Oositler hermafroditten gelen spermlerle veya çiftleşme yoluyla erkeklerden elde edilen spermlerle döllenebilir. Dauer larvaları, diğer tüm larva evrelerinden daha incedir. Yukarıda petri kaplarında fotoğraflar çekilmiştir. Ölçek, 0,1 mm (Corsi et al., 2015).

1.1.4. Neden *C. elegans?*

C. elegans genetik çalışmalar için güçlü bir sistemtir ve ökaryotik biyoloji için bir model olarak birçok doğal avantaja sahiptir. Bu özellikler arasında küçük boyutu, büyük kuluçka boyutu, yetiştirme kolaylığı, düşük bakım gideri, uzun süreli kriyoprezervasyon, hızlı üretim süresi, şeffaflık, değişmez hücre sayısı ve gelişimi ve besleme RNAi'yi kullanarak gen aktivitesini azaltma yeteneği yer alır. Genellikle bahsedilmese de *C. elegans*'ın bir başka olumlu özelliği de organizmaların insanlara karşı oldukça iyi huylu olmasıdır. Aslında vücut sıcaklığında üreyemedikleri için insanlarda üreyemezler (Kennedy, 2013).

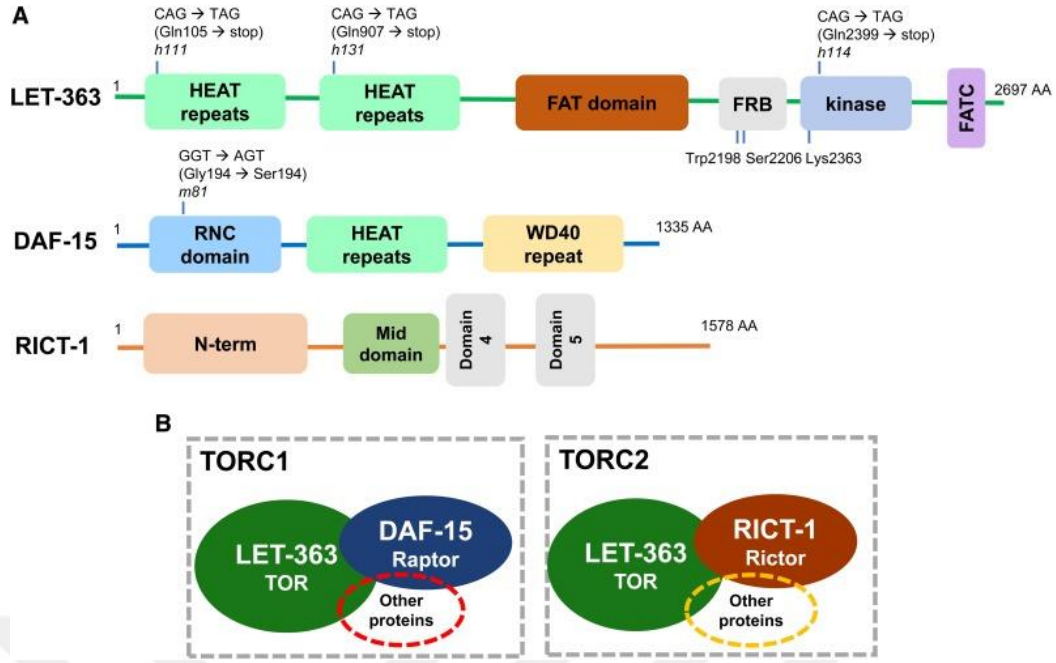
C. elegans'ı kullanan hücre ve gelişim biyolojisi araştırmalarına solucanın şeffaflığı büyük ölçüde yardımcı olur, bu da araştırmacıların mutasyonlar veya değişen ortamlar nedeniyle gelişimi ve değişiklikleri tek bir tanımlanmış hücre düzeyinde incelemesine

olanak tanır. Böylece birçok biyolojik problem, heterojen dokulardaki çok sayıda hücre yerine tek hücre düzeyinde "minyatür" olarak incelenebilir. Şeffaflık ayrıca floresan protein raportörleri kullanan canlı solucanlarda çok sayıda çalışma yapılmasını sağlar (Şekil 1D). Floresan proteinler, canlı hücrelerdeki hücreleri ve proteinleri etiketleyerek, genetik ekranların çeşitli hücresel işlemlerde kusurlu mutantları tanımlamasını sağlar. Ek olarak, kalsiyum akışına yanıt olarak floresan ışıyan floresan protein bazlı raportörler, bir floresan mikroskop altında kalsiyum akışının nörona özgü saptanmasını sağlar ve bu nedenle araştırmacıların *in vivo* elektrofizyolojik aktiviteyi ölçmesine izin verir. Ayrıca, hücre-hücre ve sinaptik temasların haritalanması, farklı hücrelerde tamamlayıcı GFP fragmanlarının ifade edilmesiyle gerçekleştirilebilir (Feinberg et al., 2008). Şeffaflık aynı zamanda bireysel nöronların aktivitesini değiştiren optogenetik araçların özellikle *C. elegans*'ta etkili olduğu anlamına gelir (Husson et al., 2013).

Her araştırma sorusunu yanıtlamak için tek bir model organizma kullanılamaz ve *C. elegans* ile çalışmanın bazı sınırlamaları vardır. Tüm metazoan genleri *C. elegans* genomunda bulunmaz (Ruvkun & Hobert, 1998).

1.2. mTOR Sinyal Yolağı

TOR, ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae* mayasında Rapamisin hedefi olarak keşfedilen bir serin/treonin kinazdır. Memeli TOR homolog kültürlenmiş hücreler kullanılarak yapılan çalışmalarda tanımlanmıştır (Kunz et al., 1993). TOR, yaygın olarak mTOR (memeli veya mekanik, rapamisinin hedefi) olarak da adlandırılır. Bugüne kadar incelenen her ökaryot genomu bir *TOR* geni içerir. Maya ve memeli hücre kültüründe yapılan kapsamlı çalışmalar, birbirini dışlayan iki TOR bağlayıcı proteinin, Raptor (mTOR'un Düzenleyici İlişkili Proteini) ve Rictor'un (mTOR'un Rapamisine Duyarsız Eşleniği) tanımlanmasını sağlamıştır (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002; Loewith et al., 2002; D. D. Sarbassov et al., 2004). TOR'un bu bağlayıcı proteinlerin her biri ile ilişkisi, iki TOR kompleksinin tanımlanmasını sağlamıştır. Her biri farklı işlevlere ve sinyal aktivitelerine sahip olan TOR Kompleksi 1; TOR ve Raptor içeren TORC1 ve TOR Kompleks 2; TOR ve Rictor içeren TORC2 (Saxton & Sabatini, 2017) (Şekil 4).



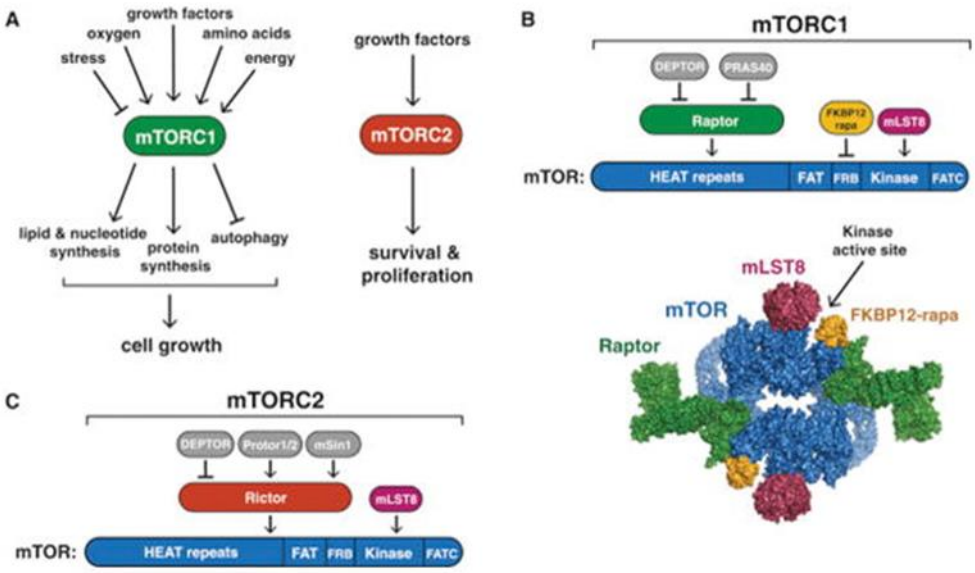
Şekil 4. *C. elegans* model organizmasında TOR sinyalinin temel bileşenleri. (A)LET-363/TOR, DAF-15/Raptor ve RICT-1/Rictor'daki protein yapılarının ve alanlarının çizgisel diyagramı (Long et al., 2002). Mutant aleller (h111, h131, h114 ve m81) ve anahtar korunmuş kalıntılar (Trp2198, Ser2206 ve Lys2363) belirtilmiştir. HEAT tekrarları, bu tekrar yapısını içeren dört protein (Huntingtin, EF3, PP2A ve TOR1) için adlandırılır. RICT-1 alanları daha az karakterize edilir (InterPro/Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı-Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü'nden alınan alan kimlikleri). (B) TORC1, LET-36 /TOR ve DAF-15/Raptor içeren kompleks olarak tanımlanır. TORC2, LET-363 /TOR ve RICT-1/Rictor içeren kompleks olarak tanımlanır. Bu komplekslerde başka proteinlerin bulunması ve TOR sinyali için gerekli olması beklenir. (AA, amino asit; FAT, odak yapışma hedefleme alanı; FATC, odak yapışmayı hedefleyen C-terminal alanı; FRB, FKBP-Rapamisin-Bağlama alanı (FKBP, FK506-bağlayıcı protein anlamına gelir); RNC, Raptor N-terminali CASPase benzeri etki alanı; TOR, Rapamisinin Hedefi; TORC, TOR Kompleksi; WD40 tekrar, WD ile biten 40AA motifi.) (Blackwell et al., 2019).

mTOR, mTOR Kompleksi 1 (mTORC1) ve 2 (mTORC2) olarak bilinen iki farklı protein kompleksinin katalitik alt birimini oluşturan PI3K ile ilişkili kinaz (PIKK) ailesindeki bir serin/treonin protein kinazdır. mTORC1, üç ana bileşeni tarafından tanımlanır: mTOR, Raptor (mTOR ile ilişkili düzenleyici protein) ve mLST8 (GβL olarak da bilinen Sec13 protein 8 ile memeli öldürücü). Raptor, birkaç kanonik mTORC1 substratında bulunan TOR sinyalleme (TOS) motifine bağlanarak mTORC1'e substrat alımını kolaylaştırır. mLST8, aksine, mTORC1'in katalitik alanıyla birleşir ve kinaz aktivasyon döngüsünü stabilize edebilir. Bu üç temel bileşene ek olarak, mTORC1 aynı zamanda iki inhibitör alt birim *PRAS40* (40 kDa'lık prolin bakımından zengin Akt substratı) ve DEPTOR (mTOR etkileşimli protein içeren DEP alanı) içerir (Saxton & Sabatini, 2017).

Son araştırmalar, mTORC1 aktivitesinin Raptor fosforilasyon durumu ile düzenlenebileceğini öne sürmüştür (Gwinn et al., 2008). mTORC1 'in başka bir alt birimi olan ve mTOR'un kinaz alanına bağlandığı ve mTOR kinaz aktivitesini pozitif olarak düzenlediği düşünülen mLST8, Raptor ve mTOR arasında besleyici ve rapamisine duyarlı bir etkileşimi sürdürmek için gerekli görünmektedir (Kim et al., 2003). Diğer çalışmalar, mLST8'in mTORC2 kompleksinde Rictor-mTOR etkileşimini sürdürmek için gerekli olduğunu göstermektedir. mLST8'in mTOR'u iki mTOR kompleksi arasında taşırken önemli olabileceği ve memelilerde bu komplekslerin dinamik dengesi ile tutarlı olabileceği önerisine yol açmaktadır (Zeng et al., 2007). Yakın tarihli bir çalışma, DEPTOR'u mTOR ile etkileşime giren bir protein olarak tanımlamıştır. DEPTOR, hem mTORC1 hem de mTORC2 ile etkileşime girerek faaliyetlerini olumsuz yönde düzenler (Peterson et al., 2009).

mTORC1, PI3K/AKT yolu tarafından aktive edilir ve TSC1/TSC2 kompleksi tarafından inhibe edilir. S6K'nın fosforilasyonu ve aktivasyonu ve mRNA translasyon baskılayıcısı 4EBP1'in fosforilasyonu ve inaktivasyonu yoluyla ribozomal biyogenez ve protein sentezinin ana düzenleyicisidir. mTOR'un en iyi karakterize edilmiş aşağı akış hedefleri olduklarından, S6K ve 4EBP1'in fosforilasyon durumu, mTORC1 aktivitesini *in vivo* olarak değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır (Dos D Sarbassov et al., 2004).

mTORC2, mTOR, rictor, mLST8, mSin1 ve yeni tanımlanan Protor, Hsp70 ve DEPTOR bileşenlerini içerir. Rictor, mTORC2'den ayrı olan mTOR ile ilişkili bir proteindir (Dos D Sarbassov et al., 2004). mLST8, her iki mTOR kompleksinin kararlı bir bileşenidir. mSin1, mTORC2'nin temel bir alt birimidir ve mTORC2 bütünlüğü ve AKT Ser473 fosforilasyonuna yönelik mTOR aktivitesi için önemlidir. Protor-1 (rictor-1 ile gözlemlenen protein), diğer mTORC2 alt birimlerinin komplekse birleştirilmesi için gerekli olmasa da, rictor ile etkileşime girer. Bir ısı şoku proteini olan Hsp70, bazal koşullar altında ve ısı şokunu takiben mTORC2'nin uygun oluşumu ve kinaz aktivitesi için gereklidir. DEPTOR, hem mTORC1 hem de mTORC2'nin negatif düzenleyicisidir (Peterson et al., 2009). mTORC2, büyüme faktörleri, PKC-α, AKT (Ser473'te) ve paxillin (fokal adezyonla ilişkili adaptör protein) fosforile eder ve hücrenin hayatta kalması, göçü ve aktinin düzenlenmesi ile ilgili GTPazlar Rac ve Rho'nun aktivitesini düzenler. Bu nedenle, mTORC2 ve mTORC1 farklı fizyolojik işlevlere sahiptir (Dos D Sarbassov et al., 2004).

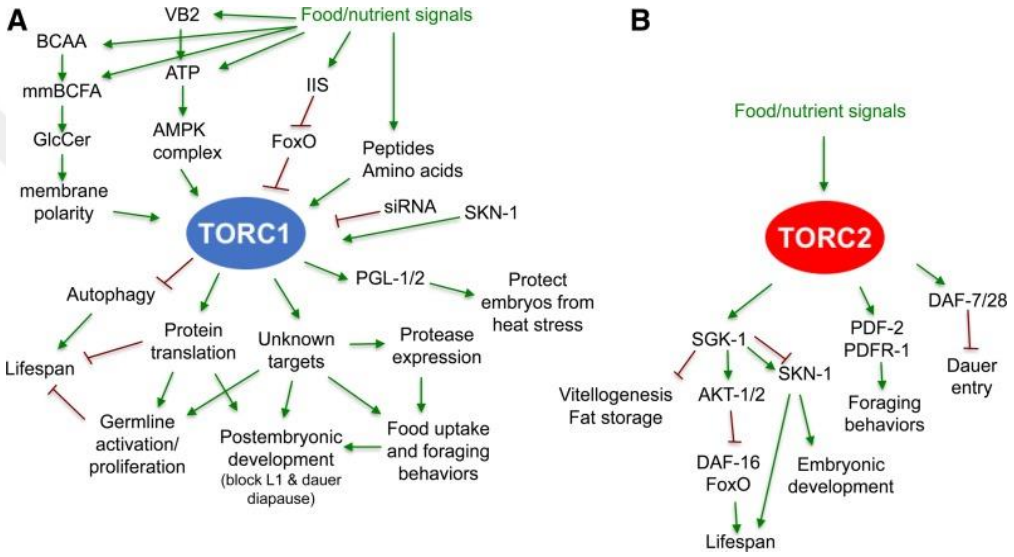


Şekil 5. mTORC1 ve mTORC2. (A) mTORC1 ve mTORC2 sinyal yolları. (B) mTORC1 alt birimleri ve mTOR'daki ilgili bağlanma yerleri. FKBP12-rapamisin. mTORC1'in (DEPTOR ve PRAS40, PDB ID: 5FLC olmadan) (C) mTORC2 alt birimleri ve mTOR'daki ilgili bağlanma yerleri (Saxton & Sabatini, 2017).

Kompleksler, rapamisin'e duyarlılıklarında farklılık gösterir; mTORC1 hassastır ve mTORC2 dirençli kabul edilir. Bununla birlikte, rapamisin ile uzun süreli tedavinin (24 saatten fazla), yeni sentezlenen mTOR moleküllerini etkileyeceğinden mTORC2 düzeneğini ve işlevini bozabileceği açıklanmıştır (Dos D Sarbassov et al., 2004).

TOR kompleksleri yaygın olarak çeşitli besinlerin, enerjinin ve büyüme faktörlerinin seviyelerini algılayan ve gelişim, üreme, metabolizma, davranış, stres tepkileri ve yaşlanma ile ilgili aşağı akış faaliyetlerindeki değişiklikleri bildiren sinyal sistemleri olarak tanımlanabilir (Menon & Manning, 2013) (Şekil 5). TOR kompleksleri büyümeyi, gelişmeyi ve anabolik metabolizmayı yönlendirdikleri için kritiktir ancak TOR aktivitesindeki azalmalar, hücreleri ve organizmaları stresten koruyan mekanizmaların harekete geçirilmesine yol açarak derin sonuçlara da sahip olabilmektedir. Bu nedenle, yaşlanmanın ve çeşitli insan hastalıklarının altında yatan mekanizmalar araştırılırken TOR komplekslerinin nasıl çalıştığını anlamak büyük önem taşımaktadır. Maya ve memeli doku kültürünü kullanan mekanik çalışmalar, TOR sinyallemesinin temel hücresel fonksiyonlarını ve moleküler mekanizmalarını anlamada çok ilerleme kaydetmiş olsa da model organizmaları kullanan çalışmalar, belirli fizyolojik koşullar altında TOR komplekslerinin fonksiyonlarını *in vivo* incelemek için giderek daha önemli hale gelmiştir (Şekil 6) (Blackwell et al., 2019). Genetik olarak uyumlu organizma *C. elegans*, solucan

gelişimi, metabolik düzenleme, yaşlanma ve nöronal fonksiyonlardaki yeni keşifler için olağanüstü bir model sistem olmuştur. Besin mevcudiyeti ile bu fizyolojik fonksiyonlar arasındaki bağlantılar, TOR fonksiyonlarını içeren, hastalıkla ilgili birçok çözülmemiş biyolojik problemi ortaya koyduğundan, solucan sistemi, TOR komplekslerinin fizyolojik fonksiyonları hakkında bilgi edinmek için eşsiz fırsatlar sağlar. Özellikle, *C. elegans*'ta yapılan araştırmalar, TOR aktivitesini azaltarak metazoan yaşam süresinin nasıl artırılabileceğine ilişkin araştırmaya öncülük etmiştir ve *C. elegans,* ilgili mekanizmaların anlaşılmasında önemli bir katkı sağlamaya devam etmiştir (Şekil 5) (Blackwell et al., 2019).

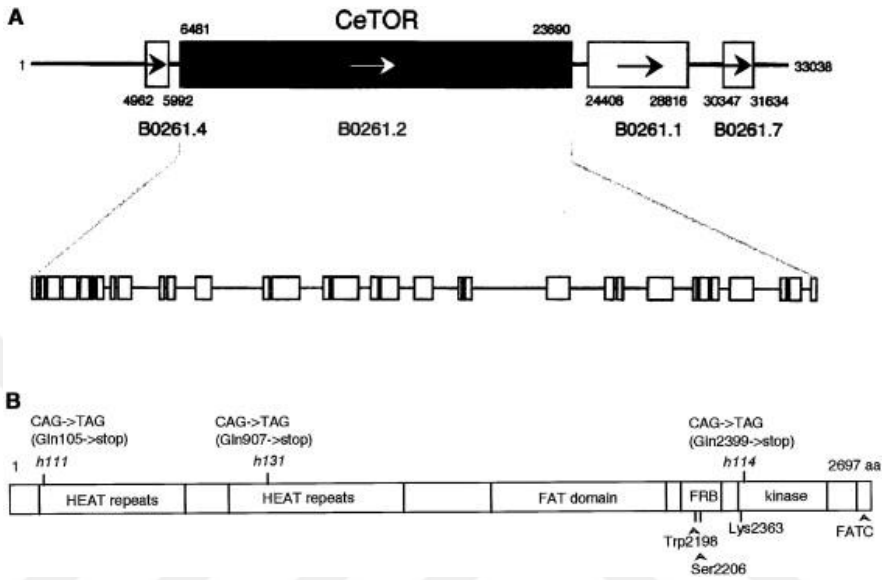


Şekil 6. *C. elegans'*ta TORC1 ve TORC2 hücresel süreçleri. Bu modeller temel olarak genetik analizlere dayanır, ancak aynı zamanda diğer sistemlerden mekanik bulguları da içerir. Birçok durumda, *C. elegans* araştırmacıları, gıda/besin sinyallerinin olmadığı veya azaldığı durumlarda, açlık veya diyet kısıtlaması koşulları altında TORC1 veya TORC2 işlevi analiz edilmiştir. Oklar, pozitif düzenlemeyi veya girdiyi gösterirken, T-çubukları, doğrudan düzenlemeyi göstermeden negatif düzenlemeyi gösterir. TOR işlevleri, karmaşık ve geniş kapsamlıdır. Örneğin, stres yanıtı transkripsiyon faktörü *SKN-1*'in iki TOR kompleksi ile ilgili üç farklı rolü vardır: birkaç TORC1 bileşeninin transkripsiyonunu destekler, *TORC1* veya translasyon inhibe edildiğinde hedef genleri aktive edilir ve TORC2'nin aşağı akışında düzenlenir. (BCAA, dallı zincirli AA'lar; GlcCer, glikosilseramid; IIS, insülin/IGF sinyali; mmBCFA, monometil dallı zincirli yağ asidi; TOR, Rapamisinin Hedefi; TORC, TOR Kompleksi; VB2, B2 vitamini) (Blackwell et al., 2019).

1.2.1. *C. elegans*'ta korunan TOR sinyal kompleksleri

C. elegans, TOR, Raptor, Rictor ve TORC1 ve TORC2 aktivitelerinin birçok korunmuş düzenleyicisinin ortologlarına sahiptir. Bu hücresel süreçlar Şekil 6'da verilmiştir. *C. elegans* rapamisin hedefi homologunun (CeTOR) *C. elegans* genomik dizilerinin BLAST araştırması ile belirlenmiştir. CeTOR, maya TOR'ları, TOR1 ve TOR2 (sırasıyla %32 ve

%33 aynı) ve memeli TOR, mTOR (%39 aynı) ile önemli sekans benzerliğine sahiptir. En yüksek homoloji, CeTOR'un mTOR'a %72 ve maya TOR'larına %65 özdeş olduğu kinaz alanında meydana gelir. TOR'un FKBP12-rapamisin bağlanmasında kritik olarak yer alan fonksiyonel alanlar ve kalıntılar, kinaz alanı aktivasyonu, fosfotransferaz reaksiyonu ve tümü CeTOR'da korunur. Bir FAT alanı ve beraberindeki FATC alanı ayrıca CeTOR'da korunur (Şekil 7) (Long et al., 2002).



Şekil 7. *C. elegans* TOR Homologunun Tanımlanması. (A) *B0261*'in ve CeTOR mRNA'nın yapısının bir şeması. Siyah kutu, CeTOR'u kodlayan *B0261.2* genini temsil eder. Beyaz kutular, *B0261.4*, *B0261.1* ve *B0261.7* genlerini temsil eder. Üç genin *B0261.4*, *B0261.2* ve *B0261.1*'in bir polisistronda kopyalanacağı tahmin edilmektedir. Genler, EMBL/GenBank/DDBJ veritabanına göre numaralandırılmıştır. (B) CeTOR, ve mutant alellerin şematik bir gösterimi. CeTOR, amino ucunda iki blok HEAT motifi, ortada bir FAT alanı ve karboksil ucunda bir FRB (FKBP-rapamisin bağlama) alanı, bir fosfatidilinositol kinaz homoloji alanı ve bir FATC alanı içerir. FRB alanındaki Trp2198 (mTOR'daki Trp2027'ye karşılık gelir), kinaz alanının aktivasyonu için gereklidir. FRB alanı içindeki Ser2206 (mTOR'daki Ser2035'e karşılık gelir), TOR proteinleri ve FKBP12-rapamisin arasındaki etkileşim için çok önemlidir. Lys2363 (mTOR'daki Lys2187'ye karşılık gelir), protein ve lipid kinazlardaki fosfotransferaz reaksiyonları için kritiktir ve wortmannin tedavisi üzerine kovalent olarak modifiye edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada tanımlanan üç mutant alel (h111 , h131 ve h114) de gösterilmiştir. Her aleldeki mutasyon konumu ve karşılık gelen nükleotit değişiklikleri, her alel adının üzerinde belirtilir (Long et al., 2002).

1.2.2. *LET-363/ TOR*

C. elegans'daki TOR ortologu, *Let-363*, lethal mutant fenotipine dayalı olarak adlandırılmıştır (Howell et al., 1987) daha sonra ise bir TOR proteini olarak tanımlanmıştır (Hara et al., 2002). *Let-363* alellerinin kısmi dizilimi, h111 , h131 ve h114 alellerinin, CeTOR'un kodlama dizisinin 104, 906 ve 2398 amino asitlerinden sonra

durdurma kodonlarına yol açan nokta mutasyonları içerdiğini ortaya koymaktadır (Şekil 6B) (Long et al., 2002). Kinaz alanı HEAT tekrarları [dört protein (Huntingtin, EF3, PP2A ve TOR1) olarak adlandırılır] ve FKBP-rapamisin bağlama (FRB), FAT (fokal yapışma hedefleme), fosfatidilinositol kinaz homoloji ve FAT C-terminal alanları dahil olmak üzere tüm anahtar alanlarda güçlü koruma bulunmuştur.

Bir *Let-363* promotörü tarafından yönlendirilen GFP raportörünün ekspresyonu, embriyoda başlamıştır ve daha sonra tüm aşamalarda ve tüm ana dokularda (ve belki de tüm hücrelerde) görülmüştür. *Let-363* geni, L3 larva aşamasında tutuklanan çok sayıda farklı mutant (heterozigot annelerden elde edilen) olarak solucan gelişimi için açıkça gereklidir. *Let-363*'teki mutasyonlar, gelişimi önemli ölçüde yavaşlatır ve L3'ün sonlarında gelişimin durmasına neden olur. Mutantlar kırılgan ve otofloresan bağırsak granülleri, artan bağırsak lümen boyutu ile bağırsak sitoplazmik hacmini azaltması, artan yağ depolaması ve ayrıca tehlikeye giren sindirim sergilemiştir. Bu fenotipler ayrıca bakteri besleme aracılı RNA interferansı (RNAi) tarafından *Let-363* geninin yıkıldığı solucanlarda da görülmüştür (Long et al., 2002).

1.2.3. *DAF-15/Raptor*

Daf-15, Raptor'un *C. elegans* homologunu kodlar ve TORC1 aktivitesi için gereklidir. Yiyecek yoksunluğuna yanıt olarak *C. elegans*, L2'den sonra L3 larvaları yerine özel dauer larvaları haline geldikleri alternatif bir gelişim yoluna girer. *Daf-15*, yapısal anormal dauer oluşumu olan işlev kaybı mutant fenotipine göre adlandırılmıştır (Albert & Riddle, 1988). Heterozigotlardan ayrılan *Daf-15* (*m81*) yanlış anlamlı mutantları, bazı dauer benzeri morfolojik özelliklerle L2'de embriyonik gelişmeyi durdurmuştur. Bununla birlikte, tipik dauer oluşturucu mutantların aksine, *Daf-15* (m81) mutantları sporadik beslenme ve artan vücut boyutu sergilemiştir. *Daf-15* ve memeli *Raptor* arasındaki yapısal benzerlik daha sonra memeli Raptor'u ilk tanımlayan çalışmalardan birinde fark edilmiştir. *Daf-15* RNAi, bağırsakta artan kırılma ve otofloresan granüller, artan bağırsak lümeni ile bağırsak hücre sitoplazmasında azalma, artan yağ depolaması ve artan hipodermal granüller dahil olmak üzere ek fenotiplerle L3 larvalarının durmasıyla sonuçlanmıştır. Esasen bu fenotiplerin tümü *daf-15*(RNAi) ve *Let-363* (RNAi) arasında ortak olduğundan, bu bulgular *Let-363*/TOR ve *Daf-15*/Raptor'un *C. elegans* TORC1'deki öngörülen rolleriyle tutarlı olmuştur (Hara et al., 2002; Jia et al., 2004).

1.2.4. *RICT-1/Rictor*

C. elegans varsayılan Rictor ortologu, *Rict-1*, yağ depolamasını etkileyen genler için iki ileri genetik taramada tanımlanmıştır. İki laboratuvar tarafından bağımsız olarak izole edilen *Rict-1*'in fonksiyon kaybı alelleri, artan vücut yağı, gelişimsel gecikme (yavaş büyüme) ve azalan vücut boyutu sergilemiştir. *Rict-1*(RNAi), mutantların yüksek yağlı fenotipini ve *Rict-1* (lf) mutantlarının fenotipini daha fazla geliştirmemiştir. Bu *Rict-1* alelleri, diyete ve diğer koşullara bağlı olarak yaşam süresi üzerinde çeşitli etkilere sahip olabilir. Özellikle, *Let-363* /*TOR* veya *Daf-15/Raptor* kaybından farklı olarak, *Rict-1*'in bu alelleri larva durmasına neden olmamıştır, bu da TORC2'nin larva gelişimi için gerekli olmadığını düşündürmüştür. *Rict-1* promotörü tarafından yönlendirilen GFP raportörünün ekspresyonu bağırsakta, hipodermiste ve nöronlarda ifade edilmiştir (Jones et al., 2009; Soukas et al., 2009). Memeliler, Rictor proteinlerini kodlayan üç gene sahipken, *C. elegans*'ın bu yapısal ve işlevsel benzerliği paylaşan tek bir proteine sahip olduğu görülmüştür.

1.2.5. *4E-BP1*/ ökaryotik başlatma faktörü 4E

Gen ifadesinin kontrol edildiği düzeylerden biri mRNA'nın translasyonudur. Translasyonel kontrol, normal embriyonik gelişim, hücre döngüsünün uygun şekilde düzenlenmesi, doku indüksiyonu ve farklılaşması ve germ hattı gelişimi için çok önemlidir.

Ökaryotik başlatma faktörü 4E (eIF4E) bağlayıcı protein olarak adlandırılan 4E-BP1, memeli hücre kültüründe mTORC1'in fosforilasyon hedefi olduğu gösterilen bir translasyonel baskılayıcıdır (Ma & Blenis, 2009). eIF4E'nin hücre içi seviyeleri, mRNA'ların translasyon oranını güçlü bir şekilde etkiler dolayısıyla eIF4E, translasyonun düzenlenmesi için çekici bir hedeftir. eIF4E'nin aşırı ekspresyonunun düzensiz hücre çoğalmasına ve tehlikeli transformasyona neden olabileceği bulgularıyla vurgulanmaktadır. Tersine, eIF4E'nin antisens RNA tarafından tüketilmesi, büyüme hızını yavaşlatır ve kanser hücrelerinde onkojenik dönüşümü kısmen tersine çevirir (Amiri et al., 2001).

İlk başta *C. elegans*'ın 4E-BP1 homologundan yoksun olduğu düşünülse de (Long et al., 2002) daha sonraki bir çalışma IFET-1'i (aka *SPN-2*) *C. elegans*' da 4E-BP1 benzeri protein olarak tanımlanmıştır (Li et al., 2009). *C. elegans*'ta, *IFE-1*, *IFE-2*, *IFE-3*, *IFE-4* ve IFE-5 olarak adlandırılan beş eIF4E izoformu vardır. Birincil dizilimlerine, kap

bağlama özgüllüklerine ve canlılık gereksinimlerine bağlı olarak, IFE proteinleri üç sınıfa ayrılmıştır. A Sınıfı, insan eIF4E-1'ine en çok benzeyen ve yaşayabilirlik için gerekli olan IFE-3'ü içerir. Sınıf B, IFE-1, IFE-2 ve IFE-5'i içerir. Herhangi bir bireysel sınıf B üyesinin RNA-aracılı girişim (RNAi) ile tükenmesi canlılığı etkilememiştir. Bununla birlikte, üç proteinin hepsinin ekspresyonunun bloke edilmesi, embriyonik gelişimde gereksiz bir şekilde işlev gördüklerini öne sürerek, %99 embriyonik ölümcüllüğe neden olmuştur. C Sınıfı, *C. elegans*'ta eIF4E'nin en farklı izoformu olan ve tamamen vazgeçilebilir olan IFE-4'ü içerir. IFE-1'in eşey hattı gelişimindeki potansiyel rolü, bir maya iki hibrit elekte germ-granül bileşeni PGL-1 ile etkileşimi ile dikkat çekicidir (Amiri et al., 2001).

1.2.6. SGK-1

Memeli insülin sinyal yolu, insüline çeşitli hücresel tepkilere aracılık eden çoklu aşağı akış hedeflerini etkiler. DAF-2 insülin reseptörü benzeri sinyal yolu, *C. elegans'*ta metabolizmayı, gelişimi, uzun ömürlülüğü ve stres tepkisini kontrol eder. Burada, serum ve glukokortikoid ile indüklenebilir kinaz SGK' nın *C. elegans* homologu olan Sgk-1'in, Daf-2 sinyallemesine aracılık etmek için AKT kinazlarına paralel hareket etmektedir. Sgk-1'in kaybı kusurlu yumurtlama, uzamış üretim süresi, artan stres direnci ve yaşam süresinin uzamasıyla sonuçlanır. Sgk-1, AKT kinazları ile bir protein kompleksi oluşturur ve PDK-1 tarafından aktive edilir ve kesinlikle ona bağlıdır. Bu kompleksin üç kinazının tümü, Daf-16/FKHRL1'i doğrudan fosforile edebilir, ancak Daf-2 sinyallemesinde farklı işlevlere sahiptir. AKT-1 ve AKT-2, kemik oluşumunu düzenlemek için daha önemliyken, Sgk-1 gelişimin kontrolü, stres yanıtı ve uzun ömürlülük için çok önemli bir faktördür (Hertweck et al., 2004).

1.2.7. S6K/RSKS-1

S6K, ribozomal protein S6 kinaza verilen yaygın addır. Memeli hücre kültürü ve diğer model organizmalardaki *in vitro* analizler, S6K'nın mTORC1'in doğrudan bir fosforilasyon hedefi olduğunu ortaya çıkarmıştır. S6K'nın *C. elegans* homologu Rsks-1 olarak tanımlanmıştır (Blackwell et al., 2019).

L3/L4 aşamalı Rsks-1 mutasyonlu solucanlar, azalmış sayıda germ hattı progenitörleri sergilemiştir. Rsks-1 /S6K, ribozomal fonksiyonu ve protein sentezini destekler ve aktivitesinin azaltılması, maya, *C. elegans*, *Drosophila* ve dişi farelerde yaşam süresini uzattığı gözlemlenmiştir (Blackwell et al., 2019).

1.3. mTOR İnhibitörleri

1.3.1. Rapamisin

Rapamisin, memeli, *Drosophila* ve maya hücrelerinde mTOR üzerindeki inhibitör etkileriyle iyi bilinen *Streptomyces hygroscopicus* tarafından üretilen bir antifungal metabolittir. Rapamisin, insanlarda bir bağışıklık baskılayıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve yaşlanma önleyici bir ilaç için bir paradigma olarak büyük ilgi görmektedir. Memelilerde, rapamisin ve hücresel protein FKBP12 (FK506-bağlayıcı protein 12) arasındaki bir kompleks, TOR'un FRB alanına bağlanır ve böylece TORC1 kinazı, bazı substratları diğerlerinden daha ciddi şekilde etkileyen bir şekilde inhibe etmektedir (Blackwell et al., 2019).

C. elegans LET-363, FRB (FKBP-Rapamisin Bağlama alanı) alanına kadar uzanan koruma ile diğer türlerden TOR proteinleri ile yüksek oranda ilişkilidir. *C. elegans*'ta bir dizi FKBP (FK506-bağlayıcı protein) ailesi üyesi mevcuttur. Bunlardan FKB-2, *Saccharomyces cerevisiae*'deki (FPR1) FKBP12 ortologundan daha fazala insan FKBP12'sine benzemaktedir (Pemberton & Kay, 2005). Genetik analizler TOR'un FPR1/rapamisin etkisinin biyolojik hedefi olduğunu ortaya çıkarmıştır (Kunz et al., 1993). Bu nedenle, rapamisinin diğer türlerde TORC1'i inhibe ettiği mekanizmaların *C. elegans*'ta korunmuş olduğu görünmektedir (Corsi et al., 2015).

Rapamisin-FKBP12 kompleksi, mTORC1'i doğrudan inhibe ederken, mTORC2 akut rapamisin tedavisine duyarsızlığı ile karakterize edilir. mTORC1 gibi mTORC2 de mTOR ve mLST8 içerir. Bununla birlikte, *Raptor* yerine mTORC2, muhtemelen benzer bir işleve hizmet eden ilgisiz bir protein olan Rictor'u içerir. Rapamisin-FKBP12 kompleksleri mTORC2'yi doğrudan bağlamasa veya inhibe etmesede, uzun süreli rapamisin tedavisi, muhtemelen rapamisine bağlı mTOR'un mTORC2 komplekslerine dahil edilememesi nedeniyle mTORC2 sinyalini iptal eder (Saxton & Sabatini, 2017).

TORC1'in evrimsel olarak korunması ve rapamisine duyarlılığı, rapamisinin *C. elegans*'ta TORC1 aktivitesini azaltacağını öne sürsede, rapamisinin *C. elegans* büyümesi üzerindeki etkisi sınırlıdır ve *Let-363* ile ilgili bir fenotipi ortaya çıkarmaya yönelik ilk çabalar çeşitli yöntemlerle ve konsantrasyonlarla başarısız olmuştur (Long et al., 2002).

Daha sonraki bir çalışma, yetişkin solucanlarda yüksek dozda (100 uM) rapamisin ile tedavinin neden olduğu, aşamaya ve doza bağlı bir rapamisin etkisi ortaya çıkarmıştır. Genetik TORC1 inhibisyonu ile aktive edilen genlerin yukarı regülasyonu, yaşam

süresinde artış, translasyonda azalma ve genetik etkileşim testlerinde TORC1/2 aktivitelerinin azalması ile sonuçlanmıştır (Robida-Stubbs et al., 2012).

Genetik veya diyet manipülasyonundan kaynaklanan mTORC1 hiperaktivasyonunun insülin direncine yol açması, birçok kişinin mTORC1 inhibitörlerinin glikoz toleransını iyileştirebileceği ve tip 2 diyabete karşı koruyabileceği konusunda spekülasyon yapmasına yol açmıştır. Bununla birlikte, paradoksal olarak, rapamisin kullanılarak mTORC1'in kronik farmakolojik inhibisyonu, insülin direncine ve bozulmuş glikoz homeostazına neden olarak ters etkiye sahiptir. Bu sonuç, en azından kısmen, uzun süreli rapamisin tedavisinin ayrıca mTORC2 sinyalini *in vivo* olarak inhibe etmesi gerçeğiyle açıklanmaktadır (Saxton & Sabatini, 2017).

Kanserde kullanılması onaylanan ilk mTOR inhibitörleri, "rapaloglar" olarak bilinen bir rapamisin türevleri sınıfındadır. Allosterik inhibitörler olarak, rapalogların mTORC1 substratlarının hepsinin olmasa da bazılarının fosforilasyonunu bloke eder. Özellikle 4EBP'nin fosforilasyonu, rapamisine büyük ölçüde duyarsızdır. mTORC1'in inhibe edilmesi, insülin/PI3K/Akt sinyali üzerindeki negatif geri beslemeyi serbest bırakır ve bu nedenle paradoksal olarak hücre hayatta kalmasını destekleyebilir ve bazı bağlamlarda apoptozu önleyebilir (Saxton & Sabatini, 2017).

Son olarak, mTOR sinyali, maya, solucanlar, sinekler ve memeliler dahil olmak üzere çeşitli organizmaların yaşlanma sürecinde güçlü bir şekilde yer almaktadır. Bu ilk olarak, mTOR (ceTOR, eski adıyla *Let-363*) veya Raptor'un (*Daf-15*) homologlarının ekspresyonunun azalmasının yaşam süresini uzattığını bulan nematod *C. elegans*'ta yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir. Bununla uyumlu olarak, mTOR inhibitörü rapamisin, şu anda tüm bu model organizmalarda yaşam süresini uzattığı kanıtlanmış tek farmakolojik tedavidir (Saxton & Sabatini, 2017).

1.3.2. Temsirolimus

Enjeksiyon için tasarlanmış bir rapamisin esteridir ve rapamisin ile aynı aktiviteyi gösterir. Bu bulgu, otofajinin yukarı regülasyonunun, kümeleşmeye eğilimli intrasitosolik proteinlerin neden olduğu çeşitli hastalıklar için etkili bir terapötik strateji olabileceği olasılığını artırmıştır (Menzies et al., 2009). Rapalog temsirolimus (Pfizer) ilk olarak 2007'de ilerlemiş renal hücreli karsinomun tedavisi için onaylanmıştır (Saxton & Sabatini, 2017). Temsirolimus, rapamisinin memeli hedefini inhibe eder ve dolayısıyla otofaji ile protein yıkımını yukarı doğru düzenler. Temsirolimus, transgenik farelerin

beyinlerinde görülen agregatların sayısını azaltmıştır ve sitozolik çözünür mutant ataksin-3 seviyelerini düşürürken, endojen yabanıl tip protein seviyeleri etkilemediği görülmüştür (Menzies et al., 2009).

1.3.3. Everolimus

Everolimus, bir antitümör ajanı olarak geliştirilmekte olan bir rapamisin analoğudur. Rapamisin gibi, everolimus siklofilin FKBP-12'ye bağlanır ve bu kompleks rapamisin serin-treonin kinaz memeli hedefini (mTOR) bağlar ve bir kompleks (mTORC1) oluşturmak üzere Raptor ve mLST8 ile ilişkilendirilir ve sinyal akışını engeller. Önemli olarak, rapaloglar, farmakolojik olarak ulaşılabilir ilaç konsantrasyonlarında doğrudan mTOR kinaz inhibitörleri değildir. mTORC1, insan kanserlerinde çok sık aktive olan bir yolda fosfatidilinositol 3' kinazın (PI3K) aşağı akışında yer alır. Bu nedenle mTORC1, kanser tedavisi için çok önemli bir hedefi temsil eder. mTORC1, transkripsiyon, hücre döngüsü ilerlemesini ve hayatta kalmayı düzenler (Wullschleger et al., 2006). Bu kompleks, düşük oksijen gerilimi gibi stres koşulları altında hücrelerde bir kısıtlama noktası olarak hareket ederek hücre büyümesini ve metabolizmasını koordine eder (Arsham et al., 2003). mTORC1 tarafından düzenlenen en iyi karakterize edilen yollar, ribozomal S6 kinaz-1'in (S6K1) fosforilasyonu ile aktivasyonu ve mRNA kap bağlayıcı protein eIF4E'nin baskılayıcısı olan 4E-BP1'in fosforilasyonu ve inaktivasyonudur (Houghton, 2010).

Everolimus ve diğer rapaloglar, nanomolar altı konsantrasyon aralığında büyümeyi %50 oranında inhibe ederek çok sayıda insan tümör hücre dizisinin büyümesini güçlü bir şekilde inhibe eder. Rapamisinin bir hidroksietil eter türevi olan Everolimus, rapamisine göre üstün farmasötik özelliklere sahiptir ve oral uygulama için tasarlanmıştır. Temsirolimustan farklı olarak, everolimus *in vivo* olarak rapamisine dönüştürülmez (Houghton, 2010). Everolimus, *in vitro* hücre hattının bu ajana duyarsız olduğu durumlarda bile farelerde insan tümör ksenogreft modellerinin büyümesini inhibe eder. Rapamisin ve temsirolimus için de benzer sonuçlar rapor edilmiştir ve tümör geciktirmesinin maddenin antianjiyojenik aktivitesinin bir sonucu olduğunu öne sürmektedir. Everolimus ile tedavi edilen farelerde büyüyen çeşitli tümör modellerinde gözlenen azalmış kan damarı yoğunluğu bununla tutarlıdır (Houghton, 2010).

Everolimus tedavisinden sonra kanser hastalarının biyopsilerinde artan Akt sinyali gözlemlenmiştir ve rapalogların neden tümörler üzerinde sitotoksik değil de büyük ölçüde

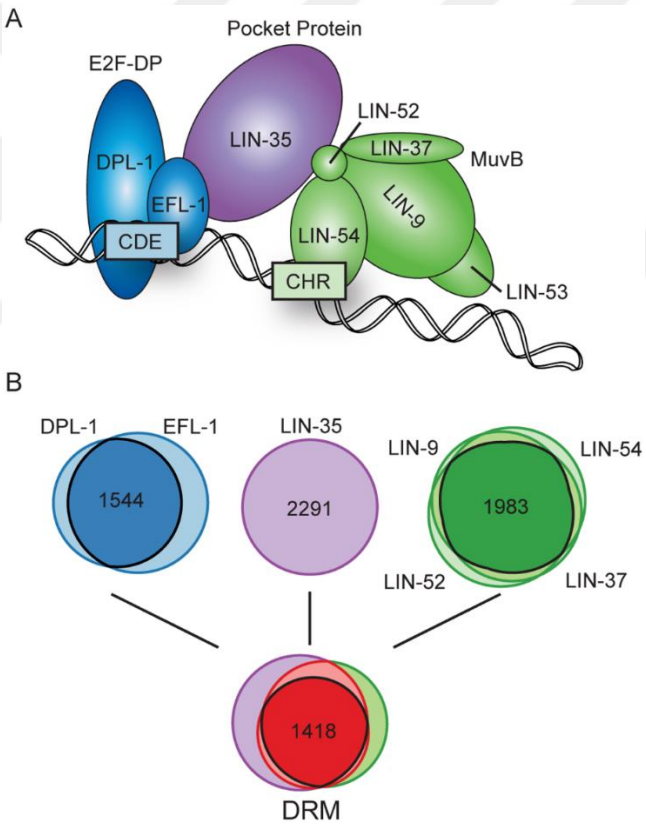
sitostatik etkilere sahip olduğunu açıklamaya yardımcı olabilir (Saxton & Sabatini, 2017). Sağlıklı yaşlı insanlarda everolimus kullanan bir denemenin güvenlik ve hatta bağışıklık fonksiyonunu iyileştirdiği ve azaltılmış yan etkilerle ömrü uzatabilen alternatif dozlama rejimleri önerilmiştir(Saxton & Sabatini, 2017).

1.4. *C. elegans'ta lin-35/Rb*

Retinoblastoma (*Rb*) ilk tümör baskılayıcı olarak keşfedilmiştir ve hücre döngüsü regülasyonunda önemli bir role sahip olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, *R*b'ye apoptoz, farklılaşma ve durgunluk gibi daha birçok biyolojik yön atfedilmiştir. *pRb*, cep proteinleri olarak adlandırılan bir aileye aittir ve memelilerde diğer iki üye vardır: p130 ve p107. *pRb* gibi, bu proteinler de hücre döngüsünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eder (Cui et al., 2013)

DREAM (Dp/Retinoblastoma(Rb)-like/E2F/MuvB) transkripsiyonel baskılayıcı kompleksi, hücresel sessizliği oluşturarak ve sürdürerek, memeli hücre döngüsünün bekçisi olarak hizmet etmektedir (Goetsch et al., 2017). Omurgasızlardan memelilere, DREAM kompleksi korunmaktadır (Litovchick et al., 2007). Bu hücre döngüsü sessizlik yoluna, *Dp, Retinoblastoma (Rb)-like, E2F* ve *MuvB* temsil eden yüksek düzeyde korunmuş DREAM transkripsiyonel baskılayıcı kompleksi aracılık etmektedir (Litovchick et al., 2007; Pilkinton et al., 2007; Sadasivam & DeCaprio, 2013). Bir retinoblastoma benzeri cep proteini (memelilerde, p130 veya p107), bir "baskıcı" E2F-DP heterodimeri (memelilerde, *E2F4*/*5*-*DP1*/*2*) ve MuvB olarak adlandırılan 5 alt birimli bir alt kompleks (memelilerde, *lin9, lin37, lin52, lin54* ve *RBAP48*) DREAM'i oluşturur (Harrison et al., 2006; Korenjak et al., 2004; Litovchick et al., 2007). Önemli hücre döngüsü genlerini doğrudan baskılayarak, 8 alt birimli DREAM kompleksi, hücre döngüsü yeniden girişinin negatif düzenleyicisi olarak işlev görür (Litovchick et al., 2007; Pilkinton et al., 2007). Yalnızca DRM olarak bilinen solucan DREAM kompleksinin bir bileşeni olan retinoblastoma proteini (*pRB*) ile ilişkili bir protein olan *lin-35, C. elegans*'ta bulunan bir cep proteinidir (Şekil 8) (Goetsch et al., 2017, Lu and Horvitz, 1998). Nematod *C. elegans*, cep proteinlerinin ve DRM protein kompleksinin nasıl çalıştığını öğrenmede yardımcı olduğunu kanıtlamıştır (Goetsch et al., 2017; van den Heuvel & Dyson, 2008). DRM kompleksinin en iyi bilinen rollerinden biri, C. elegans'ta vulval gelişim sırasında ortaya çıkar. C. elegans vulva, larva gelişimi boyunca gelişir ve yetişkin hermafroditlerde erkeklerle yumurtlama ve çiftleşme için gereklidir

(Sternberg, 2005). Ek olarak, insan retinoblastoma geni (Rb) *lin-35*'in ortologunun başka bir önemli rol oynadığı mekanizma apoptozdur (Schertel & Conradt, 2007). C. elegans'ta apoptoz somatik dokularda (gelişimsel apoptoz) (Sulston & Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983) ve yetişkin hermafrodit gonadda (fizyolojik germ hücre apoptozu) (Gumienny et al., 1999) embriyonik ve postembriyonik dönemde meydana gelir ve fizyolojik germ hücre apoptozu, insan retinoblastoma geni (*Rb*) *lin-35*'in ortologu tarafından indüklenir (Schertel & Conradt, 2007). Ayrıca, oksidatif, ozmotik, ısı şoku ve açlık stresleri dahil olmak üzere çeşitli koşullar germ hücre apoptozunu indükleyebilir (Salinas et al., 2006). Bu nedenle, memeli *Rb*'nin farklı dokularda ve bağlamlarda apoptozdaki rolünün kapsamlı bir şekilde anlaşılması, *Rb*'nin tümör baskılayıcı aktivitesi ve dolayısıyla *Rb* eksikliği olan tümörlerde tümör oluşumu hakkındaki bilgimizi neredeyse kesin olarak geliştirecektir.



Şekil 8. Geç *C. elegans* embriyolarında DRM kompleksinin kromatin ilişkisi. (A) DNA'ya bağlı *C. elegans* DRM kompleksinin modeli: E2F-DP (mavi), cep proteini *lin-35* (mor) ve 5 alt birim MuvB çekirdeği (yeşil). Alt birim etkileşimleri ve E2F-DP ve *lin-54*'ün sırasıyla CDE ve CHR DNA motiflerine bağlanması (B) Kademe 1: E2F-DP (1771 DPL-1 tepe noktası, 2119 EFL-1 tepe noktası), *lin-35* (2291 tepe noktası) ve 4/5 için vahşi tip geç embriyolarda ChIP-seq tepe örtüşmelerini gösteren Venn diyagramları MuvB çekirdeğinin alt birimleri (2067 *lin-9* zirvesi, 2111 *lin-37* zirvesi, 2284 *lin-52* zirvesi, 2290 *lin-54* zirvesi). Katman 2: E2F-DP, *lin-35* ve MuvB arasındaki toplam tepe çakışmalarını gösteren Venn diyagramı (Goetsch et al., 2017).

Solucanların açlığa yanıt olarak gen ekspresyonunu nasıl koordine ettiğini anlamak, yaşlanma, obezite ve kanserle yakından bağlantısı açısından oldukça önemlidir. Yumurtadan yeni çıkmış *C. elegans*, gelişmeyi durdurarak ve uzun süreli hayatta kalmayı (L1) teşvik ederek gıda yoksunluğuna yanıt verir, böylece açlık tepkisini incelemek için mükemmel bir model sağlar. Tümör baskılayıcı *Rb*'nin L1 diyapozu sırasında sağkalımı kritik bir şekilde desteklediğini ve bunu muhtemelen hem insülin/IGF-1 sinyallemesine (IIS) bağımlı hem de bağımsız yollardaki genlerin ekspresyonunu esas olarak nöronlarda düzenleyerek yaptığı keşfedilmiştir (Cui et al., 2013).

Tümör baskılayıcı *Rb*'nin *C. elegans* ortologunu kodlayan *lin-35*'dir. *lin-35*, açlık sırasında L1 larvalarının hayatta kalması için önemli bir role sahiptir. *lin-35*, açlık sırasında ifade edilen *StarvUP* genlerinin ifadesini kontrol eder. Bazı araştırmacılar mikroarray analizleri aracılığıyla, aç kalmış L1 *lin-35* (n745) mutant solucanlarının gen ekspresyonunu yabanıl tip solucanlarla solucanlarla karşılaştırmışlardır. Bu araştırmacılar, yabanıl tip solucanlarla karşılaştırıldığında *lin-35*(n745) mutant solucanlarda açlık sırasında 1200 genin ifadesinin etkilendiğini bulmuşlardır. Bu genlerin %57'si aşağı regüle edilmiştir. Aynı zamanda insülin benzeri proteinleri kodlayan iki gen, *ins-24* ve *ins-30*, aç kalmış *lin-35*(n745) L1 larvalarında aşağı regüle edilirken ve aynı koşullar altında yabanıl tip solucanlarda yukarı regüle edildiği gözlemlenmiştir. Bu durum *lin-35*'in bir insülin/IGF-1 reseptör sinyali (IIS) antagonisti olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. (Cui et al., 2013). SILAC (Hücre kültüründe Amino asitlerle/Amino asitlerle Stabil İzotop Etiketlemesi) kütle spektroskopisi kullanılarak yapılan bir çalışma, L4 aşamasındaki solucanların protein profilinin, açlığa maruz kaldıkları süre boyunca önemli değişikliklere sahip olduğunu göstermiştir. *lin-35* yapılan bu analizde sayıca fazla olmaı bu cep proteininin L4 aşamasındaki solucanların açlığa tepkisi için önemli olduğunu düşündürmüştür (Larance et al., 2015)

2. AMAÇ

C. elegans model organizması bilimsel araştırmalarda sağladığı avantajları sayesinde solucan deneyleri için iyi bir alternatif oluşturarak büyüme, metabolizma, kanser ve yaşlanma konularında yapılan araştırmalar için uygun bir sistem sunduğu bilinmektedir. Büyüme, metabolizma, kanser ve yaşlanma konularında önemi nedeniyle memeli hücre kültürü ve genetik sistemlerinde yoğun olarak çalışılan TOR'un *C. elegans* model organizmasında çalışılarak aydınlatılması önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, öncelikli olarak *C. elegans* model **organizmasının yabanıl tip *(*N2*)* ve mutant (*lin-35*)** temin edilmesi, stabilizasyonu, kültürlenmesi, stok kültürlerinin oluşturulması, dondurulması, devamlılığı ve senkronizasyonu sağlanmıştır.

TOR sinyal kompleksinin baskılanmasını rol oynayan **rapamisin (sirolimus), temsirolimus, everolimus** inhibitörler farklı konsantrasyonlarda uygulanarak N2 *ve lin-35* tiplerde ömür uzunluğu ve fertilizasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Ayrıca boyut analizleri gerçekleştirilmiştir.

C. elegans'ta potansiyel bir moleküler hedefi temsil eden TOR sinyal kompleksi bileşenlerinin gen ifade düzeyleri RT-qPCR ile inhibitör uygulanan ve uygulanmayan iki farklı suşta tespit edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında veriler göz önünde bulundurulduğunda kanser ile ilişkili genleri içeren *C. elegans* suşlarında TOR sinyal kompleksi bileşenlerinin güçlü ve seçici inhibitörleri olan **rapamisin (sirolimus), temsirolimus, everolimus** etkilerinin ilk defa bu çalışma ile ortaya konması kanser tedavileri için yeni terapötik yolların tanımlanması açısından oldukça büyük önem taşımaktadır. *C. elegans*'ta TOR sinyal yolu bileşenlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi açısından bu çalışma kanser tedavi sürecine yeni bir yaklaşım sunacaktır. Ayrıca bu çalışma çıktılarıyla TOR inhibisyonu *C. elegans*'ın yaşam süresi üzerine etkilerinin araştırılması TOR ve yaşlanma arasındaki bağlantıyı kurmaya öncülük edecek ve uzun ömürlülük ve yaşlanmayı geciktiren aşağı akış mekanizmalarını destekleyen çeşitli, genetik ve farmakolojik müdahalelerde etkileşimin rolünün anlaşılmasına önemli katkılar sunacağı düşünülmektedir. Rapamisin ve analoglarının sağlığın uzamasını düzenleyen moleküler mekanizmalarının aydınlatılması, insan yaşlanması ve yaşa bağlı bozuklukların tedavisinde terapötik uygulanabilirliğini genişletecektir.

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmada gerçekleştirilen deneylerin sıralaması aşağıdaki basamaklar izlenerek gerçekleştirilmiştir:

- *C. elegans* suşlarının temini, kültürün başlatılması, stoklara ayrılması, -80 °C'de dondurulması
- Senkronizasyon işlemlerinin yapılması
- Rapamisin (sirolimus), temsirolimus ve everolimus inhibitörlerinin farklı konsantrasyonlarda uygulanarak N2 ve *lin-35* tiplerde ömür uzunluğu ve fertilizasyon testlerinin yapılması
- RNA izolasyonu, cDNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi
- Hedef genlerin relative ekspresyon seviyelerinin Kantitatif Real-time PCR ile belirlenmesi
- İstatiksel Analiz

3.1. *C. elegans* Suşlarının Seçimi ve Temin Edilmesi

Bu çalışmada kullanılmak üzere *C. elegans*'ın yabanıl tip (N2 Bristol), ve mutant (*lin-35*) AWR54 (kea7[Lin-35 p::degron::GFP::Lin-35]) I; ieSi57 [eft-3p::TIR1::mRuby::unc-54 3'UTR + Cbr-unc-119(+)] II suşları suşları Ulusal Sağlık Enstitüleri-Araştırma Altyapı Programları Ofisi (P40 OD010440) tarafından desteklenmekte olan Caenorhabditis Genetics Center'den (CGC, Minnesota Üniversitesi) temin edilmiş olup laboratuvarımızda mevcuttur. Temin edilen *C. elegans* suşları 20^0C inkübatör içerisinde yapılacak deneyler için stabilizasyonu sağlanmıştır ve kültürü devam etmektedir. *C. elegans* mutant suş Kirienko ve ark., tarafından yapılan çalışmasında belirtilen hiperplazi ile ilişkili genlerin çalışıldığı suşlardan seçilmiştir (Kirienko et al., 2010). Suş isimleri, memeli ortologları, hangi dokuları etkilediği ve bu çalışmada kullanılma nedenleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Tümör baskılayıcı *Rb*'nin *C. elegans* ortologunu kodlayan *lin-35*'dir. *Rb* hücresel süreçlerde önemli düzenleyici roller oynamaktadır. *C. elegans* retinoblastoma protein homologu, *lin-35* hücre döngüsü girişinin ana düzenleyicisidir ve sentetik multivulval genlerle ilgili çalışmaların kanıtladığı gibi vulval hücre kaderini belirlemede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. *lin-35*'in EGF ailesi üyesi *lin-3*'ün ekspresyonunu inhibe ettiğinin keşfi, parakrin büyüme faktörü sinyal baskılamasının, *Rb* familyası üyelerinin

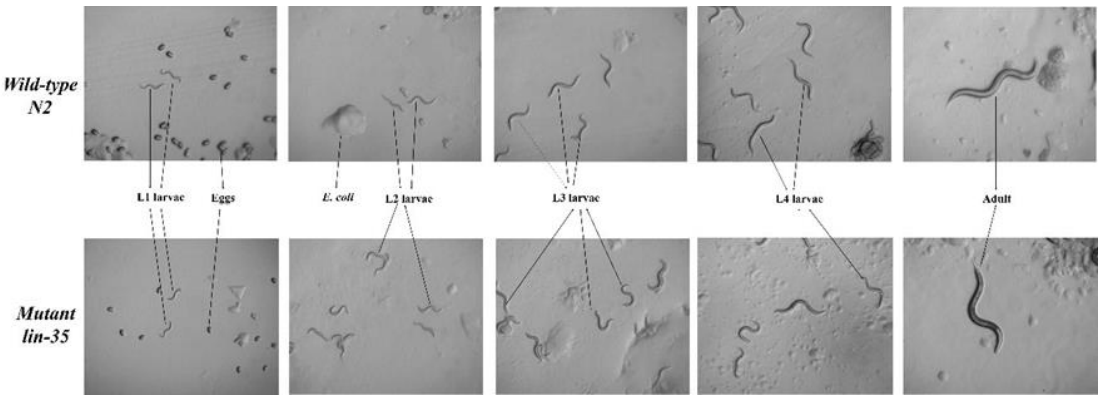
hücre gelişimini azalttığı ve dolayısıyla kanseri önlemek için çalıştığı bir mekanizma olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, *lin-35* fonksiyonlarının analizinin, *Rb* ailesi tarafından tümör baskılanmasının yeni mekanizmaları hakkında değerli bilgiler sağlayabileceğini düşündürmüştür (Bender et al., 2007) .

Mutant *lin-35* suşunda rapamisin ve analoglarının (temsirolimus ve everolimus) antiaging etkilerini yabanıl tip N2 solucanları ile karşılaştırarak ortaya koymak ve ayrıca yabanıl tip N2 solucanları ile mTOR yolu bileşenlerinin ifadesindeki karşılaştırmalı farklılıkları ortaya çıkarmak amacıyla bu suşlar seçilmiştir.

Tablo 1. *C. elegans* suşları

Suş Adı	**Gen adı *(C. elegans)***	**Gen adı (Memeli Ortoloğu)**	**Hedef Doku**	**Rol oynadığı hücresel süreçler**	**Referanslar**
N2 Wilde Type					(Brenner, 1974)
lin-35	C32F10.2	Retinablastoma p107, p130	Intestinal sistem, Çoklu (multiple) tipler,	Tümör Süpresör	(Grishok & Sharp, 2005)

Temin edilen suşlar standart kültür koşullarında kültüre edilmiştir (Brenner, 1974). Laboratuvarda, nematodlar *Escherichia coli* bakterisi içeren NGM agar petri kapları (ISOLAB, #08102061) üzerinde büyütülmüştür (Stiernagle, 2006). Deneyler, sıvı S medium besiyerinde gerçekleştirilmiştir (Stiernagle, 2006). *E.coli*, 37 °C'de LB Broth besiyerinde inkübe edilmiştir (Avery, 1993). Suşların senkronize yaşam evreleri Şekil 9'de gösterilmiştir.



Şekil 9. N2 ve *lin-35* solucanlarına morfolojik genel bakış. Belirli yaşam evrelerinde (yumurtalar, L1-L4 larvaları ve yetişkinler) N2 ve *lin-35* solucanlarına morfolojik genel bakış. Solucanlar, 20°C'de NGM petri kabında tutulmuştur. Görüntüler, bir stereo mikroskop kullanılarak 40X büyütmede elde edilmiştir.

3.2. *C. elegans* Kültür Koşulları

3.2.1. *C. elegans* kültürü için gerekli olan stok çözeltiler ve hazırlanması için kullanılan kimyasallar

Nematod büyüme ortamı (Nematod Gowth Medium-NGM), S medium, S bazal, LB agar, LB broth, dondurma solüsyonu, M9 tamponu, eser metaller çözeltisi çözeltilerinin kimyasal adları, markaları, moleküler ağırlıkları, kimyasal formülleri ve Cat. numaraları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. *C. elegans* kültürü için gerekli olan stok çözeltilerin hazırlanması için kullanılan kimyasallar

	KİMYASAL ADI	KİMYASAL FORMÜL	MARKA	CAT. NO	MOLEKÜLER AĞIRLIĞI (g/mol)
1	Agar		Sigma Aldrich	9002-18-0	373,24
2	Citric Acid Monohydrate	$C_6H_8O_7.H_2O$	Sigma Aldrich	5949-29-1	210,14g/mol
3	Copper (II) Sulfate Pentahydrate	$CuSO_4.5H_2O$	Sigma Aldrich	7758-99-8	249,68g/mol
4	D (+)-Glucose Monohydrate	$C_6H_{12}O_6.H_2O$	ISOLAB	14431-43-7	198,17g/mol
5	Di-Potassium Hydrogen Phosphate	K_2HPO_4	Sigma Aldrich	7758-11-4	174,2g/mol
6	Di-Sodium Hydrogen Phosphate Dihydrate	$HNa_2O_4P.2H_2O$	ISOLAB	10028-24-7	177,99g/mol
7	Disodyum EDTA	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$	Sigma Aldrich		372,24g/mol
8	Glycerol	$C_3H_8O_3$	Sigma Aldrich	56-81-5	92,09g/mol
9	Iron(II) Sulfate Heptahydrate	$FeSO_4.7H_2O$	Sigma Aldrich	7782-63-0	278,01g/mol
10	Kalsiyum Klorür Dihidrat	$CaCl_2.2H_2O$	TEKKİM	10035-04-8	147,02g/mol
11	Lauryl Sulfate Broth		MERCK	2660500	
12	Magnesium Sulfate Heptahydrate	$MgSO_4.7H_2O$	Sigma Aldrich	10034-99-8	246,48g/mol
13	Manganese(II) Chloride Tetrahydrate	$MnCl_2.4H_2O$	Sigma Aldrich	13446-34-9	197,90g/mol
14	Potassium Dihydrogen Phosphate	KH_2PO_4	Sigma Aldrich	7778-77-0	136,08g/mol
15	Potassium Phosphate Monobasic	KH_2PO_4	Sigma Aldrich	7778-77-0	136,08g/mol
16	Potasyum Hidroksit	KOH	EMBOY	-	56,11g/mol
17	Sodium Chloride	NaCl	Sigma Aldrich	7647-14-5	58,5g/mol
18	Sodium Hydroxide Pellets	NaOH	Carlo Erba	1310-73-2	39,9971.g/mol
19	Tri-Potasyum Sitrat	$C_6H_5K_3O_7.H_2O$	TEKKİM	6100-05-6	324,42g/mol
20	Zinc Sulfate Heptahydrate	$ZnSO_4.7H_2O$	Sigma Aldrich	7446-20-0	287,54g/mol
21	Dimethyl Sulfoxide	C_2H_6OS	Sigma Aldrich	67-68-5	78,13g/mol

3.2.2. *C. elegans* kültürü için kullanılan stok çözeltiler

- ✓ **1 M Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH_2PO_4) Tamponu Hazırlanması:** 136,086 g KH_2PO_4 tartılır, 1L dH_2O'da 1L'lik steril cam şişede çözdürülür ve otoklavlanır. 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır (KH_2PO_4 mA: 136,086g/mol).
- ✓ **1 M Dipotasyum Fosfat (K_2HPO_4) Tamponu hazırlanması:** 174,2 g K_2HPO_4 tartılır, 1 L dH_2O ile 1L'lik steril cam şişede çözdürülür ve otoklavlanır 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır (K_2HPO_4 mA:174,2 g/mol).
- ✓ **5 M Sodyum Hidroksit (NaOH) çözeltisinin hazırlanması:** 100 g NaOH tartılır, 500 mL dH_2O'da 500 mL'lik steril cam şişede çözdürülür ve otoklavlanır 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır (NaOH mA:40 g/mol).
- ✓ **5 N Potasyum Hidroksit (KOH) çözeltisinin hazırlanması:** 140,25 g KOH tartılır, 500 mL dH_2O'da 500 mL'lik steril cam şişede çözdürülür ve otoklavlanır 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C'de saklanır (KOH mA: 56,1g/mol).
- ✓ **%30'luk Sukroz çözeltisinin hazırlanması:** 30 g sukroz tartılır, 100 mL dH_2O'da 100 mL'lik steril cam şişede çözdürülür ve otoklavlanır 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C'de saklanır
- ✓ **0,01 M Sodyum Klorür (NaCl) çözeltisinin hazırlanması:** 584 mg NaCl tartılır 100 mL dH_2O'da 100mL'lik steril cam şişede çözdürülür ve otoklavlanarak 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır (NaCl mA:58,44 g/mol).
- ✓ **1 M kalsiyum klorür dihidrat ($CaCl_2(2H_2O)$) çözeltisinin hazırlanması:** 147,01 g tartılır 1L dH_2O'da 1L'lik steril cam şişede çözdürülür ve otoklavlanır 50 mL'lik steril falkonlara dağıtılır ve +4 °C' de saklanır ($CaCl_2(2H_2O)$ mA:147,01 g/mol).
- ✓ **Kolesterol hazırlanması:** 500 mg Kolestrol tartılır, 100 mL saf ethanolde 100 mL'lik cam şişede çözdürülür -20 °C'de saklanır (Kolestrol: 5 mg/mL).
- ✓ **M9 4X tampon hazırlamansı**: KH_2PO_4 (12g), Na_2HP0_4 (24g), NaCl (20g), 4 mL (1M) $MgS0_4$ 1 L dH_2O ile 1 L'lik cam şişede çözdürülür ve otoklavlanır.
- ✓ **50 mL M9 1X'in hazırlanması:** 12.5 mL M9 4X alınır, 37,5 mL dH_2O eklenerek seyreltilir.
- ✓ **S bazal tampon hazırlanması:** NaCl (5,85g), K_2HPO_4 (1g), KH_2PO_4 (6g), 1 L dH_2O'da 1 L'lik steril cam şişede çözdürülür. Kolestrol (5g/mL ethanolde) (1 mL) eklenir ve otoklavlanır.

- ✓ **1M Potasyum Sitrat ($C_6H_5K_3O_7$) çözeltisinin hazırlanması:** Sitrik asit monohidrat (CH_2OOH) 20g, Tripotasyum sitrat ($HOC(COOK)(CH_2COOOK)_2$) 293,5 g tartılır. 1 L dH_2O'da 1 L'lik cam şişede çözdürülür ve otoklavlanır.
- ✓ **1 M Magnezyum Sülfat Heptahidrat ($MgSO_4.7H_2O$) çözeltisinin hazırlanması:** MgSO4 246,48 g tartılır, 1 L dH_2O'da 1 L'lik cam şişede çözdürülür ve otoklavlanır. ($MgSO_4$ mA:246,48 g/mol)
- ✓ **Eser Metaller çözeltisini hazırlanması:** Disodyum EDTA (1,86 g), Demir sülfat heptahidrat ($FeSO_4.7H_2O$) (0,69 g), Mangan klorür tetrahidrat ($MnCl_2.4H_2O$) (0,2 g), Çinko sülfat heptahidrat ($ZnSO_4.7H_2O$) (0,29 g), Bakır sülfat pentahidrat ($CuSO_4.5H_2O$) (0,025 g) tartılır, 1L dH_2O'da çözdürülür 1L'lik cam şişede çözdürülür ve otoklavlanır.
- ✓ **S buffer tamponunun hazırlanması:** NaCl (5,85 g), 0,05 M Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (129 ml) 0,05 M Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) (871 ml). NaCl tartılır ve KH_2PO_4, K_2HPO_4 kimyasallarında çözdürülür.
- ✓ **0.04 M Fudr hazırlanması:** 100 mg Fudr tartılır, 10 mL dH_2O'da steril 15 mL'lik falkonda çözdürülür ve 1.5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüplerinde -20 °C' de saklanır (Fudr mA:246,192 g/mol).

C. elegans deney ortamları için kültür ortamları, tampon içerikleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. *C. elegans* deneyleri için kültür ortamı, çözelti ve tampon içerikleri

<table>
<tr><td rowspan="9">Katı Kültür Ortamı (NGM AGAR) - 1L</td><td>NaCl - 3g</td><td rowspan="9">Sıvı kültür ortamı (S MEDİUM)</td><td rowspan="2">Potasyum Sitrat-1M 10mL</td><td>Citric acid monohydate-20g</td></tr>
<tr><td>Agar - 17g</td><td>Tri-potasyum citrate monohydate-293,5g</td></tr>
<tr><td>Pepton- 2,5g</td><td>$CaCl_2(2H_2O)$-1M-3mL</td><td></td></tr>
<tr><td>$CaCl_2(2H_2O)$- 1mL (1M) Otoklav sonrası eklenir.</td><td>$MgSO_4(7H_2O)$-1M-3mL</td><td></td></tr>
<tr><td>$MgSO_4(7H_2O)$- 1mL (1M) Otoklav sonrası eklenir.</td><td rowspan="4">S Bazal- 1L</td><td>NaCl-5,85</td></tr>
<tr><td>Potasyum fosfat tamponu (K_2HP_4&KH_2PO_4)-25mL (1M)- Otoklav sonrası eklenir.</td><td>K_2HPO_4-1g</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Kolesterol 1mL (5mg/ml Ethanol) Otoklav sonrası eklenir.</td><td>KH_2PO_4-6g</td></tr>
<tr><td>Kolesterol-1mL (5mg/ml Ethanol)</td></tr>
<tr><td rowspan="6">Eser metaller çözeltisi-1L olarak hazırlanır1L S Medium 10mL kullanılır</td><td>Disodyum EDTA-1.86g</td></tr>
<tr><td>$FeSO_4$ $7H_2O$-0.69g</td></tr>
<tr><td>$MnCl_2$ $4H_2O$-0,2g</td></tr>
<tr><td>$ZnSO_4$ $7H_2O$-0,29</td></tr>
<tr><td>$CuSO_4$ $5H_2O$-0.025g</td></tr>
<tr><td rowspan="4">Dondurma Solüsyonu</td><td rowspan="3">S Buffer (1L)</td><td>NaCl- 5,85g</td><td rowspan="4">M9 (4X) Buffer (1L)</td><td>KH_2PO_4-3g</td></tr>
<tr><td rowspan="2">KH_2PO_4-129mL (0,05M)</td><td rowspan="2">Na_2HPO_4-6g</td></tr>
<tr><td rowspan="2">NaCl-5g</td></tr>
<tr><td>K_2HPO_4-871mL (0,05M)</td><td rowspan="2">$MgSO_4$ ($7H_2O$) -1M-1mL</td></tr>
<tr><td>Gliserol (%30)</td><td></td></tr>
</table>

3.2.3. Bakteriyel besin kaynağının hazırlanması

C. elegans genellikle laboratuvarda gıda kaynağı olarak *E. coli* suşu OP50 kullanılarak monoksenik olarak büyütülür (Brenner, 1974). *E. coli* OP50, büyümesi NGM petri kapları ile sınırlı olan bir urasil oksotroftur. *C. elegans*'ların daha kolay gözlemlenmesine ve daha iyi çiftleşmesine izin verdiği için sınırlı bir bakteriyel ekimi tercih edilir. *E. coli* OP50'nin bir başlatıcı kültürü, CGC'den elde edilebilir veya *C. elegans* petrileri ile geri kazanılabilir. Laury Tryptose Broth agar (LB Agar) (Tablo 4) gibi zengin bir besiyerinin

çizgili bir petrideki tek kolonileri izole etmek için başlangıç kültürü kullanılabilir. Petriden tek bir koloni kullanarak, Laury Broth (LB Broth) (Tablo 5) gibi zengin bir solüsyon aseptik olarak kullanılarak inoküle edilir. Kapaklı şişelere konularak otoklavlanır. Oda sıcaklığında birkaç ay saklanabilir (Byerly et al., 1976). Kültürlerin gece boyunca 37 °C'de büyümesi gerekmektedir. *E. coli* OP50 solüsyonu daha sonra NGM petrilerinde tohumlanmasında kullanıma hazırdır. *E. coli* OP50 petrileri ve sıvı kültür 4 °C'de saklanmalıdır ve birkaç ay boyunca kullanılabilir durumda kalabilir.

Tablo 4. LB Agar içeriği

Kullanılan Malzeme	Bakto-Tripton	Bakto-Maya	Agar	NaCl	dH_2O	pH:7.0
Miktar	10 g	5 g	15 g	5 g	1000	

Tablo 5. LB Broth içeriği

Kullanılan Malzeme	Bakto-Tripton	Bakto-Maya	NaCl	dH_2O	pH:7.0
Miktar	10 g	5 g	5 g	1000 mL	

3.2.4. NGM petri kaplarının hazırlanması

NGM agar hazırlama: NaCl (3 g), peptone (2,5 g), Agar (20 g) hassas terazide tartımları yapılarak 1 L deiyonize su içerisinde çözdürülür. 125 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan cxsonra 55 °C'ye kadar soğutulur. Daha önceden hazırlanan ve 0,2 µm gözenekli filtrelerden süzülen 1mL 1M $CaCl_2$, 1mL kolesterol (5mg/ml ethanolde), 1 mL 1M $MgSO_4$ ve 25 mL 1 M KPO_4 (pH:6) besiyerine eklenerek homojenizasyonu sağlanır (Tablo 6). Çalışma için içinde etken madde bulundurulan NGM'ler hazırlanana kadar 55 °C'de bekletilir.

Tablo 6. NGM Agar içeriği

Otoklav öncesi				**Otoklav sonrası**		
Kullanılan Malzeme	NaCl	Agar	Pepton	Kolesterol (5mg/ml ethanolde)	1M KPO_4 Tamponu	1M $MgSO_4$
Miktar	3 g	17 g	2,5 g	1 mL	1 mL	1 mL

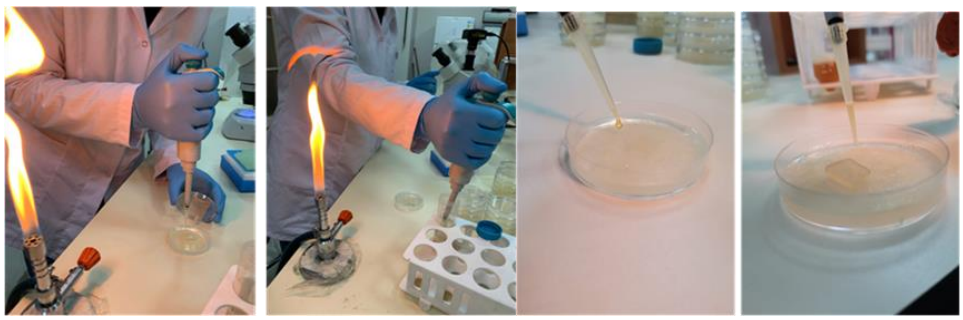
NGM besiyeri ortamına nematodların beslenmesi ve yaşamını sürdürmesi için 60x15 mm'lik petriler için 0,1 mL *E. coli* OP50 solüsyonu steril koşullarda eklenir (Şekil 10). NGM besiyeri dökülen petriler steril ortamda 2-3 hafta içinde kullanılmak üzere +4 °C soğutucuda muhafaza edilebilir. NGM agar ortamında bulunan nematodlar deneyler başlatılana 20 °C'de muhafaza edilir.

Şekil 10. NGM agar petri kaplarının hazırlanışı

3.2.5. NGM petri kaplarında büyüyen solucanların yeni NGM petri kaplarına aktarılması (pasajlama)

*C. elegans'*ın bir petriden diğerine aktarılması için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Hızlı ve kullanışlı bir yöntem, 'pasajlama' olup, pasajlama sırasında bir agar yığınını eski bir petriden yeni bir petriye taşımak için alevde sterilize edilmiş bir nester veya bistüri kullanılır. Pasajlama sonrası *C. elegans* petri kaplarına 50 µL *E. coli* OP50 besini verilir (Şekil 11).

- ✓ Agar parçası temiz bir petri kabı ortasına yerleştirilir. *C. elegans*'ların yığından dışarı çıkmasına ve *E. coli* OP50 ekimi boyunca petrinin karşı tarafına geçmesine izin verilmez.
- ✓ *C. elegans*'lar diğer tarafa ulaştığında alevden geçirilmiş bir neşter ve ya bistüri kullanarak bir parça alınır ve başka bir temiz petriye yerleştirilir.
- ✓ Tüm petriler için bu adımlar tekrarlanır.



Şekil 11. *E. coli* OP50 suşunun mikropipet yardımıyla alınarak *C. elegans* suşlarının bulunduğu petrilere aktarılması.

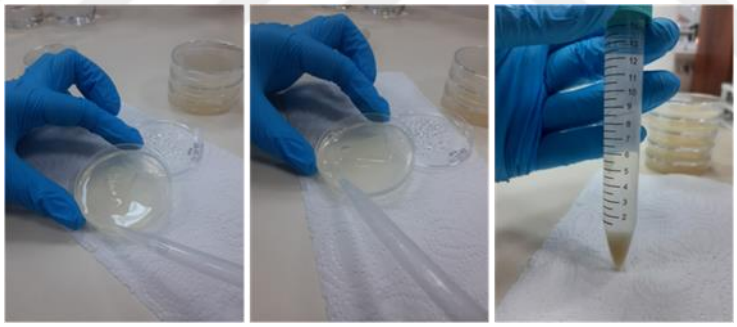
3.3. *C. elegans* Senkronize Kültürlerinin Elde Edilmesi (Senkronizasyon)

Deneyler başlandığında nematodlar gelişimsel olarak aynı safhada olmaları için senkronizasyon işlemi yapılmaktadır. Bu işlem sırasında ergin nematodlar öldürülerek ortamda yumurtalar korunmaktadır (Stiernagle, 2006).

- ✓ Beherlere ethanol ve dH_2O alınır. Pastör pipetleri öncelikle alkolden daha sonra da distileden geçirilerek yıkanır (Şekil 12).

Şekil 12. Pastör pipetlerinin dH_2O ve ethanol yardımıyla yıkanması

- ✓ Pastör pipeti ile NGM petrilerinin yüzeyi 1,5 mL dH_2O ile 3-5 kez yıkanır. Yıkanma sonrası elde edilen sıvı 15 mL'lik falkona alınır (Şekil 13).



Şekil 13. *C. elegans* içeren petri kaplarının yıkanması

- ✓ 1200 rpm ya da 2800 g'de 1 dk santrifüj yapılır (Şekil 14).

Şekil 14. Santrifüj işlemi

✓ Santrifüj sonrası üst faz 1 mL kalana kadar uzaklaştırılır. Pelet üzerine 15 mL oluncaya kadar dH_2O eklenir. İyice çalkalama yapılır. 1200 rpm ya da 2800g'dem 1 dk santrifüj yapılır (Şekil 15).

Şekil 15. Pelet eldesi

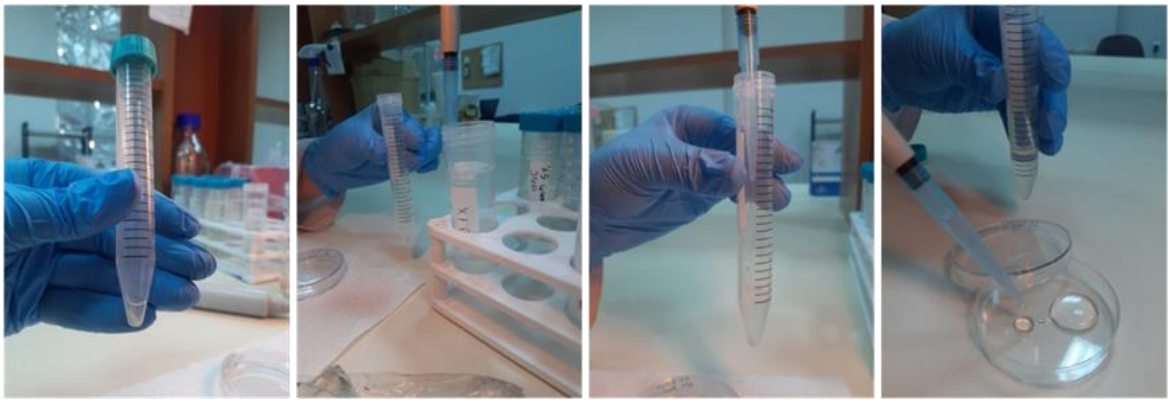
✓ Santrifüj sonrası üst faz 1 mL kalana kadar uzaklaştırılır. Pelet üzerine 500 mL NaOH, 1000 mL %5'lik çamaşır suyu eklendikten sonra 6 dk boyunca çalkalanır, çalkalama sonrası 15 mL'ye tamamlana kadar dH_2O eklenir. 1200 rpm ya da 2800 g'de 1 dk santrifüj yapılır (Şekil 16).

Şekil 16. Yumurtaların eldesi için kullanılan kimyasallar

✓ Santrifüj sonrası üst faz uzaklaştırılır. 15 mL'ye dH_2O ile tamamlanır. Çalkalama yapılır ve 1200 rpm ya da 2800g'de 1 dk santrifüj yapılır (Şekil 17).

Şekil 17. Kimyasallardan arındırma işlemi

✓ Santrifüj sonrası sadece pelet kalıncaya kadar üst faz uzaklaştırılır. Pelet üzerine 5 mL M9(1x) eklenir, yeni bir petri kabına alınır ve +20 °C'ye kaldırılır (Şekil 18).



Şekil 18. M9(1X) tamponuna alınma işlemi

Bir gün sonra M9 (1X)'a alınan yumurtalar 15 mL'lik falkona alınır ve 1200 rpm ya da 2800g'de 1dk santrifüj edilir. Üst faz uzaklaştırılır. Pelet üzerine 5mL S Bazal ve 50 µL *E.coli* OP50 eklenerek pipetaj yapılır ve yeni petri kabına alınır.

3.4. *C. elegans* Suşlarının Dondurulması ve Geri Kazanılması

C. elegans türünün avantajlarından birisi uzun süreli saklama için dondurulabilmesidir (Brenner, 1974) ve daha sonra tekrar kültürlenerek deneylerde kullanılabilmesidir. Çözüldükten sonra sağlıklı nematodlar elde edilemeyeceği için üreme sonrası aşamaları dondurmak mantıklı değildir. Larva aşaması, dondurma için en uygun evredir (Stiernagle, 2006).

3.4.1. *C. elegans* suşlarının dondurulması işlemi

✓ Senkronizasyon sonrası *C. elegans*'lar en az 4 gün aç bırakılır.

✓ 4 gün sonunda bireyler petriden toplanıp 15 mL'lik steril bir falkona alınır.

✓ 1200 rpm 1.5 dk santrifüj yapılır.

✓ Süpernatant atılır.

✓ Peletin üzerine total hacim 4 mL olacak şekilde %30'luk gliserol (1200 µL), S buffer (5,85 g NaCl, 129 mL 0.05 M K_2HPO_4,871 mL 0.05 M KH_2PO_4) (2800 µL) eklenir.

✓ Pipetaj yapılır.

✓ 1 mL'lik steril kriyoviyal tüplere dağıtılır.

✓ -80 °C'de muhafaza edilir.

- ✓ Ertesi gün dondurulan tüplerden bir tanesi çıkarılıp çözdürülerek kontrol edilir.

3.4.2. *C. elegans* suşlarının dondurma işleminden geri kazanılması

- ✓ -80 °C'den çıkarılan kriyoviyal tüpler oda sıcaklığında eriyene kadar inkübe edilir.
- ✓ Pipetaj yapılır.
- ✓ Önceden hazırlanmış NGM agarlı petrilere alınır.
- ✓ 50 µL *E.coli* OP50 verilir.
- ✓ +20 °C' de 1 saat inkübe edilir.
- ✓ İnkübe edildikten sonra diseksiyon mikroskop altında birey canlılığı kontrol edilir.

3.5. *C. elegans*'ın Sıvı Büyüme Ortamının Hazırlanması ve Pasajlanması

C. elegans solucanları katı-sıvı ortamından 5 mL dH_20 ile yıkanarak 15 mL'lik falkon tüplerine alınır. Alınan solucanlar 1 dk 1200 rpm'de santrifüj yapılarak pelet elde edilir. Süpernatant atılır, pelet üzerine 4 mL S medium eklenir. Daha sonra S medium ortamındaki bireyler 1 mL 4 ayrı petriye aktarılır. Herbir petriye 4 mL S medium, 50 µL *E. coli* eklenir.

Kültürün bir damlası mikroskop altında kontrol edilerek kültürler izlenmelidir. Yaşamlarını devam ettirebilmeleri için 2 gün arayla 50 µL *E.coli* OP50 petrilere besin olarak verilir. S medium'da süspanse edilmiş konsantre *E. coli* OP50 eklenmelidir. Her damlada çok sayıda yetişkin solucan olduğunda kültür pasajlanmaya hazırdır. L4 aşamasına gelen bireyler pasajlama için uygun evrededir.

Her 4 günde bir elde edilen solucanlar 15 mL'lik bir falkon içerisine alınarak yukarıda belirtilen işlemler tekrarlanır.

3.6. İlaçların Hazırlanması ve Uygulanması

Kurulacak olan deney düzeneğinde 24 well plate (gereksiz ilaç ve malzeme sarfiyatını en aza indirgemek için) içerisinde (ISOLAB, Ref.12211006) sıvı kültür ortamıyla beraber *C. elegans*'lara etki etmek üzere eklenen ilaçların tablosu Tablo 7'da verilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan ilaçlar için gerekli bilgiler

İlaç adı	Formülleri	Marka	Cat no	Molekül ağırlığı (mA)
Rapamysin	$C_{51}H_{79}NO_{13}$	BIOSYNTH	53123-88-9	914,17 g/mol
Everolimus	$C_{53}H_{83}NO_{14}$	BIOSYNTH	159351-69-6	958,224 g/mol
Temsirolimus	$C_{56}H_{87}NO_{16}$	BIOSYNTH	162635-04-3	1030,29 g/mol

3.6.1. Stok konsantrasyonunun, ara stok konsantrasyonunun ve seyreltme konsantrasyonlarının hazırlanışı

Rapamisin 1,8 mg tartılır ve 2 mL %100'lük DMSO içerisinde çözdürülerek 10^{-3} M ana stok elde edilir. Her bir strip PCR tüpüne 50µL dağıtılır ve -20 °C'de muhafaza edilir. Lifespan ve fertilizasyon deneyleri 24 well plate'in içerisine her bir kuyucuğuna 1 mL S medium eklenir. S medium eklenmesi sonucunda değişen konsantrasyonun korunması için ilaç final konsantrasyonu (10nM) 100x derişik hazırlanarak 10^{-6} M ara stok elde edilir. İlaç konsantrasyonlarına (0,01nM, 0,1nM, 1nM, 5nM, 10nM) göre %0,5'lık DMSO ile diğer seyreltmeler yapılır. Kuyucuklara 10µL dağıtılmak için hazır hale getirilir (Tablo 8). Kontrol grupları ile ilaç gruplarının aynı koşullarda olabilmesi için kontrol gruplarına sadece %0,5 DMSO içeren çözücü eklenir.

Temsirolimus 2mg tartılır ve 2mL %100'lük DMSO içerisinde çözdürülerek 10^{-3} M ana stok elde edilir. Her bir strip PCR tüpüne 50µL olacak şekilde dağıtılır ve -20 °C'de muhafaza edilir. Lifespan ve fertilizasyon deneyleri 24 well plate'in her bir kuyucuğuna 1 mL S medium eklenir. S medium eklenmesi sonucunda değişen konsantrasyonun korunması için ilaç final konsantrasyonu (10nM) 100x derişik hazırlanarak 10^{-6} M ara stok elde edilir. İlaç konsantrasyonlarına (0,01nM, 0,1nM, 1nM, 5nM, 10nM) göre %0,5'lık DMSO ile diğer seyreltmeler yapılır. Kuyucuklara 10µL dağıtılmak için hazır hale getirilir (Tablo 8). Kontrol grupları ile ilaç gruplarının aynı koşullarda olabilmesi için kontrol gruplarına sadece %0,5 DMSO içeren çözücü eklenir.

Everolimus 0,01 mg tartılır ve 1mL %100'lük DMSO içerisinde çözdürülerek 10^{-3} M ana stok elde edilir. Her bir strip PCR tüpüne 50µL olacak şekilde dağıtılır ve -20 °C'de muhafaza edilir. Lifespan ve fertilizasyon deneyleri 24 well plate'in her bir kuyucuğuna 1 mL S medium eklenir. S medium eklenmesi sonucunda değişen konsantrasyonun korunması için ilaç final konsantrasyonu (10nM) 100x derişik hazırlanarak 10^{-6} M ara stok elde edilir. İlaç konsantrasyonlarına (0.01nM, 0.1nM, 1nM, 5nM, 10nM) göre

%0,5'lık DMSO ile diğer seyreltmeler yapılır. Kuyucuklara 10µL dağıtılmak için hazır hale getirilir (Tablo 8). Kontrol grupları ile ilaç gruplarının aynı koşullarda olabilmesi için kontrol gruplarına sadece %0,5 DMSO içeren çözücü eklenir.

İlaç seyreltmelerinde DMSO (%0,5) konsantrasyonu, *C. elegans*'ın hayatta kalması veya fizyolojik oranları üzerinde çok az veya hiç değiştirici etki göstermeden uygulandığını gösteren çalışma referans olarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir (AlOkda & Van Raamsdonk, 2022).

Tablo 8. mTOR inhibitörlerinin final ilaç konsantrasyonları ve *C. elegans* suşlarına verilmek üzere hazırlanışı

	Rapamysin, Everolimus,Temsirolimus-final konsantrasyonları	1mL S medium içinde final konsantarsyonları elde etmek için eklenen mitarlar (Serial dilution)	Eklenen DMSO (%0,5) miktarı
1	10nM	10µL (Stoktan alınır)	90µL
2	5nM	50µL (1. Seyreltmeden alınır)	50µL
3	1nM	20µL (2. Seyreltmeden alınır)	80µL
4	0,1nM	10µL (3. Seyreltmeden alınır)	90µL
5	0,01nM	10µL (4. Seyreltmeden alınır)	90µL

3.7. Ömür Uzunluğu (Lifespan) Deneyleri

- ✓ *C. elegans'*lar L4 aşamasındayken 24 well plate içerisine alınır.
- ✓ Her birkuyucuğa 1 mL S medium eklenir.
- ✓ Her kuyucuğa 12 birey eklenir.
- ✓ 3 µL *E. coli OP50* eklenir.
- ✓ *C. elegans*'ların üremesini engellemek için her kuyucuğa 5 µL fudr (5-Floro-2'-deoksiüridin) eklenir.
- ✓ Deneye bağlı artan konsantrasyonlarda rapamysin, temsirolimus veya everolimus (0,01 nmol/L, 0,1 nmol/L, 1 nmol/L, 5 nmol/L ve 10 nmol/L), kontrol gubuna sadece DMSO (%0,5) eklenir.
- ✓ *C. elegans*'lar, yaşam süresi analizi için 20 °C'de kültürlenir.
- ✓ Ortam ve ilaçlar her 7 günde bir değiştirilir (ReFresh).
- ✓ Her gün bireyler mikroskop altında sayılır.

- ✓ Hafifçe uyarıldığında hareket etmeyen bireyler ölü olarak değerlendirilir.
- ✓ *C. elegans*'lar boyut analizleri için, Zeiss Dijital Mikroskop Kameralı Zeiss Ters Işık Mikroskobu Sistemi kullanılarak 1, 7 ve 14 günlük fotomikrogaflar elde edilir
- ✓ Boyut analizi, ImageJ yazılımı kullanılarak belirlenir.
- ✓ Veriler GaphPad Prism kullanılarak analiz edilir
- ✓ Deneyler iki kez tekrarlanır ve her deney iki tekrarlı halde yapılır.

3.8. *C. elegans* Yumurtlama (Fertilizasyon) Deneyleri

- ✓ *C. elegans'*lar L4 aşamasındayken 24 well plate içerisine alınır.
- ✓ Her bir kuyucuğa 1 mL S medium eklenir.
- ✓ Her bir kuyucuğa 3 birey eklenir.
- ✓ 3µL *E. coli OP50* eklenir.
- ✓ Deneye bağlı artan konsantrasyonlarda sirolimus, temsirolimus veya everolimus (0,01 nmol/L, 0,1 nmol/L, 1 nmol/L, 5 nmol/L ve 10 nmol/L), kontrol gubuna sadece DMSO (%0,5) eklenir.
- ✓ 7. gün sonunda her bir kuyucuğa bırakılan yumurta sayısı mikroskop altında sayılır.
- ✓ Deneyler iki kez tekrarlanır ve her deney dört tekrarlı halde gerçekleştirilir.

3.9. RNA İzolasyonu

Toplam RNA, hızlı ve yüksek kalitede ürün eldesi açısından üreticinin talimatlarına göre total RNA izolasyon kiti (HibriGen Biotechnology, Istanbul, Turkey, Total RNA Isolation kit Lot:0621-CC-1420) ile gerçekleştirilmiştir.

Bu kitin içeriği;100 mL Homejenizasyon tamponu (HT tamponu) , RY1 tamponu, RY2 tamponu, 10 mL DEPC, 100 adet RNase/DNase içermeyen fitreli tüp, 100 adet RNase/DNase içermeyen mikrosantrifüj tüplerinden oluşmaktadır.

RNA izolasyonu protokolünün aşamaları sırasıyla aşağıdaki gibidir (Şekil 19):

1. L4 aşamasına gelmiş bireyler 24 well plate'in her bir kuyucuğuna 3000 birey olmak üzere dağıtılır. 1mL S Medium, 5 µL *E. coli*, 5 µL fudR ve 10 µL rapamysin, temsirolimus veya everolimus (10nM) eklenir. 7 gün inkübe edilir.

2. İlaca maruz bırakılan bireyler well'den çekilerek 15mL'lik steril falkonlara aktarılır.

3. 3 mL M9 (1X) tamponu eklenir

4. 15 dk buzda bekletilir.

5. 4800g' de 5 dk santrifüj yapılır (Beckmann Coulter Allegra X-15R).

6. 1 mL kalana kadar süpernatant atılır.

7. 15 mL' ye tamamlanana kadar distile su (DNase / RNase) eklenir.

8. 15 dk buzda bekletilir.

9. 4800g' de 5 dk santrifüj yapılır.

10. Sadece pelet kalıncaya kadar süpernatant atılır.

11. 1 mL HT tamponu eklenir.

12. 10-15 saniye vorteks yapılır.

13. 2 dk buzda bekletilir.

14. Amplitude 9'da 2dk boyunca sonifikasyonla (Bhaskaran et al., 2011) homjenize edilir. Sonifikasyondan sonra homojenat, buz üzerinde 5 dakika inkübe edilir.

15. 10-15 saniye vorteks yapılır.

16. Pipetaj yapılarak sıvının tamamı mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.

17. +4 ºC'de 12000 rpm'de 6 dk santrifüj yapılır.

18. Süpernatant kısmı başka bir mikrosantrifüj tüpüne alınır.

19. Üzerine 200 µL %100'lük kloroform eklenir.

20. 10-15 saniye vorteks yapılır.

21. 10 dk oda sıcaklığında beklenir.

22. 12000 rpm'de 15 dk santrfüj yapılır.

23. Süpernatant alınır ve mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.

24. Alınan süpernatant hacminin yarısı kadar %100'lük soğuk ethanol koyulur.

25. 1 dk vorteks yapılır.

26. Fitreli mikrosantrifüj tüpüne aktarılır (800 µL'den fazla ise hacim 2'ye bölünür. Fitreli mikrosantrifüj tüpü 800 µL hacminde sıvı almaktadır).

27. 12000 rpm' de 1 dk santrifüj yapılır.

28. Santrifüj sonrasında filtrenin altındaki mikrosantrifüj tüpünde kalan sıvı uzaklaştırılıp tekrar filtre tüpe yerleştirilir

29. 500 µL RY1 tamponu eklenir.

30. 1200 rpm'de 1 dk santrifüj yapılır.

31. Santrifüj sonrasında filtrenin altındaki mikrosantrifüj tüpünde kalan sıvı uzaklaştırılıp tekrar filtre tüpe yerleştirilir.

32. Kalan karışım filtreli tüpe tekrar eklenip 26-30. maddeler tekrar edilir.

33. 500 µL RY2 tamponu eklenir.

34. 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.

35. 12000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılır.

36. Santrifüj sonrasında filtrenin altındaki mikrosantrifüj tüpünde kalan sıvı uzaklaştırılıp tekrar filtre tüpe yerleştirilir.

37. 31-34. basamaklar tekrarlanır.

38. Fitreli tüp 12000 rpm'de 3 dk kuruması için santrifüj edilir.

39. Santrifüj sonrasında filtrenin altındaki mikrosantrifüj tüpünde kalan sıvı uzaklaştırılıp tekrar filtre tüpe yerleştirilir.

40. Kolon 1,5 mL'lik yeni mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilir.

41. Direkt olarak membran üzerine 40 µL DEPC ile muamele edilmiş su eklenir (kolon çözdürme suyu).

42. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.

43. RNA'ya eklenen bu su içerisinde toplamak için 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.

44. Santrifüj sonrası tüp içerisinde saf RNA elde edilmiştir.

45. Uzun süreli saklamak için RNA -80ºC'de muhafaza edilir.

Şekil 19. RNA izolasyonu aşamaları ve kullanılan malzemelere genel bakış

3.10. RNA'nın Kantitatif Analizi

RNA konsantrasyonu ve saflığı, bir Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 2000) kullanılarak absorbans spektroskopisi ile belirlenmştir. Ölçüm değerleri Tablo 9'da verilmiştir. Konsantrasyon, 260 nm'de absorbans ile ölçülmüştür. Saflık A260/A280 ve A260/A230 oranları ile belirlenmiştir. Nükleik asitler (DNA ve RNA) 260 nm'de absorbansı ölçülürken, proteinler tipik olarak 280 nm'de absorbansı belirlenmektedir. 2.0'dan büyük bir A260/A280 oranı, numunede çok az protein kontaminasyonu olduğunu gösterir. 1,7'den büyük A260/A230 oranı, çok az kirlilik olduğunu gösterir.

Tablo 9. Nanodrop ölçüm sonuçları

RNA	Senk. No	Suş tipi	Değerler			
			C(ng/µL)	A260	A260/230	A260/280
Rapamisin-10 nM	**Senk 1**	**Wildtype**	56,76	0,919	1,57	2,11
Rapamisin-10 nM	**Senk2**	**Wildtype**	63,19	1,58	1,12	1,87
Temsirolimus-10 nM	**Senk 1**	**Wildtype**	34,3	0,857	1,31	1,97
Temsirolimus-10 nM	**Senk 2**	**Wildtype**	39,49	0,737	1,21	1,95
Everolimus-10 nM	**Senk 1**	**Wildtype**	34,9	0,372	1,44	1,93
Everolimus-10 nM	**Senk 2**	**Wildtype**	39,83	0,996	1,2	1,88
Rapamisin-10 nM	**Senk 1**	**Mutant**	117	2,88	1,81	1,28
Rapamisin-10 nM	**Senk 2**	**Mutant**	100,67	2,267	1,12	2,08
Temsirolimus-10 nM	**Senk 1**	**Mutant**	28,27	0,527	1,24	1,73
Temsirolimus-10 nM	**Senk 2**	**Mutant**	27,16	0,429	1,58	2,51
Everolimus-10 nM	**Senk 1**	**Mutant**	73,56	1,88	1,67	1,04
Everolimus-10 nM	**Senk 2**	**Mutant**	62,12	1,303	1,81	2,23

3.11. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için ticari olarak satın alınan iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit içeriği Tablo 10'da verilmiştir. Kısaca cDNA, RT kokteylinde 500 ng toplam RNA kullanılarak sentezlenmiştir (Tablo 10'da detaylandırıldığı gibi). RT Kokteyli, 5x iScript Reaksiyon Karışımı (Mix), iScript Ters Transkriptaz ve 20 µL nihai hacim dH_2O ile tamamlanacak şekilde oluşturulmuştur. Nihai karışım, gen başına bir ila iki ek reaksiyona karşılık gelen Tablo 11'de gösterilmiştir. Yan tarafında tarih ve numune numarası bulunan PCR tüplerine 20 µL ters transkripsiyon ana karışımı eklenmiştir. Her tüpe 20 uL RNA numunesi eklenmiştir. Nihai karışım, pipetleme yoluyla hafifçe karıştırılmıştır ve Tablo 12' de verilen kit protokulünde verilen yürütme sıcaklık ve zaman ayarlarına bağlı olarak PCR cihazında inkübasyona bırakılmıştır. Nihai cDNA, gerçek zamanlı PCR ile hemen analiz edilmiştir veya daha sonra analiz için +4 °C'de saklanmıştır.

RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qPCR analizinde izlenen yolların görseli Şekil 20'de verilmiştir.

Tablo 10. cDNA kit içeriği

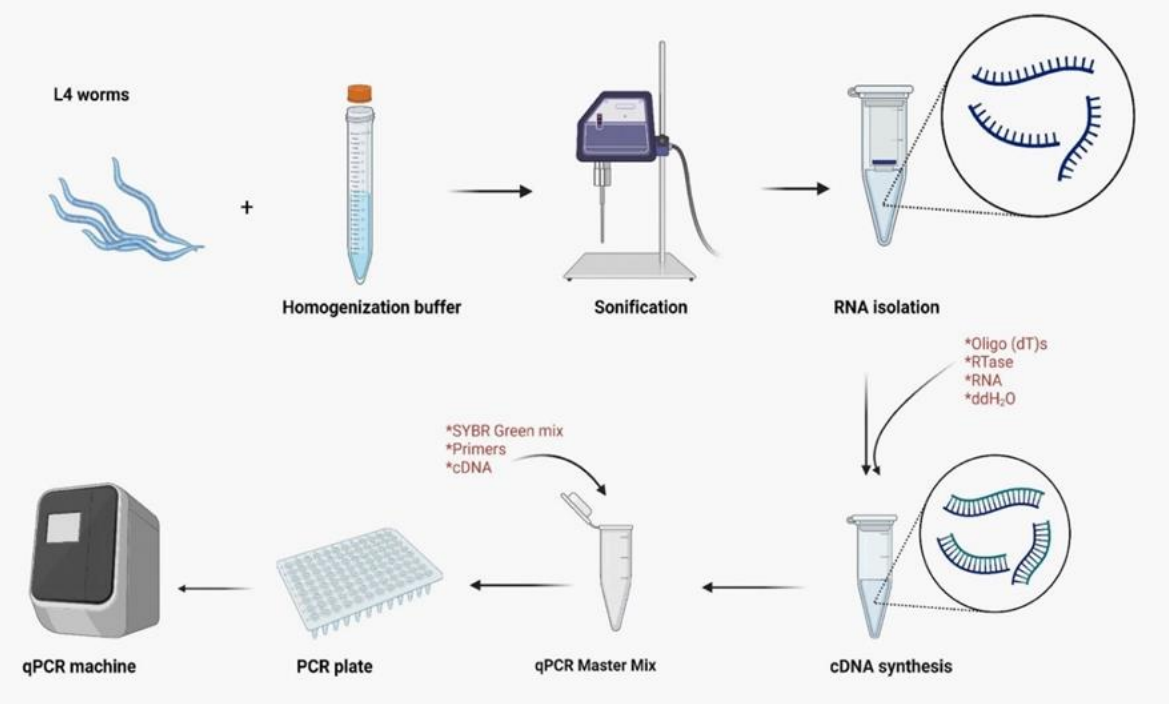
Reaktif	Reaktif 25 Reaksiyonları için Hacim	Reaktif 100 Reaksiyonları için Hacim
5x iScript Reaksiyon Karışımı (Mix)	100 µL	400 µL
iScript Ters Transkriptaz	25 µL	100 µL
Nükleaz içermeyen su	1.5mL	1.5mL

Tablo 11. cDNA izolasyon şablonu

Bileşenler	Reaksiyon başına hacim miktarı (µL)	X sayısındaki reaksiyon için (µL)
5x iScript Reaksiyon Karışımı (Mix)	4	x × 4
iScript Ters Transkriptaz	1	x × 1
Nükleaz içermeyen su	15	x × 15
RNA (500ng total RNA)	20	x × 20
Total Hacim	**40**	x × 40

Tablo 12. cDNA reaksiyon protokolü

Priming	25ºC'de 5 dakika
Ters Transkriptaz	46ºC'de 20 dakika
RT inaktivasyonu	95ºC'de 1 dakika
İsteğe bağlı adım	4ºC'de tutulur



Şekil 20. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve PCR analizine deneysel genel bakış.

3.12. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

mTOR sistemi bileşenlerinin (*rsks-1* ve *let-363*) L4 evre solucanında N2 ve *lin-35*'teki ekspresyonu, RT-qPCR ile değerlendirilmiştir. Kantitatif PCR, üreticinin gerçek zamanlı amplifikasyon talimatlarına göre SYBR yeşil testi ve StepOnePlus™ Gerçek Zamanlı PCR sistemi (Applied Biosystems, ABD) ile gerçekleştirilir. Tahlil, toplam 20 µL reaksiyon hacminde 10 µL µL BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix (Abm, Kanada, ABD) (Tablo13 ve Tablo 14), her primerden 0,5 µL ve 2 µL cDNA şablonu kullanılarak yapılır. Tablo 16 primer bilgilerini göstermektedir. Kit talimatlarına uygun olarak, 1.25 mL MasterMix içersine 11 µL olacak şekilde ROX Referans Boyası eklenmiştir.

Tablo 13. BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix kit içeriği

Cat. No.	Ürün Bileşeni	Miktar	Part No.
G891	BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix	500 rxn (4 x 1.25 mL)	G891-1
	ROX Referans Boyası	50µL	P102

Tablo 14. qPCR için eklenecek olan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Hacim
BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix[1]	10 µL
Forward Primer (10 µM)	0,5 µL
Reverse Primer (10 µM)	0,5 µL
Template cDNA	2 µL
Nuclease-free H_2O	7 µL

[1] Reaksiyon tamponu 1,5 mM Mg^{2+} içerir

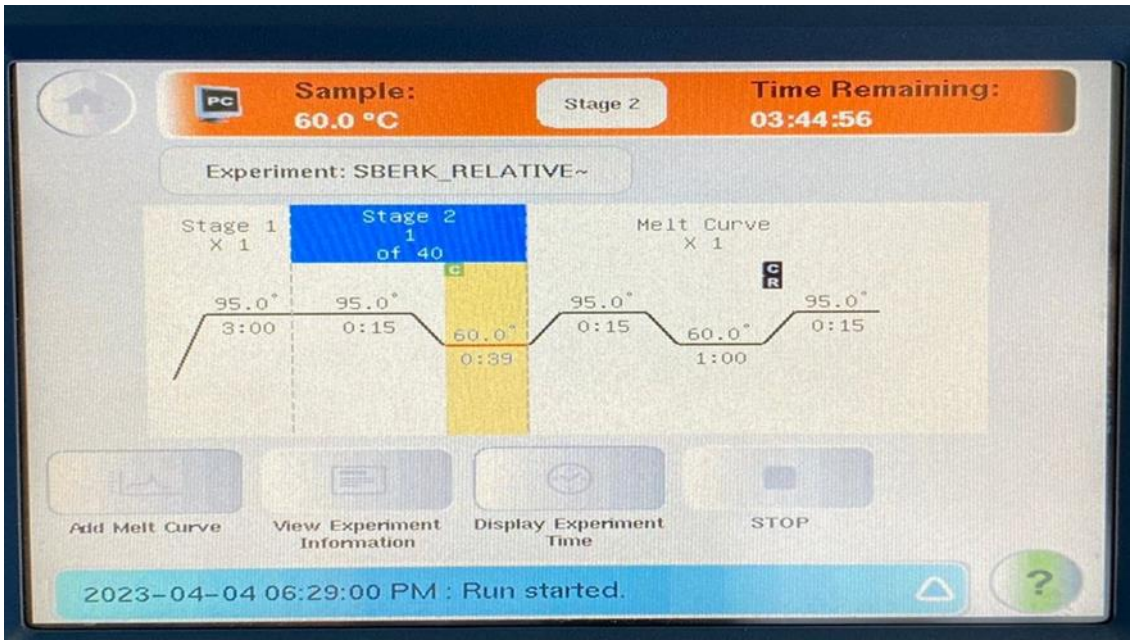
Tüm reaksiyonlar için 96 well plate'ler kullanılır. PCR, üreticinin protokolüne göre gerçek zamanlı cihaz kullanılarak gerçekleştirilir. PCR çalışma sıcaklıkları (run template) Tablo 15'de gösterilmiştir. Tipik olarak, 95°C'de 3 dakikalık ilk denatürasyonun ardından, 95°C'de 10 saniye boyunca 40 döngü denatürasyon, 60 °C'de 30 saniye sıcaklık ile muamele ve 72 °C'de 15 saniye uzama izlenir (Tablo 15). Erime eğrisi analizi için bir ayrışma adımları döngüsü (1 dakika için 58 °C, ardından 10 saniye için 0.5°C, 95°C'ye kadar) eklenir. Tek bir tepenin varlığını doğrulamak ve primer dimerlerin ve spesifik olmayan ürünlerin sentezini dışlamak için her PCR deneyinin sona ermesinde bir erime eğrisi üretilir (Şekil 21, Şekil22). Her gen için iki biyolojik numune alınır ve her numune iki kez ölçülür. Ekibimiz tarafından referans genlerin şuşlar için normalleştirilmesi gerçekleştirilmiştir ve *act-1* ve *cdc-42*, en stabil referans genler olarak seçilmişir. Bu çalışmamızın sonuçlaına dayanarak, a*ct-1* ve *cdc-42*, daha önce açıklanan yöntem kullanılarak mRNA seviyelerini normalleştirmek için kullanılmıştır (Vandesompele et al., 2002). Genlerin bağıl ifadesi, karşılaştırmalı eşik yöntemi $2^{-\Delta Ct}$ kullanılarak hesaplanır. Primerler BMLabosis'ten (Ankara, Türkiye) satın alınmıştır.

Tablo 15. qPCR çalışma koşulları

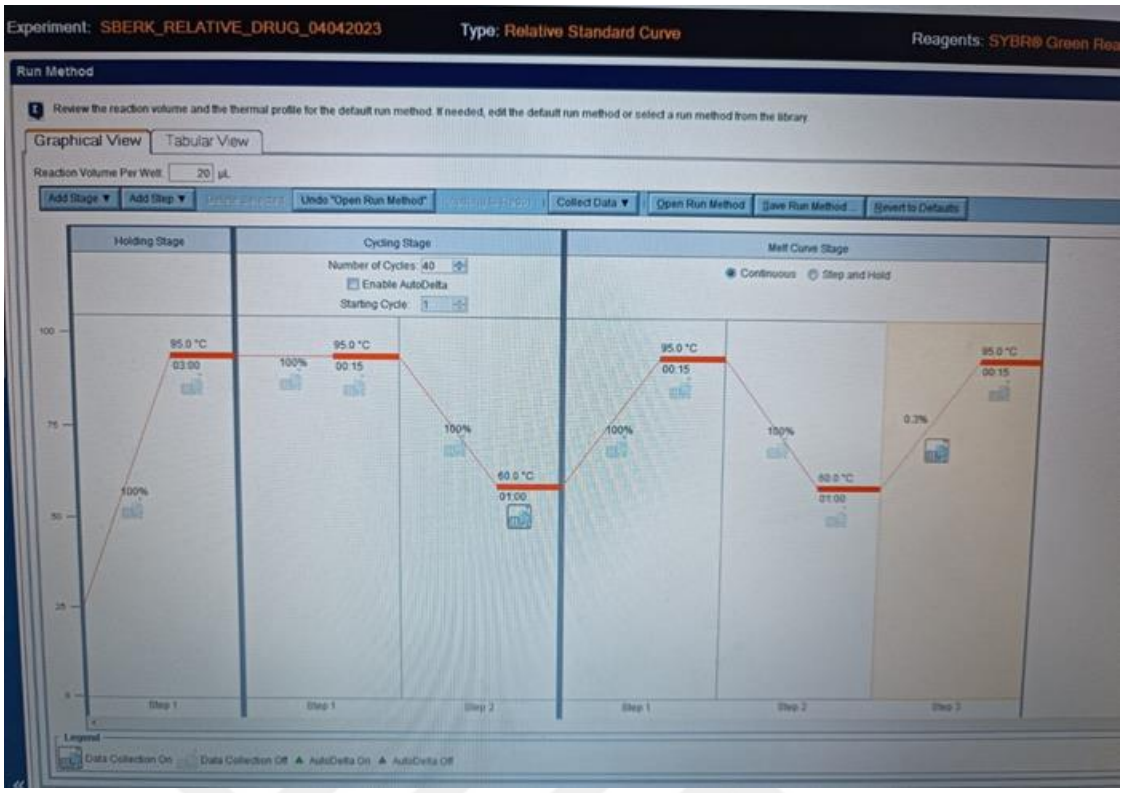
Adım	Sıcaklık	Süre		Döngü
		Standart	Hızlı	
Enzim Aktivasyonu	95ºC	3 dk	3 dk	1
Denatürasyon	95ºC	15 sn	1 sn	40
Uzatma (Annealing)	60ºC	1 dk	10 sn	

Tablo 16. RT-qPCR için primer dizileri ve gen bilgileri

Gen senbolü	Gen tanımı	Dizi ismi	Fonksiyonu	Primer dizi bilgisi	Referans
act-1	Actin-1	T04C12.6	Hücre iskeleti yapısal proteini	F: 5'-CTCTTGCCCCATCAACCATG-3' R: 5'-CTTGCTTGGAGATCCACATC-3'	(Hoogewijs et al., 2008)
cdc-42	*Hücre bölünmesi kontrol proteini 42 homolog*	R07G3.1	RHO GTPase	F: 5'-CTGCTGGACAGGAAGATTACG-3' R: 5'-CTCGGACATTCTCGAATGAAG-3'	(Hoogewijs et al., 2008)
rsks-1	Ribozomal protein S6 kinaz beta	Y47D3A.16	Ribozomal protein S6 kinaz aktivitesi	F: 5′-CCGTTTGTGGGATTCACC-3′ R: 5′-TGGCTTTCTCGGGCTCTT-3′	(Zhuang et al., 2016)
let-363	Rapamisin homologunun hedefi	B0261.2	Protein serin / treonin kinaz aktivitesi	F: 5'-GCCACTCTCTGATTACCCTGT-3' R: 5'-GTGAGCCGCGTGTTTCAAAT-3'	(Chalorak et al., 2020)



Şekil 21. PCR çalışma koşullarının cihazda görüntülenmesi



Şekil 22. PCR çalışma koşullarının cihaza bağlı bilgisayar ortamında görüntülenmesi

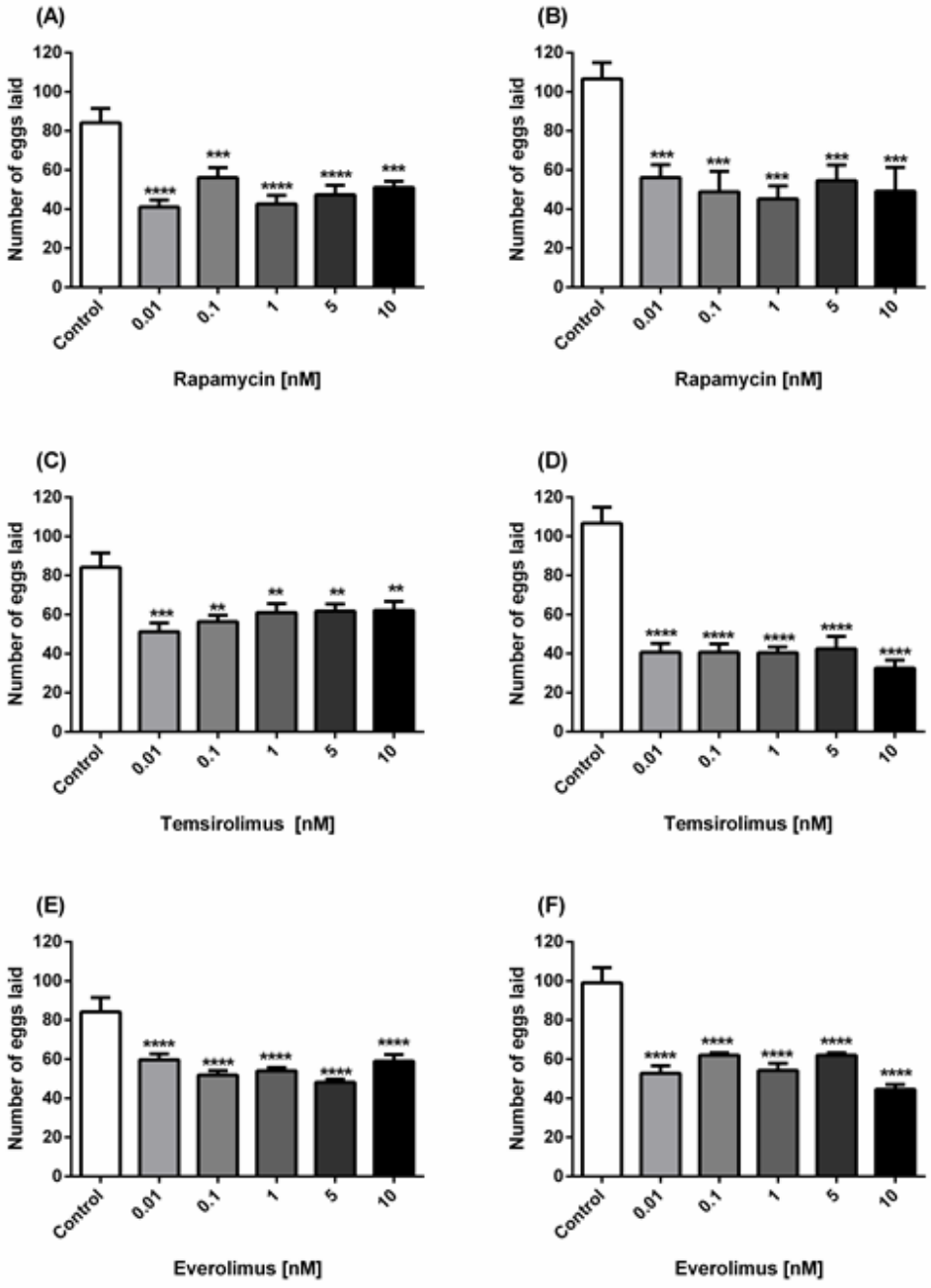
3.13. İstatiksel Analiz

Tüm deneyler en az iki kez tekrarlandı. Tekrarlanan deneylerin sonuçları karşılaştırılabilirdi. Analiz için istatistik yazılımı GraphPad Prisim 6.0 (GraphPad yazılımı, San Diego, CA) kullanıldı. Hayatta kalma için log-rank testleri kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel sonuçları karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Anlamlı farklılıklar keşfedildiğinde, grupları karşılaştırmak için Newman-Keuls testi kullanıldı. Tüm analizlerde $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama SEM olarak gösterilir.

4. BULGULAR

4.1. mTOR İnhibitörlerinin *C. elegans* Fertilizasyonu Üzerindeki Etkileri

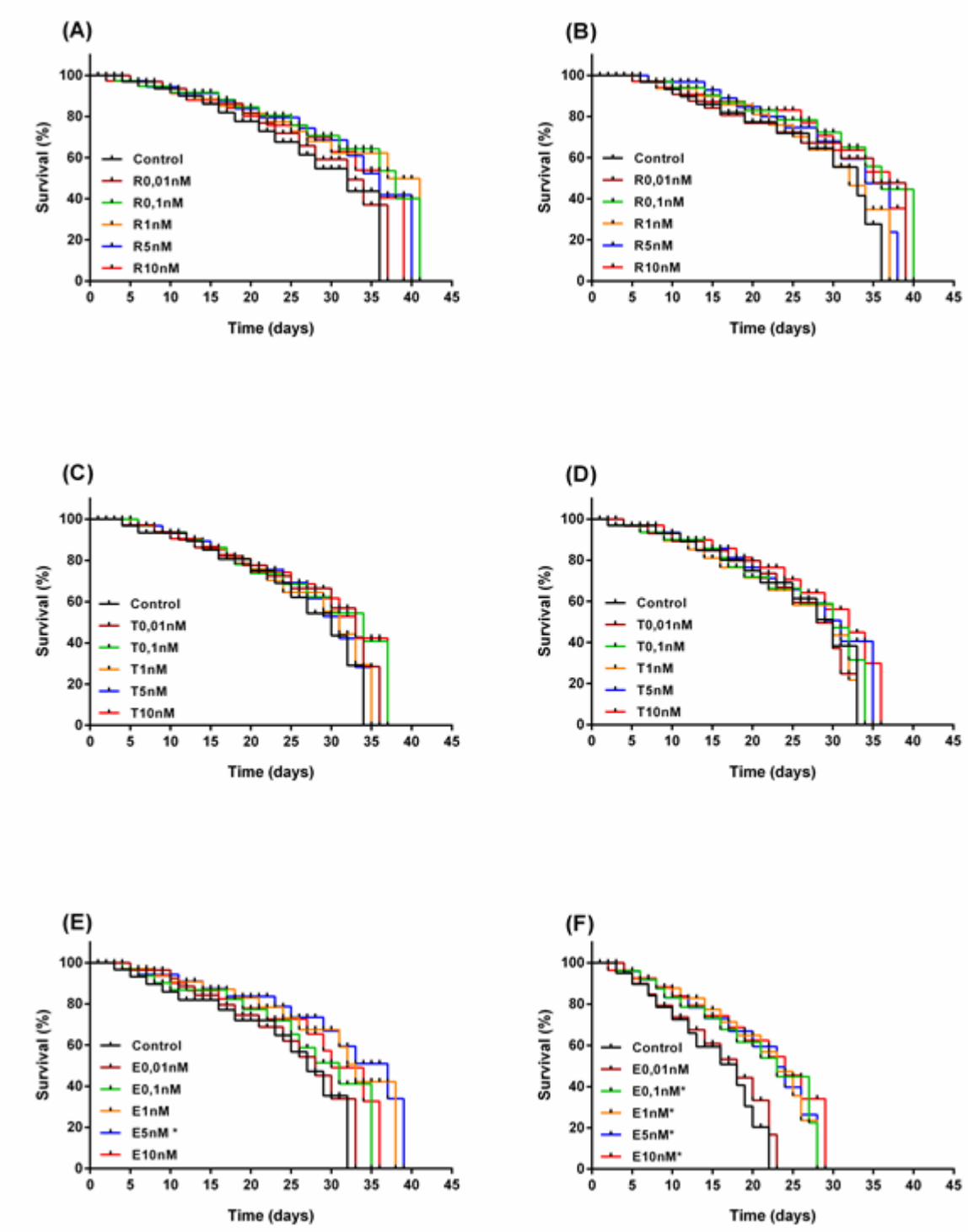
Sonuçlarımız 0,01, 0,1, 1,5 ve 10 nM konsantrasyonlarındaki rapamisin, temsirolomus ve everolimusun *C. elegans* N2 (Şekil 23A, C ve E) ve *lin-35* (Şekil 23B, D ve F) solucanlar üzerinde önemli bir inhibitör etkisi olduğunu göstermiştir (Şekil 23). Yabani tip N2 ve mutant *lin-35* suşlarına uygulanan mTOR inhibitörlerinin tüm konsantrasyonlarında yumurta sayısının kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca rapamisin ve temsirolimusun solucanların yumurta sayısı üzerindeki etkileri N2 ve *lin-35* suşları arasında karşılaştırıldığında, rapamisin ve temsirolimusun *lin-35* suşları üzerinde daha fazla inhibitör etkiye sahip olduğu görülmüştür. Temsirolimus ve everolimusun uygulanan en yüksek konsantrasyonunda (10nM) en düşük yumurta sayısı *lin-35* suşunda elde edildi (Şekil 23D, F). N2 ve *lin-35* solucanlarının kontrol grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, *lin-35* bireylerinin sayısı N2 bireylerinden daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca rapamisin, temsirolomus ve everolimus'a maruz bırakılan *C. elegans*'ın her iki suşu da yumurtlama davranışının başlamasında gecikmeye neden olmuştur. L4 solucanlarının fertile yetişkinliğe ulaşması normalde 4-5 gün sürerken, bu inhibitörlerin varlığında 8-10 gün sürmüştür.



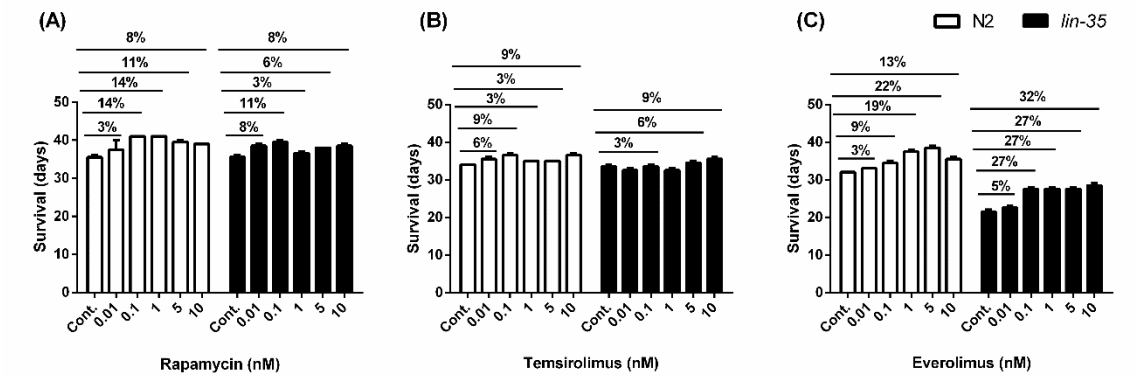
Şekil 23. mTOR inhibitörlerinin (rapamisin, temsirolimus, everolimus) N2 (A, C ve E) ve *lin-35* (B, D ve F) suşlarında yumurtlama üzerindeki etkisi. Deneyler senkronize popülasyonlar üzerinde gerçekleştirilmiştir. Solucanların, mTOR inhibitörlerine maruz kalmalarının gelişim aşamasına göre 10 günde (L4 bireylerinin doğurgan yetişkinliğe ulaştığı yöntem) gösterildiği deney için yumurtadan genç yetişkinliğe kadar gelişimleri boyunca değerlendirilmiştir. Yumurta aşaması sırasında, yabanıl tip ve mutant tip *C. elegans*'ın senkronize popülasyonları, mTOR inhibitörleri (0,01-10 nM) içeren sıvı ortamda 24 well playt içerisine aktarılmıştır. mTOR inhibitörlerine maruz kalan *C. elegans*'ta yumurtlama davranışının ve kontrol sonuçlarının (%0.5 DMSO taşıyıcısına maruz kalan solucanlar) karşılaştırmıştır. Her solucanın bıraktığı yumurta sayısı 7 gün boyunca her gün sayılmıştır. Değerler, dört kopya halinde iki bağımsız deneyin ortalama ± SEM'ini temsil eder. *p < 0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001; n=1

4.2. *C. elegans*'ın Ömür Uzunluğuna Etkileri İçin mTOR İnhibitörlerinin Taranması

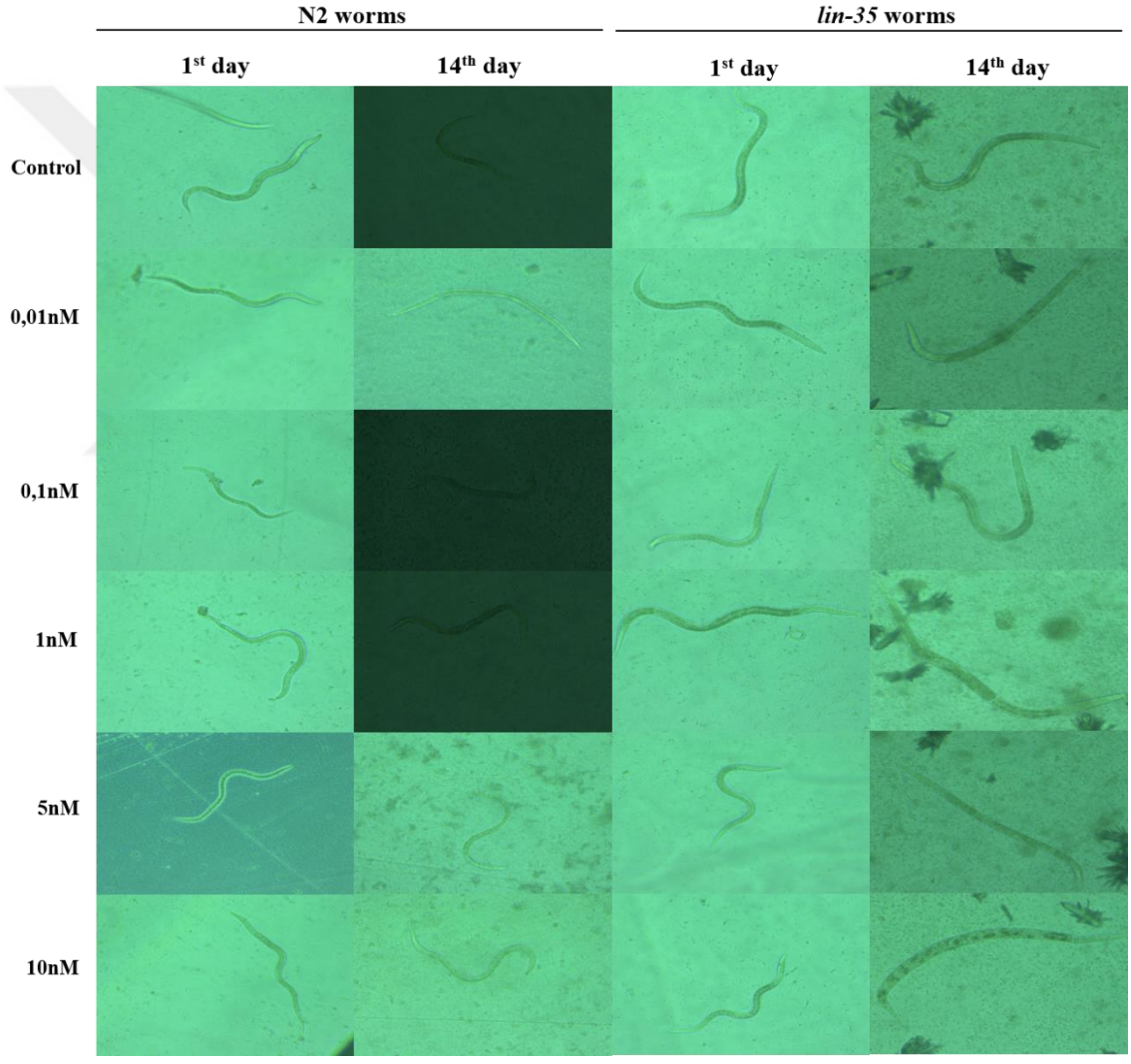
Rapamisin, temsirolimus ve everolimus'un *C. elegans* ömrü üzerindeki etkilerini doğrulanmıştır. 0,01, 0,1, 1, 5 ve 10 nM'de rapamisin, N2 solucanlarının ortalama ömrünü %3, %14, %14, %11 ve %8 artırken (Şekil 24A ve Şekil 25A), *lin-35*'te sırasıyla %8, %11, %3, %6 ve %8 oranında solucanların ömrünü artırmıştır (Şekil 24B; Şekil 25A). 0,01, 0,1, 1, 5 ve 10 nM'deki Temsirolimus ayrıca N2 suşunda yaşam süresini sırasıyla %6, %9, %3, %3 ve %9 artırmıştır (Şekil 24C ve Şekil 25B). Öte yandan, *lin-35* suşunda 0,1, 5 ve 10 nM'de temsirolimus ömrü sırasıyla %3, %6 ve %9 artırmıştır (Şekil 24D ve Şekil 25B). 0.01, 0.1, 1.5 ve 10 nM'deki Everolimus, N2 suşunda sağkalımı %3, %9, %19, %22 ve %13 artırmıştır (Şekil 24E ve Şekil 25C). 0.01, 0.1 ve 10 nM'deki everolimus ise *lin-35* solucanlarının ömrünü sırasıyla %5, %27 ve %32 artırmıştır (Şekil 24F ve Şekil 25C). Beklenildiği gibi, bu farmakolojik olarak benzer ilaçların yaşam süresi üzerindeki maksimum etkileri aditif değildi (Şekil 24 ve Şekil 25). Rapamisin, temsirolimus veya everolimus varlığında yabanıl tip N2 ve mutant *lin-35* solucanlarının 1. ve 14. Gün mikrofotografları Şekil 26, 27 ve 28'de verilmiştir.



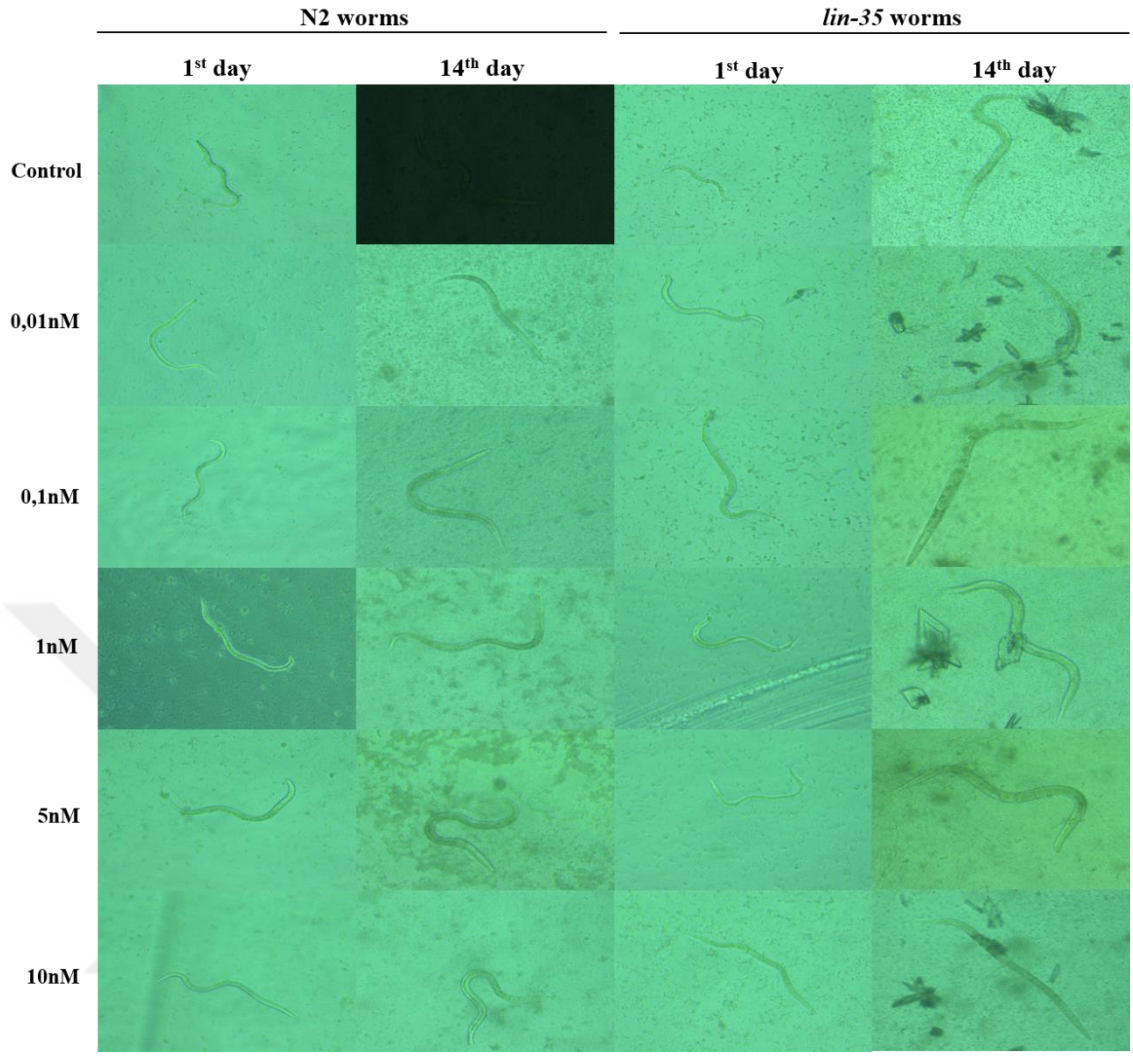
Şekil 24. Yabanıl tip N2 (A, C ve E) ve mutant *lin-35* (B, D ve F) solucanlarının mTOR inhibitörlerinin varlığında ömür uzunluğu eğrileri. Etiketler, ilacın adını ve ardından kullanılan ilacın konsantrasyonunu gösterir. Değerler, iki bağımsız deneyden elde edilen iki ölçümün ortalama ±SEM'ni temsil eder. *p < 0.05.



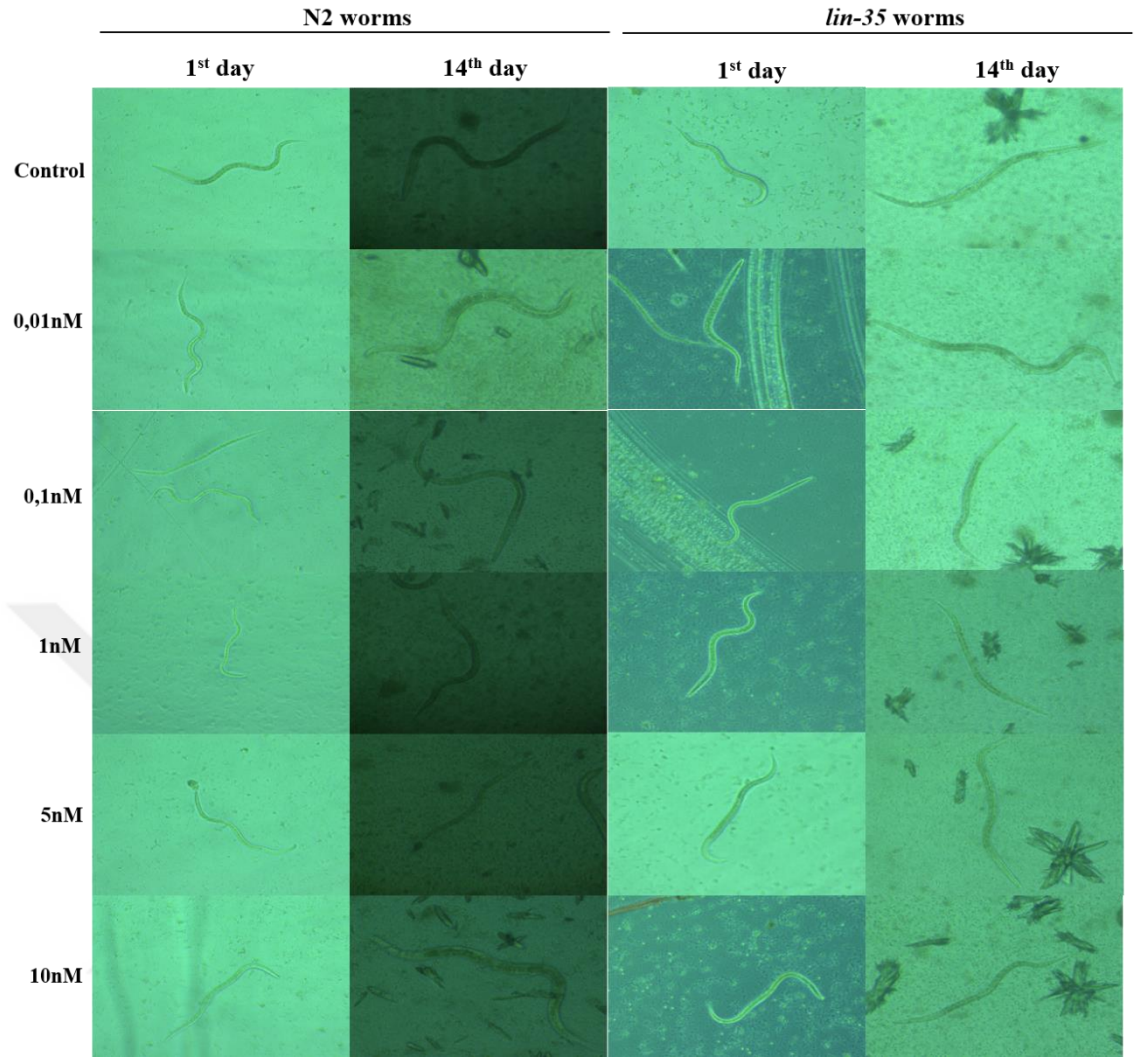
Şekil 25. mTOR inhibitörlerinin rapamisin (A), temsirolimus (B) ve everolimus'un (C) *C. elegans* ömrü üzerindeki etkileri.



Şekil 26. Farklı konsantrasyonlarda rapamisin (0,01-10nM) içeren S-mediumda yetiştirilen yabanıl tip N2 ve mutant *lin-35* solucanlarının 1. ve 14. gün fotomikrografları. Görüntüler, bir invert mikroskop kullanılarak 200X büyütmede elde edilmiştir.



Şekil 27. Farklı konsantrasyonlarda temsirolimus (0,01-10nM) içeren S-mediumda yetiştirilen yabanıl tip N2 ve mutant *lin-35* solucanlarının 1. ve 14. gün fotomikrografları. Görüntüler, bir invert mikroskop kullanılarak 200X büyütmede elde edilmiştir.

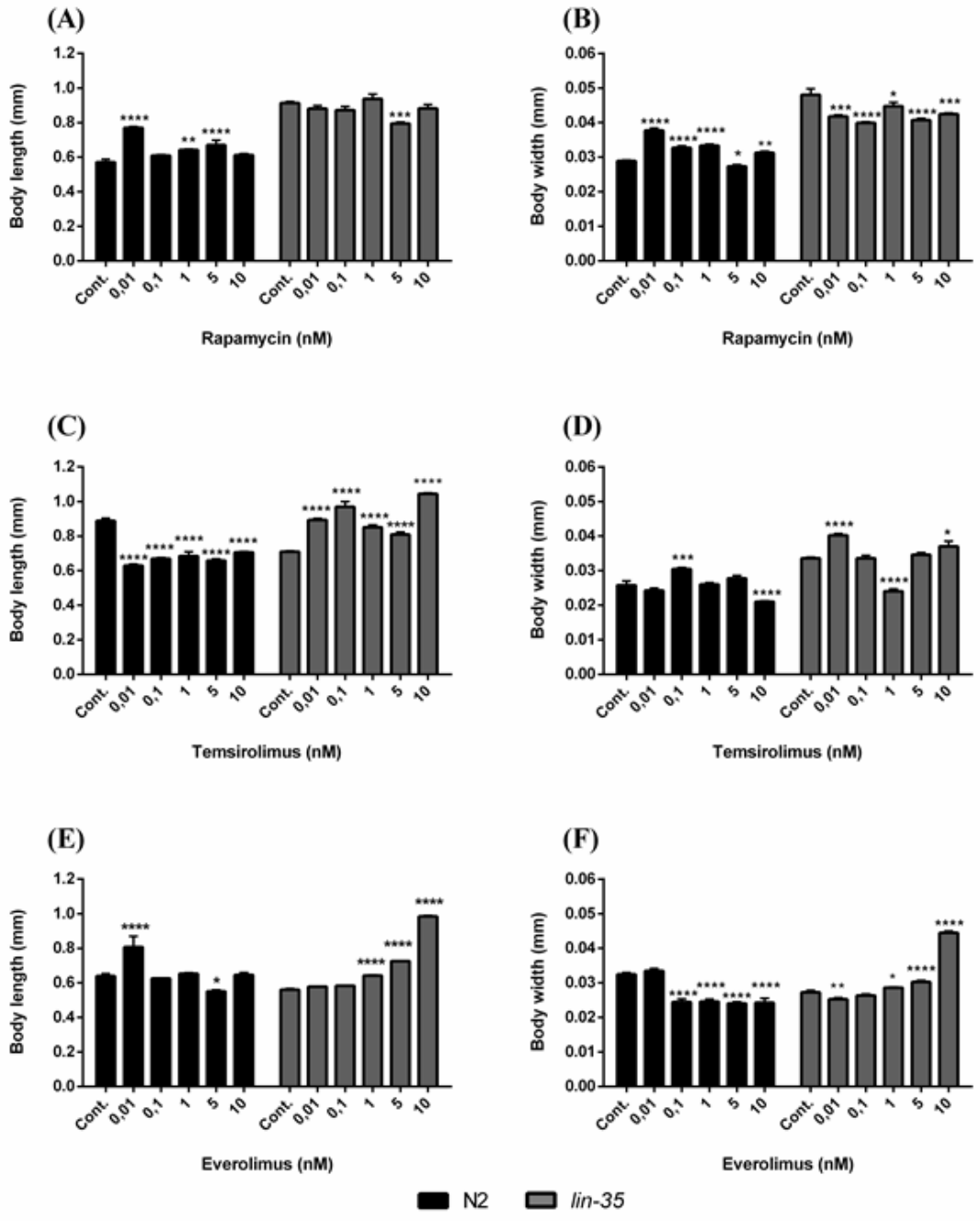


Şekil 28. Farklı konsantrasyonlarda everolimus (0,01-10nM) içeren S-mediumda yetiştirilen yabanıl tip N2 ve mutant *lin-35* solucanlarının 1. ve 14. gün fotomikrografları. Görüntüler, bir invert mikroskop kullanılarak 200X büyütmede elde edilmiştir.

4.3. Boyut Analizi

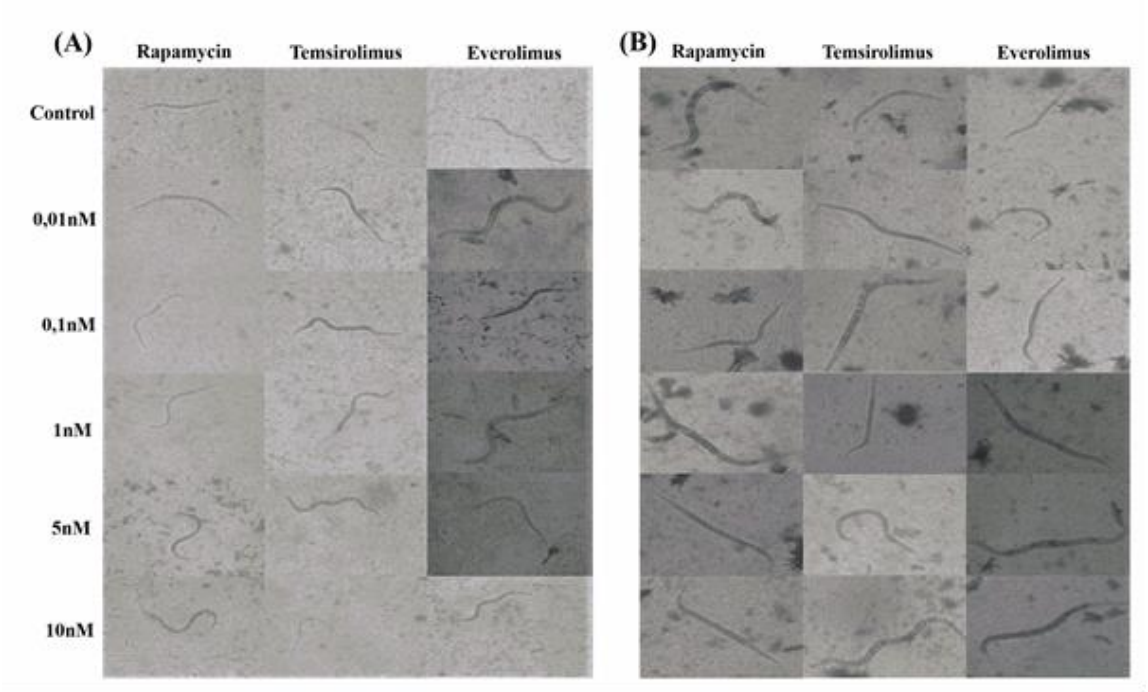
0,01, 0,1, 1, 5 ve 10 nM'de mTOR inhibitörleri olan rapamisin, temsirolimus ve everolimus'un 14 gün sonra *C. elegans*'ın vücut boyutuna etkisini araştırmak için mutant *lin-35* ve yabanıl tip N2 suşlarının vücut boyutları ölçülmüştür (Şekil 29). Bu ölçümler 0,01, 0,1, 1, 5 ve 10 nM'de mTOR inhibitörleri olan rapamisin, temsirolimus ve everolimus varlığında yetiştirilen yabanıl tip N2 ve mutant *lin-35* solucanlarının 14. gün görüntüleri Şekil 30' da verilmiştir. Yabani tip N2 solucanların vücut uzunluklarının, kontrole kıyasla 0.01, 1 ve 5 nM konsantrasyonlarda rapamisin uygulamasından sonra daha uzun olduğu gözlemlenmiştir. Tüm konsantrasyonlarda temsirolimus tedavisinin bir sonucu olarak solucanların boyları önemli ölçüde kısalmıştır. Öte yandan, everolimus tedavisi sırasında sadece 5nM konsantrasyonda kısalma gözlenmiştir. 5nM rapamisine

maruz bırakılan *lin-35* suşunda kısalma gözlenirken, temsirolimus veya everolimus tedavisinden sonra boyda bir artış gözlenmiştir. Yabani tip N2 suşunun vücut genişliği, 5 nM rapamisin, 10 nM temsirolimus ve 0,1, 1,5 ve 10 nM everolimus ile tedaviden sonra azalmıştır. Tüm rapamisin konsantrasyonlarında *lin-35* suşunda bir genişlik azalması gözlenirken, temsirolimus veya everolimusa maruz kalan solucanlarda sırasıyla 1 ve 0,01 nM'lik azalmalar gözlenmiştir.



Şekil 29. Farklı konsantrasyonlarda rapamisin, temsirolimus veya everolimus içeren S-medyumda yetiştirilen yabanıl tip N2 ve mutant *lin-35* solucanlarının boyut analizi. **A, C ve E:** kontrol ile karşılaştırıldığında (suda %0.5 v/v DMSO) rapamisin, temsirolimus ve

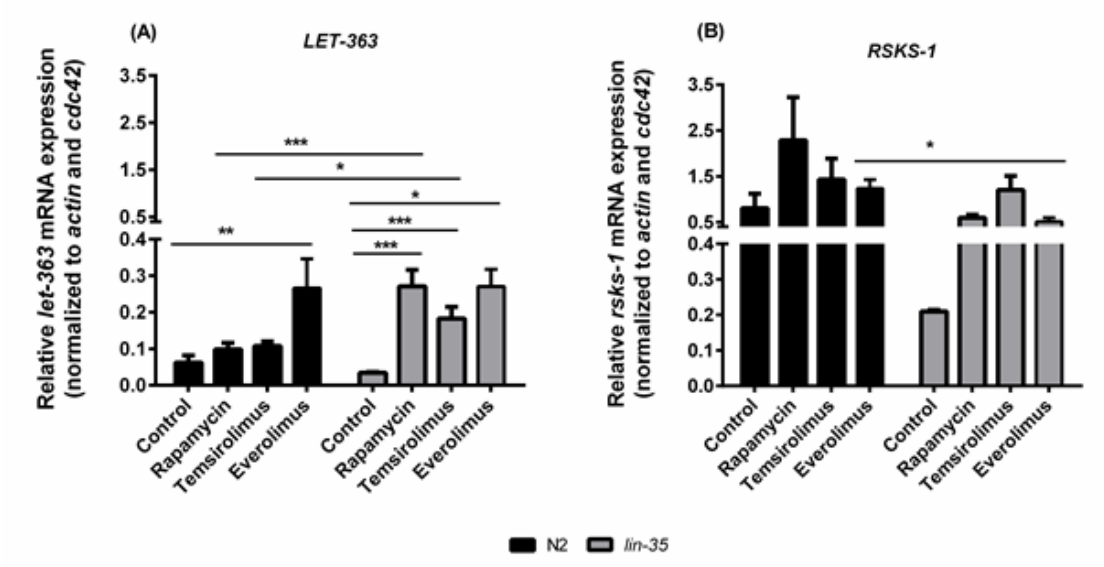
everolimus varlığında N2 ve *lin-35* solucanlarının vücut uzunlukları **B, D ve F:** kontrol ile karşılaştırıldığında (suda %0.5 v/v DMSO) rapamisin, temsirolimus ve everolimus varlığında N2 ve *lin-35* solucanlarının vücut genişlikleri. ImageJ yazılımı kullanılarak 14 gün sonra N2 ve *lin-35* solucanlarından elde edilen gövde uzunluğu ve genişlik boyutu mm cinsindendir. Değerler, iki bağımsız deneyin ortalama ± SEM'sini temsil etmektedir. ****p<0,0001, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05.



Şekil 30. Farklı konsantrasyonlarda rapamisin, temsirolimus veya everolimus içeren S-ortamında yetiştirilen yabanıl tip N2 (A) ve mutant *lin-35* (B) solucanlarının temsili fotomikrografları (t=14 gün).

4.4. *C. elegans*'ta mTOR Sinyal Yolağı Bileşenlerinin mRNA İfadesi

10 nM rapamisin, temsirolimus veya everolimus içeren S medyum ortamında kültürlenmiş N2 ve *lin-35*'te, *Let-363*/*TOR*'un mRNA ifadesi (Şekil 31A), *rsks-1*/*S6K*'nın mRNA ifadesi (Şekil 31B) kantitatif RT-PCR ile ölçülmüştür. Kontrol ile karşılaştırıldığında, rapamisin, temsirolimus veya everolimus ile kültürlenen *lin-35* suşunda *let-363* mRNA ekspresyonu önemli ölçüde artarken, N2 suşunda yalnızca everolimus ile kültürlenen solucanlarda önemli bir artış oldu. Ayrıca temsirolimus veya rapamisine maruz bırakılan *lin-35* suşunda *let-363* mRNA ekspresyonu, N2 suşuna kıyasla artmıştır. Bu üç inhibitörün varlığında, hem N2 hem de *lin-35* suşlarında kontrol grupları ile karşılaştırıldığında *rsks-1* mRNA ifadesinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Rapamisin veya temsirolimus ile kültürlenen N2 ve *lin-35* suşları arasında *rsks-1* mRNA ifadelerinde anlamlı bir fark bulunmazken, sadece everolimus ile kültürlenen *lin-35* suşlarında N2 suşlarına göre azalma gözlenmiştir (Şekil 31).



Şekil 31. N2 ve *lin-35* solucanlarında *let-363* ve *Rsks-1* mRNA ifadesi. *Let-363*/*TOR* ve *rsks-1*/*S6K* ekspresyonu, house keeping genler *cdc-42* ve *act-1* seviyelerine göre ölçülmüştür. Değerler, iki bağımsız deneyden elde edilen iki ölçümün ortalama ±SEM'sini temsil eder. *p < 0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

5. TARTIŞMA

En iyi onaylanmış yaşlanma karşıtı müdahaleler, iki ana besin algılama yolu, insülin/Igf sinyalleme (IIS) ve rapamisin hedefi (TOR) yolları ile ilişkilendirilmiştir. Bu sinyal yollarının herhangi birindeki büyük değişiklikler, diyabet, kanser ve embriyonik ölüm gibi ciddi olumsuz etkilere neden olurken, daha hafif aşağı regülasyon birçok organizmada sağlık ve uzun ömür için faydalı olabilir (Piper et al., 2008). Bununla birlikte, yaşlanma karşıtı IIS veya TOR manipülasyonlarının kullanılması, diyabet ve kanser gibi yaşlanmayla ilişkili birçok hastalığın ilerlemesini geciktirebilecek önemli bir sonuca sahiptir (Bishop & Guarente, 2007; Piper et al., 2008). Sonuç olarak, TOR yolunun yaşlanmaya dahil olduğunu anlamak, yaşa bağlı bozukluklar için tedaviler tasarlamak için yararlı bilgiler sağlayabilir.

Rapamisin, mevcut TOR kinazın en spesifik ve en iyi çalışılmış inhibitörüdür (Hartford & Ratain, 2007). Ayrıca rapamisin analogları (örn. temsirolimus ve everolimus), İnsanlarda kullanımı onaylanan bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçlar, şu anda antikanser ajanlar olarak kullanım için klinik deneme aşamasındadır (Guertin & Sabatini, 2009). Şu anda, rapamisin, temsirolimus ve everolimus gibi mTORC1 aktivitesini inhibe eden bileşiklerin, tek başına veya diğer bileşiklerle kombinasyon halinde çeşitli malignite türleri üzerindeki etkileri üzerine birçok klinik çalışma bulunmaktadır (Angelousi et al., 2018; Konings et al., 2009; Liu et al., 2009; LoPiccolo et al., 2008; Wan & Helman, 2007). Bu çalışmanın amacı, farmasötik bir müdahalenin *C. elegans*'ta TOR sinyalini inhibe etmeye yönelik yaşlanma karşıtı potansiyelini araştırmak ve altta yatan mekanizmaları saptamaktır. Bildiğimiz kadarıyla, *C. elegans*'ta TOR sinyalini azaltmak için farmakolojik bir müdahalenin, özellikle rapamisin analoglarının (temsirolimus ve everolimus) yaşlanma karşıtı etkilerini gösteren ve ardından mTOR yolu bileşenlerinin ifadesini değerlendiren daha önce yapılmış hiçbir çalışma yoktur. Bu amaçla rapamisin ve rapamisin analoglarının N2 ve *lin-35* suşlarında yumurtlama, yaşam süresi ve boyut analizine etkilerini *in vivo* olarak araştırılmıştır. Bu suşlarda mTOR sistem bileşenlerinin diferansiyel ifadesini de değerlendirilmiştir.

C. elegans, kanserle ilgili birçok insan geni ve sinyal yolu için önemli bir koruma sergiler. Tümör baskılayıcı gen *Rb* (retinoblastoma) gen ürünü, birçok hücresel ve gelişimsel sürecin düzenlenmesinde yer almıştır, hücre döngüsü ilerlemesinin kontrolünde iyi tanımlanmış bir katılımı içerir ve neredeyse tüm insan malignitelerinde doğrudan veya

dolaylı olarak risk altında olduğu tahmin edilmektedir (Fay et al., 2003). *C. elegans* retinoblastoma protein homologu, *lin-35* aynı zamanda hücre döngüsü girişinin ana düzenleyicisidir ve sentetik multivulval genlerle ilgili çalışmaların kanıtladığı gibi vulval hücre kaderini belirlemede önemli bir rol oynar (Bender et al., 2007; Fay et al., 2003; Lu & Horvitz, 1998). *lin-35*'in EGF ailesi üyesi lin3-3'ün ekspresyonunu inhibe ettiğinin keşfi, parakrin büyüme faktörü sinyal baskılamasının, *Rb* familyası üyelerinin hücre gelişimini azalttığı ve dolayısıyla kanseri önlemek için çalıştığı bir mekanizma olabileceğini gösterdi (Cui et al., 2006). Bu nedenle, *lin-35* fonksiyonlarının analizinin, Rb ailesi tarafından tümör baskılanmasının yeni mekanizmaları hakkında değerli bilgiler sağlayabileceği öne sürülmüştür (Bender et al., 2007). Bu nedenle mutant *lin-35* solucanlarında rapamisin ve analoglarının (temsirolimus ve everolimus) antiaging etkilerini yabanıl tip N2 solucanları ile karşılaştırarak ortaya koymak ve ayrıca yabanıl tip N2 solucanları ile mTOR yolu bileşenlerinin ifadesindeki karşılaştırmalı farklılıkları ortaya çıkarmak amaçlanmıştır. Yabanıl tip N2 ve mutant *lin-35* solucanlarına uygulanan tüm mTOR inhibitör konsantrasyonlarında, yumurtlama kapasitelerinin kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığını bulunmuştur. Ayrıca 10nM temsirolimus veya everolimus ile tedavi edilen *lin-35* solucanlarında en düşük yumurta sayısını gözlemledik. Uzun ömür analizi sonuçlarına göre, hem yabanıl tip N2 hem de mutant *lin-35* solucanları, bu üç mTOR inhibitörünün tüm konsantrasyonlarının mevcudiyetinde ömürlerini uzattı. Yaşam süresini en çok uzatan inhibitör olarak everolimus belirlenmiştir. Robida-Stubbs ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma sonucunda kültürlenmiş hücrelerde kullanılandan daha yüksek bir konsantrasyon olan 100µM rapamisine maruz kalmanın solucanların ömrünü uzattığı bulunmuşdur (Robida-Stubbs et al., 2012). Bulgularımız, kültürlenmiş hücrelerde uygulanan konsantrasyonlarda solucanların ömrünün uzadığını göstermektedir. Literatürde ilaç denemelerinde genel olarak NGM agar tercih edilmiştir. Bu nedenle, ilacın agar ortamındaki biyoyararlanımının yüksek etkinliği her zaman şüphe uyandırır. Bu nedenle, Kokel ve diğerleri tarafından önerildiği gibi, *C. elegans*'ta biyoyararlanım için yüksek konsantrasyonlarda bileşikler önerilmiştir (Kokel et al., 2006). Laboratuvar ekibimiz, ilaçların solucanlar tarafından biyoyararlanımını artırmak için sıvı bir kültür ortamında büyüyen solucanları optimize etmiştir. Mevcut çalışmamızda, solucanlar optimize edilmiş bir sıvı kültür ortamında kültürlenmiştir, kültür ortamı ve ilaçlar düzenli aralıklarla yenilenmiştir.

Önceki çalışmaların bulguları, mevcut çalışmamızın bulgularını doğrulamaktadır. Schinaman ve ark. tarafından yapılan çalışmada Drosophila sineklerine 10ug/mL rapamisin uygulanmış ve sineklerin yaşam sürelerinin uzadığı sonucu elde edilmiştir (Schinaman et al., 2019). Bjedov ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada *Drosophila* sineklerine 1, 50, 200 veya 400 mM konsantrasyonları uygulanmış ve en yüksek üç konsantrasyonda sineklerin ömrünün uzadığı gözlemlenmiştir (Bjedov et al., 2010). Ek olarak, mayada rapamisin tedavisinin daha önce kronolojik (Powers et al., 2006) ve replikatif (Medvedik et al., 2007) sağkalımı uzattığı gösterilmiştir. Fareler üzerinde yapılan bir araştırma, rapamisinin geç dönemde verildiğinde farelerde de yaşam süresini uzattığını göstermiştir (Harrison et al., 2009). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, farelere yaşamlarının ilk 45 günü boyunca rapamisin tedavisi uygulanmıştır. Farelerin tüm yaşamları boyunca kontrol grubuna göre daha yavaş büyüdüğü ve daha küçük kaldığını gözlemlenmiştir. Ayrıca farelere benzer şekilde, gelişim sırasında rapamisine maruz kalmanın Daphnia magna'nın ömrünü önemli ölçüde uzattığını ve vücut boyutunu azalttığını gözlemişlerdir (Shindyapina et al., 2022). Bu veriler, rapamisin tedavisinin *C. elegans*'ta yaşam süresini de uzattığına dair gözlemimizle birlikte, rapamisinin antiaging etkilerinin evrimsel olarak korunduğunu düşündürmektedir. Ek olarak, giderek artan sayıda kanıt, düşük doğurganlık ve uzun ömürlülüğün birbirinden ayrılabileceğini göstermektedir (Grandison et al., 2009; Partridge et al., 2005). Bulgularımıza göre mTOR inhibitörleri verildiğinde her iki suşda da yumurta üretimi azalmış ve yaşam süresi uzamıştır. Solucanların boyut analizi sonuçlarına göre, rapamisin, temsirolimus veya everolimusa maruz kalan yabanıl tip N2 suşunda uzunluk ve genişlikte azalmalar gözlemlenmiştir. Mutant bireylerde rapamisin uygulandığında kısalma gözlenirken, her üç inhibitörün varlığında genişlikte azalma gözlemlenmiştir.

TOR, ribozomal proteinler, *S6K* veya *elF* genlerinin aşağı regülasyonu da *C. elegans'*ta fertiliteyi azaltır ve mutantlarda daha düşük TOR sinyali ömrü uzunluğunu azaltır (Hansen et al., 2007). TOR inhibisyonu, rapamisin ve diyet kısıtlaması, mRNA translasyonunu azaltarak ömrü uzatıyor gibi görünmektedir (Bjedov et al., 2010; Kapahi et al., 2010; Kenyon et al., 1993; Stanfel et al., 2009; Zid et al., 2009). Daha düşük bir translasyon seviyesi, protein sentezinin yükünü hafiflettiği için avantajlı olabilir, ancak mevcut araştırmalar, translasyon azaldığında, koruyucu mekanizmaların devreye girerek bazı genlerin translasyonunu sürdürdüğünü ve hatta artırdığını gösteriyor (Kapahi et al.,

2010; Stanfel et al., 2009; Zid et al., 2009). *C. elegans'*ta, translasyon başlatmanın genetik manipülasyonu yaşam süresini uzatır ve bazı araştırmalar, korunmuş transkripsiyon faktörlerinin *DAF-16*/*FoxO* (Hansen et al., 2007; Henderson et al., 2006; Rogers et al., 2011; Tohyama et al., 2008; Wang et al., 2010) ve *SKN-1/Nrf*'nin (Wang et al., 2010) bu etki için gerekli olduğunu öne sürer. Bu, azalmış protein sentezinin avantajlarının potansiyel olarak transkripsiyonel düzenlemeyi içerebileceği anlamına gelir. Daf-16 ve Skn-1, farklı türleri daha uzun süre hayatta tutan ve onları çevresel, metabolik ve proteotoksik stresten koruyan genleri kontrol eder (Kenyon et al., 1993; Kwon et al., 2010; Li et al., 2011; Oliveira et al., 2009; Sykiotis & Bohmann, 2010; Tullet et al., 2008). *C. elegans*'ta bunların her biri, metazoa boyunca yaşlanmayı etkileyen büyümeyle ilgili başka bir sinyal yolu olan insülin/IGF-1 benzeri sinyalleme (IIS) tarafından baskılanabilir (Kenyon et al., 1993; Tullet et al., 2008).

Sonuçlarımızda, her üç inhibitöre de maruz kalan mutant solucanlarda, kontrol gruplarına kıyasla *Let-363*/*TOR* mRNA ekspresyonunda bir artış gözlenmiştir. Temsirolimus veya rapamisine maruz kalan N2 suşuna kıyasla *lin-35* suşunda da bir artış olmuştur. Öte yandan, her üç inhibitöre de maruz bırakılan yabani ve mutant solucanlarda *Rsks-1*/*S6K* mRNA ekspresyonunda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olmadığı, sadece everolimusa maruz kalan *lin-35* suşunda N2 suşuna göre azalma gözlenmiştir. Everolimus ile tedavi edilen mutant bireylerin yabanıl tip solucanlara göre daha uzun süre hayatta kalması, *Rsks-1*/*S6K* mRNA ekspresyonundaki azalmaya bağlı olabilir. Genel olarak, kontrol gruplarına kıyasla yabanıl tip ve mutant solucanlarda tüm genlerin artan ekspresyonunu gözlemlenmiştir. Bu da bize bu solucanlarda inhibitör uygulandığında koruyucu mekanizmaların devreye girdiğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, mTOR sinyal yolu bileşenlerinin gerçek protein seviyelerini değil, yalnızca mRNA'sı ölçülmüştür. mRNA seviyeleri mutlak protein seviyelerini yansıtmadığından, bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu nedenle gelecekte moleküler ve biyokimyasal deneylerle bu koruyucu mekanizmaların aydınlatılması faydalı olacaktır. İnhibitörlerinin daha yüksek doz uygulanmasından sonra ömür uzunluğu ve döllenme ile yakından ilişkili olan insülin/IGF-1 benzeri sinyal (IIS) bileşenlerinin protein ekspresyon seviyelerinin incelenmesi de yararlı olacaktır.

6. SONUÇ

Sonuç olarak, uygulanan mTOR inhibitörünün tüm konsantrasyonlarda fertilizasyon kapasitesini azalttığı gösterilmiştir. En yüksek dozlarda temsirolimus ve everolimusa maruz kalan mutant solucanlar yabanıl tip solucanlara göre daha düşük yumurtlama kapasitesine sahipti. Ayrıca tüm inhibitörlerin varlığında her iki suşun da solucanlarında yumurtlama süresini uzattığını gözlemlenmiştir. Rapamisin, temsirolimus ve everolimus inhibitörlerine maruz kalan N2 ve *lin-35* solucanlarının ömrü uzunluğu artmıştır ve everolimus ile tedavi edilen mutant solucanların ömrü uzunluğu, yabanıl tip solucanlara göre daha uzun olduğu gözlemlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonların varlığında *Rsks-1/S6K* ve *let-363*/*TOR* ifadelerinde artış olmuştur. Ek çalışmalar, özellikle kanserle ilgili geni taşıyan *lin-35* mutant suşunda daha yüksek doz inhibitör uygulamasıyla protein ekspresyon seviyelerini ortaya çıkarmak, rapamisin ve analoglarının hastalık modeli sistemlerindeki etkilerini araştırmak için yaşa bağlı çok çeşitli durumlar için potansiyel ortak tedavileri ortaya çıkarabilir.

7. KAYNAKÇA

Albert, P. S., & Riddle, D. L. (1988). Mutants of Caenorhabditis elegans that form dauer-like larvae. *Dev Biol*, *126*(2), 270-293. https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90138-8

AlOkda, A., & Van Raamsdonk, J. M. (2022). Effect of DMSO on lifespan and physiology in C. elegans : Implications for use of DMSO as a solvent for compound delivery. *MicroPubl Biol*, *2022*. https://doi.org/10.17912/micropub.biology.000634

Ambros, V. (2000). Control of developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Curr Opin Genet Dev*, *10*(4), 428-433. https://doi.org/10.1016/s0959-437x(00)00108-8

Amiri, A., Keiper, B. D., Kawasaki, I., Fan, Y., Kohara, Y., Rhoads, R. E., & Strome, S. (2001). An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in C. elegans. *Development*, *128*(20), 3899-3912. https://doi.org/10.1242/dev.128.20.3899

Angelousi, A., Kyriakopoulos, G., Nasiri-Ansari, N., Karageorgou, M., & Kassi, E. (2018). The role of epithelial growth factors and insulin growth factors in the adrenal neoplasms. *Ann Transl Med*, *6*(12), 253. https://doi.org/10.21037/atm.2018.05.52

Arsham, A. M., Howell, J. J., & Simon, M. C. (2003). A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(32), 29655-29660. https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)84230-6/pdf

Avery, L. (1993). The genetics of feeding in Caenorhabditis elegans. *Genetics*, *133*(4), 897-917. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1205408/pdf/ge1334897.pdf

Avery, L., & Horvitz, H. R. (1989). Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of C. elegans. *Neuron*, *3*(4), 473-485. https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90206-7

Bargmann, C. I., & Horvitz, H. R. J. S. (1991). Control of larval development by chemosensory neurons in Caenorhabditis elegans. *251*(4998), 1243-1246.

Barrière, A., & Félix, M. (2014). Isolation of C. elegans and related nematodes (July 17, 2006), WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook. 1.115. 1. In.

Bender, A. M., Kirienko, N. V., Olson, S. K., Esko, J. D., & Fay, D. S. (2007). lin-35/Rb and the CoREST ortholog spr-1 coordinately regulate vulval morphogenesis and gonad development in C. elegans. *Dev Biol*, *302*(2), 448-462. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.051

Bhaskaran, S., Butler, J. A., Becerra, S., Fassio, V., Girotti, M., & Rea, S. L. (2011). Breaking Caenorhabditis elegans the easy way using the Balch homogenizer: An old tool for a new application. *Analytical Biochemistry*, *413*(2), 123-132. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.02.029

Bishop, N. A., & Guarente, L. (2007). Genetic links between diet and lifespan: shared mechanisms from yeast to humans. *Nat Rev Genet*, *8*(11), 835-844. https://doi.org/10.1038/nrg2188

Bjedov, I., Toivonen, J. M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A., & Partridge, L. (2010). Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly Drosophila melanogaster. *Cell Metab*, *11*(1), 35-46. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.11.010

Blackwell, T. K., Sewell, A. K., Wu, Z., & Han, M. (2019). TOR Signaling in Caenorhabditis elegans Development, Metabolism, and Aging. *Genetics*, *213*(2), 329-360. https://doi.org/10.1534/genetics.119.302504

Boulin, T., Etchberger, J. F., & Hobert, O. J. W. T. O. R. o. C. e. B. (2006). Reporter gene fusions.

Brenner, S. (1974). The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics*, *77*(1), 71-94. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1213120/pdf/71.pdf

Bucher, E. A., & Seydoux, G. (1994). Gastrulation in the nematode Caenorhabditis elegans. Seminars in Developmental Biology,

Byerly, L., Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode Caenorhabditis elegans. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev Biol*, *51*(1), 23-33. https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90119-6

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, *263*(5148), 802-805. https://doi.org/10.1126/science.8303295

Chalorak, P., Dharmasaroja, P., & Meemon, K. (2020). Downregulation of eEF1A/EFT3-4 Enhances Dopaminergic Neurodegeneration After 6-OHDA Exposure in C. elegans Model. *Front Neurosci*, *14*, 303. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00303

Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent Window into Biology: A Primer on Caenorhabditis elegans. *Genetics*, *200*(2), 387-407. https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099

Cui, M., Chen, J., Myers, T. R., Hwang, B. J., Sternberg, P. W., Greenwald, I., & Han, M. (2006). SynMuv genes redundantly inhibit lin-3/EGF expression to prevent inappropriate vulval induction in C. elegans. *Dev Cell*, *10*(5), 667-672. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.001

Cui, M., Cohen, M. L., Teng, C., & Han, M. (2013). The tumor suppressor Rb critically regulates starvation-induced stress response in C. elegans. *Curr Biol*, *23*(11), 975-980. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.046

Driscoll, M. (1995). Chapter 14 Methods for the Study of Cell Death in the Nematode Caenorhabditis elegans. In L. M. Schwartz & B. A. Osborne (Eds.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 46, pp. 323-353). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61934-2

Ehrenstein, G. V. (1980). Cell lineages and development of Caenorhabditis elegans and other nematodes.

Fay, D. S., Large, E., Han, M., & Darland, M. (2003). lin-35/Rb and ubc-18, an E2 ubiquitin-conjugating enzyme, function redundantly to control pharyngeal

morphogenesis in C. elegans. *Development*, *130*(14), 3319-3330. https://doi.org/10.1242/dev.00561

Feinberg, E. H., Vanhoven, M. K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R. D., Shen, K., & Bargmann, C. I. (2008). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) defines cell contacts and synapses in living nervous systems. *Neuron*, *57*(3), 353-363. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.11.030

Forrester, W. C., & Garriga, G. (1997). Genes necessary for C. elegans cell and growth cone migrations. *Development*, *124*(9), 1831-1843. https://doi.org/10.1242/dev.124.9.1831

Goetsch, P. D., Garrigues, J. M., & Strome, S. (2017). Loss of the Caenorhabditis elegans pocket protein LIN-35 reveals MuvB's innate function as the repressor of DREAM target genes. *PLoS Genet*, *13*(11), e1007088. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007088

Golden, J. W., & Riddle, D. L. (1984). The Caenorhabditis elegans dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Dev Biol*, *102*(2), 368-378. https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90201-x

Grandison, R. C., Piper, M. D., & Partridge, L. (2009). Amino-acid imbalance explains extension of lifespan by dietary restriction in Drosophila. *Nature*, *462*(7276), 1061-1064. https://doi.org/10.1038/nature08619

Grishok, A., & Sharp, P. A. (2005). Negative regulation of nuclear divisions in Caenorhabditis elegans by retinoblastoma and RNA interference-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(48), 17360-17365. https://doi.org/10.1073/pnas.0508989102

Guertin, D. A., & Sabatini, D. M. (2009). The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal*, *2*(67), pe24. https://doi.org/10.1126/scisignal.267pe24

Gumienny, T. L., Lambie, E., Hartwieg, E., Horvitz, H. R., & Hengartner, M. O. (1999). Genetic control of programmed cell death in the Caenorhabditis elegans hermaphrodite germline. *Development*, *126*(5), 1011-1022.

Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, *30*(2), 214-226. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003

Hansen, M., Taubert, S., Crawford, D., Libina, N., Lee, S. J., & Kenyon, C. (2007). Lifespan extension by conditions that inhibit translation in Caenorhabditis elegans. *Aging Cell*, *6*(1), 95-110. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00267.x

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., & Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, *110*(2), 177-189. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00833-4

Harrison, D. E., Strong, R., Sharp, Z. D., Nelson, J. F., Astle, C. M., Flurkey, K., Nadon, N. L., Wilkinson, J. E., Frenkel, K., Carter, C. S., Pahor, M., Javors, M. A., Fernandez, E., & Miller, R. A. (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, *460*(7253), 392-395. https://doi.org/10.1038/nature08221

Harrison, M. M., Ceol, C. J., Lu, X., & Horvitz, H. R. (2006). Some C. elegans class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(45), 16782-16787.

Hartford, C. M., & Ratain, M. J. (2007). Rapamycin: something old, something new, sometimes borrowed and now renewed. *Clin Pharmacol Ther*, *82*(4), 381-388. https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100317

Henderson, S. T., Bonafè, M., & Johnson, T. E. (2006). daf-16 protects the nematode Caenorhabditis elegans during food deprivation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *61*(5), 444-460. https://doi.org/10.1093/gerona/61.5.444

Hodgkin, J. (1988). Sexual dimorphism and sex determination. *The nematode Caenorhabditis elegans*, 243-280.

Hoogewijs, D., Houthoofd, K., Matthijssens, F., Vandesompele, J., & Vanfleteren, J. R. (2008). Selection and validation of a set of reliable reference genes for quantitative sod gene expression analysis in C. elegans. *BMC Mol Biol*, *9*, 9. https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-9

Houghton, P. J. (2010). Everolimus. *Clinical Cancer Research*, *16*(5), 1368-1372. https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-09-1314

Howell, A. M., Gilmour, S. G., Mancebo, R. A., & Rose, A. M. (1987). Genetic analysis of a large autosomal region in Caenorhabditis elegans by the use of a free duplication. *Genetical Research*, *49*(3), 207-213. https://doi.org/10.1017/S0016672300027099

Hu, P. J. (2007). Dauer. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1-19. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.144.1

Husson, S. J., Gottschalk, A., & Leifer, A. M. (2013). Optogenetic manipulation of neural activity in C. elegans: from synapse to circuits and behaviour. *Biol Cell*, *105*(6), 235-250. https://doi.org/10.1111/boc.201200069

Jia, K., Chen, D., & Riddle, D. L. (2004). The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate C. elegans larval development, metabolism and life span. *Development*, *131*(16), 3897-3906. https://doi.org/10.1242/dev.01255

Jones, K. T., Greer, E. R., Pearce, D., & Ashrafi, K. (2009). Rictor/TORC2 regulates Caenorhabditis elegans fat storage, body size, and development through sgk-1. *PLoS Biol*, *7*(3), e60. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000060

Kapahi, P., Chen, D., Rogers, A. N., Katewa, S. D., Li, P. W., Thomas, E. L., & Kockel, L. (2010). With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab*, *11*(6), 453-465. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.001

Kennedy, M. W. (2013). Ascaris–Antigens, allergens, immunogenetics, protein structures. In *Ascaris: The Neglected Parasite* (pp. 51-79). Elsevier.

Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., & Tabtiang, R. (1993). A C. elegans mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, *366*(6454), 461-464. https://doi.org/10.1038/366461a0

Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor

to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, *110*(2), 163-175. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00808-5

Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*, *11*(4), 895-904. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00114-x

Kirienko, N. V., Mani, K., & Fay, D. S. (2010). Cancer models in Caenorhabditis elegans. *Dev Dyn*, *239*(5), 1413-1448. https://doi.org/10.1002/dvdy.22247

Kokel, D., Li, Y., Qin, J., & Xue, D. (2006). The nongenotoxic carcinogens naphthalene and para-dichlorobenzene suppress apoptosis in Caenorhabditis elegans. *Nat Chem Biol*, *2*(6), 338-345. https://doi.org/10.1038/nchembio791

Konings, I. R., Verweij, J., Wiemer, E. A., & Sleijfer, S. (2009). The applicability of mTOR inhibition in solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets*, *9*(3), 439-450. https://doi.org/10.2174/156800909788166556

Korenjak, M., Taylor-Harding, B., Binné, U. K., Satterlee, J. S., Stevaux, O., Aasland, R., White-Cooper, H., Dyson, N., & Brehm, A. (2004). Native E2F/RBF complexes contain Myb-interacting proteins and repress transcription of developmentally controlled E2F target genes. *Cell*, *119*(2), 181-193.

Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. R., & Hall, M. N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*, *73*(3), 585-596. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90144-f

Kwon, E. S., Narasimhan, S. D., Yen, K., & Tissenbaum, H. A. (2010). A new DAF-16 isoform regulates longevity. *Nature*, *466*(7305), 498-502. https://doi.org/10.1038/nature09184

Larance, M., Pourkarimi, E., Wang, B., Brenes Murillo, A., Kent, R., Lamond, A. I., & Gartner, A. (2015). Global Proteomics Analysis of the Response to Starvation in C. elegans. *Mol Cell Proteomics*, *14*(7), 1989-2001. https://doi.org/10.1074/mcp.M114.044289

Li, W., DeBella, L. R., Guven-Ozkan, T., Lin, R., & Rose, L. S. (2009). An eIF4E-binding protein regulates katanin protein levels in C. elegans embryos. *The Journal of cell biology*, *187*(1), 33-42. https://doi.org/10.1083/jcb.200903003

Li, X., Matilainen, O., Jin, C., Glover-Cutter, K. M., Holmberg, C. I., & Blackwell, T. K. (2011). Specific SKN-1/Nrf stress responses to perturbations in translation elongation and proteasome activity. *PLoS Genet*, *7*(6), e1002119. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002119

Litovchick, L., Sadasivam, S., Florens, L., Zhu, X., Swanson, S. K., Velmurugan, S., Chen, R., Washburn, M. P., Liu, X. S., & DeCaprio, J. A. (2007). Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Mol Cell*, *26*(4), 539-551. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.015

Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M., & Zhao, J. J. (2009). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, *8*(8), 627-644. https://doi.org/10.1038/nrd2926

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., & Hall, M. N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, *10*(3), 457-468. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00636-6

Long, X., Spycher, C., Han, Z. S., Rose, A. M., Müller, F., & Avruch, J. (2002). TOR deficiency in C. elegans causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. *Curr Biol*, *12*(17), 1448-1461. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01091-6

LoPiccolo, J., Blumenthal, G. M., Bernstein, W. B., & Dennis, P. A. (2008). Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*, *11*(1-2), 32-50. https://doi.org/10.1016/j.drup.2007.11.003

Lu, X., & Horvitz, H. R. (1998). lin-35 and lin-53, two genes that antagonize a C. elegans Ras pathway, encode proteins similar to Rb and its binding protein RbAp48. *Cell*, *95*(7), 981-991. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81722-5

Ma, X., & Blenis, J. (2009). Ma XM, Blenis J.. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. Nat Rev Mol Cell Biol 10: 307-318. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *10*, 307-318. https://doi.org/10.1038/nrm2672

Medvedik, O., Lamming, D. W., Kim, K. D., & Sinclair, D. A. (2007). MSN2 and MSN4 link calorie restriction and TOR to sirtuin-mediated lifespan extension in Saccharomyces cerevisiae. *PLoS Biol*, *5*(10), e261. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050261

Menon, S., & Manning, B. D. (2013). Cell signalling: nutrient sensing lost in cancer. *Nature*, *498*(7455), 444-445. https://doi.org/10.1038/498444a

Menzies, F. M., Huebener, J., Renna, M., Bonin, M., Riess, O., & Rubinsztein, D. C. (2009). Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain*, *133*(1), 93-104. https://doi.org/10.1093/brain/awp292

Nelson, M. D., & Raizen, D. M. (2013). A sleep state during C. elegans development. *Current opinion in neurobiology*, *23*(5), 824-830. https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.02.015

Oliveira, R. P., Porter Abate, J., Dilks, K., Landis, J., Ashraf, J., Murphy, C. T., & Blackwell, T. K. (2009). Condition-adapted stress and longevity gene regulation by Caenorhabditis elegans SKN-1/Nrf. *Aging Cell*, *8*(5), 524-541. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00501.x

Partridge, L., Gems, D., & Withers, D. J. (2005). Sex and death: what is the connection? *Cell*, *120*(4), 461-472. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.026

Pemberton, T. J., & Kay, J. E. (2005). Identification and Comparative Analysis of the Peptidyl-Prolyl cis/trans Isomerase Repertoires of H. sapiens, D. melanogaster, C. elegans, S. cerevisiae and Sz. pombe. *Comparative and Functional Genomics*, *6*, 843549. https://doi.org/10.1002/cfg.482

Peterson, T. R., Laplante, M., Thoreen, C. C., Sancak, Y., Kang, S. A., Kuehl, W. M., Gray, N. S., & Sabatini, D. M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*, *137*(5), 873-886.

Pilkinton, M., Sandoval, R., & Colamonici, O. (2007). Mammalian Mip/LIN-9 interacts with either the p107, p130/E2F4 repressor complex or B-Myb in a cell cycle-phase-dependent context distinct from the Drosophila dREAM complex. *Oncogene*, *26*(54), 7535-7543.

Piper, M. D., Selman, C., McElwee, J. J., & Partridge, L. (2008). Separating cause from effect: how does insulin/IGF signalling control lifespan in worms, flies and mice? *J Intern Med*, *263*(2), 179-191. https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01906.x

Powers, R. W., 3rd, Kaeberlein, M., Caldwell, S. D., Kennedy, B. K., & Fields, S. (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev*, *20*(2), 174-184. https://doi.org/10.1101/gad.1381406

Raizen, D. M., Zimmerman, J. E., Maycock, M. H., Ta, U. D., You, Y. J., Sundaram, M. V., & Pack, A. I. (2008). Lethargus is a Caenorhabditis elegans sleep-like state. *Nature*, *451*(7178), 569-572. https://doi.org/10.1038/nature06535

Robida-Stubbs, S., Glover-Cutter, K., Lamming, D. W., Mizunuma, M., Narasimhan, S. D., Neumann-Haefelin, E., Sabatini, D. M., & Blackwell, T. K. (2012). TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell metabolism*, *15*(5), 713-724. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.04.007

Rogers, A. N., Chen, D., McColl, G., Czerwieniec, G., Felkey, K., Gibson, B. W., Hubbard, A., Melov, S., Lithgow, G. J., & Kapahi, P. (2011). Life span extension via eIF4G inhibition is mediated by posttranscriptional remodeling of stress response gene expression in C. elegans. *Cell Metab*, *14*(1), 55-66. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.010

Ruvkun, G., & Hobert, O. (1998). The taxonomy of developmental control in Caenorhabditis elegans. *Science*, *282*(5396), 2033-2041. https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2033

Sadasivam, S., & DeCaprio, J. A. (2013). The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nature Reviews Cancer*, *13*(8), 585-595.

Salinas, L., Maldonado, E., & Navarro, R. (2006). Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in Caenorhabditis elegans. *Cell Death & Differentiation*, *13*(12), 2129-2139.

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D.-H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology*, *14*(14), 1296-1302.

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Kim, D. H., Guertin, D. A., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, *14*(14), 1296-1302. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054

Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *168*(6), 960-976. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004

Schertel, C., & Conradt, B. (2007). C. elegans orthologs of components of the RB tumor suppressor complex have distinct pro-apoptotic functions.

Schierenberg, E. (1980). Cell lineages and development of Caenorhabditis elegans and other nematodes. *Nematodes as Biological Models*.

Schinaman, J. M., Rana, A., Ja, W. W., Clark, R. I., & Walker, D. W. (2019). Rapamycin modulates tissue aging and lifespan independently of the gut microbiota in Drosophila. *Scientific Reports*, *9*(1), 7824. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44106-5

Shindyapina, A. V., Cho, Y., Kaya, A., Tyshkovskiy, A., Castro, J. P., Deik, A., Gordevicius, J., Poganik, J. R., Clish, C. B., Horvath, S., Peshkin, L., & Gladyshev, V. N. (2022). Rapamycin treatment during development extends life span and health span of male mice and Daphnia magna. *Sci Adv*, *8*(37), eabo5482. https://doi.org/10.1126/sciadv.abo5482

Soukas, A. A., Kane, E. A., Carr, C. E., Melo, J. A., & Ruvkun, G. (2009). Rictor/TORC2 regulates fat metabolism, feeding, growth, and life span in Caenorhabditis elegans. *Genes Dev*, *23*(4), 496-511. https://doi.org/10.1101/gad.1775409

Stanfel, M. N., Shamieh, L. S., Kaeberlein, M., & Kennedy, B. K. (2009). The TOR pathway comes of age. *Biochim Biophys Acta*, *1790*(10), 1067-1074. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.06.007

Sternberg, P. W. (2005). Vulval development. *WormBook*, 1-28. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.6.1

Stiernagle, T. (2006). Maintenance of C. elegans. *WormBook*, 1-11. https://doi.org/10.1895/wormbook.1.101.1

Sulston, J., & Hodgkin, J. J. N. Y. C. S. H. L. (1988). Methods in the nematode C. elegans. 587-606.

Sulston, J. E., & Horvitz, H. R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans. *Developmental Biology*, *56*(1), 110-156.

Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans. *Developmental Biology*, *100*(1), 64-119.

Sykiotis, G. P., & Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal*, *3*(112), re3. https://doi.org/10.1126/scisignal.3112re3

Tohyama, D., Yamaguchi, A., & Yamashita, T. (2008). Inhibition of a eukaryotic initiation factor (eIF2Bdelta/F11A3.2) during adulthood extends lifespan in Caenorhabditis elegans. *Faseb j*, *22*(12), 4327-4337. https://doi.org/10.1096/fj.08-112953

Tullet, J. M., Hertweck, M., An, J. H., Baker, J., Hwang, J. Y., Liu, S., Oliveira, R. P., Baumeister, R., & Blackwell, T. K. (2008). Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in C. elegans. *Cell*, *132*(6), 1025-1038. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.030

van den Heuvel, S., & Dyson, N. J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(9), 713-724. https://doi.org/10.1038/nrm2469

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-

PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, *3*(7), RESEARCH0034. https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034

Wan, X., & Helman, L. J. (2007). The biology behind mTOR inhibition in sarcoma. *Oncologist*, *12*(8), 1007-1018. https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-8-1007

Wang, J., Robida-Stubbs, S., Tullet, J. M., Rual, J. F., Vidal, M., & Blackwell, T. K. (2010). RNAi screening implicates a SKN-1-dependent transcriptional response in stress resistance and longevity deriving from translation inhibition. *PLoS Genet*, *6*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001048

Ward, S., & Carrel, J. S. (1979). Fertilization and sperm competition in the nematode Caenorhabditis elegans. *Dev Biol*, *73*(2), 304-321. https://doi.org/10.1016/0012-1606(79)90069-1

White, J. B. S. W. (1988). The nematode Caenorhabditis elegans. *Cold Spring Harbor Laboratory*, *1*(988), 1091-1105.

Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, *124*(3), 471-484. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016

Zarkower, D. J. W. T. O. R. o. C. e. B. (2006). Somatic sex determination.

Zeng, Z., Sarbassov dos, D., Samudio, I. J., Yee, K. W., Munsell, M. F., Ellen Jackson, C., Giles, F. J., Sabatini, D. M., Andreeff, M., & Konopleva, M. (2007). Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. *Blood*, *109*(8), 3509-3512. https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-030833

Zhuang, Z., Li, M., Liu, H., Luo, L., Gu, W., Wu, Q., & Wang, D. (2016). Function of RSKS-1-AAK-2-DAF-16 signaling cascade in enhancing toxicity of multi-walled carbon nanotubes can be suppressed by mir-259 activation in Caenorhabditis elegans. *Sci Rep*, *6*, 32409. https://doi.org/10.1038/srep32409

Zid, B. M., Rogers, A. N., Katewa, S. D., Vargas, M. A., Kolipinski, M. C., Lu, T. A., Benzer, S., & Kapahi, P. (2009). 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in Drosophila. *Cell*, *139*(1), 149-160. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.034