

BÖLÜM V

ANTI-KANSER İLAÇ KEŞFİ İÇİN BİR MODEL OLARAK *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans as a Model for Anti-Cancer Drug Discovery

Şeyda BERK

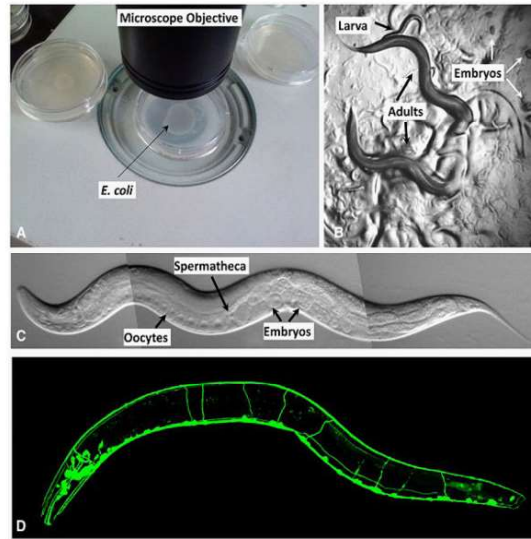
(Dr. Öğretim Üyesi) Sivas Cumhuriyet Üniversitesi,
Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sivas, Türkiye
e-mail:sberk@cumhuriyet.edu.tr
Orcid: 0000-0003-4687-0223

1. Giriş

1963'te Sydney Brenner, Tıbbi Araştırma Konseyi'nin Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (LMB) başkanı Max Perutz'a, "moleküler biyolojinin klasik sorunlarının ya çözüldüğü ya da önümüzdeki on yıl içinde çözüleceği" konusundaki endişelerini detaylandıran bir mektup göndermiştir. Bu mektubunda moleküler biyolojinin geleceğinin, "özellikle gelişim ve sinir sistemi" olmak üzere diğer alanlara yayılmasına dayandığını öne sürmüştür (Sydney Brenner, 2002; Reeve, 1988). Ayrıca, prokaryotik genetiğin basitliğini ve gücünü göz önünde bulundurarak, bir nematod (yuvarlak solucan), *Caenorhabditis briggsae*'nin bu sorunların üstesinden gelmek için ideal bir sistem olacağını önermiştir. Daha sonra, çabalarının odak noktası olarak nematod *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) yetiştirmeyi denemiştir, çünkü *C. elegans* suşu Brenner'ın laboratuvarındaki *C. briggsae* izolatından daha iyi büyüme özelliği sergilemiştir (Félix, 2008). Bugün *C. elegans*, son 5 yılda her yıl yayınlanan 8000'ün üzerinde *C. elegans* araştırma makalesi ile dünya çapında çok sayıda laboratuvarında aktif olarak incelenmektedir.

C. elegans, dünya çapında bulunan küçük, serbest yaşayan bir nematodur. Yumurtadan yeni çıkan larvalar 0,25 milimetre, erginler ise 1 milimetre

boyundadır. Küçük boyutları, hayvanların genellikle 100X'e kadar büyütme izin veren diseksiyon mikroskopları veya 1000X'e kadar büyütme izin veren bileşik mikroskoplarla gözlemlendiği anlamına gelmektedir. Diseksiyon mikroskobu, solucanları hareket ederken, yemek yerken, gelişirken, çiftleşirken ve yumurta bırakırken petri kaplarındaki (Şekil 1, A ve B) solucanları gözlemlmek için kullanılmaktadır. Bir bileşik veya konfokal mikroskop, çok daha iyi çözünürlükte gözlem yapılmasına izin vermektedir (Şekil 1C), araştırmacıların hücre gelişimi ve işlevi ile ilgili soruları tek hücreli çözünürlükte ele alan deneyler yapmalarına izin vermektedir. *C. elegans* şeffaf olduğundan, tek tek hücreler ve hücre altı ayrıntılar için diferansiyel girişim kontrastı (DIC) mikroskopi kullanılarak kolayca görselleştirilebilmektedir (Şekil 1C). Proteinleri veya hücre altı bölmelerini etiketlemek için floresan proteinler kullanılarak gelişmiş ayrıntılar 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 de kullanılabilir (Chalfie, Tu, Euskirchen, Ward, & Prasher, 1994) (Boulin, Etchberger, & Hobert, 2006; Feinberg ve ark., 2008).



Şekil 1. *C. elegans* model organizması. (A) Diseksiyon mikroskop ile 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, Wightman, & Chalfie, 2015).

2. *C. elegans*'ın büyümesi ve bakımı

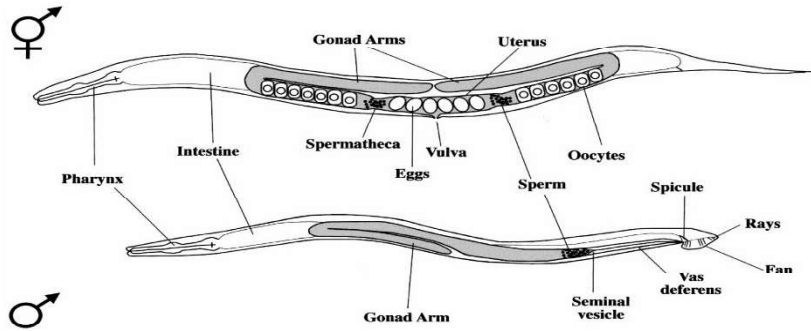
C. elegans, sıklıkla bir toprak nematodu olarak yanlış karakterize edilmesine rağmen, bol miktarda bakteriyel besin kaynağı içeren çürüyen bitkisel maddelerden en kolay şekilde izole edilebilmektedirler (Barrière & Félix, 2014). Laboratuvarında hayvanlar normal olarak *Escherichia coli*-OP50 bakterisi içeren agar petrileri üzerinde büyütülmektedir. Hayvanlar bakterileri tükettikten sonra yağ kaynaklarını kullanmaktadırlar. Yiyecek olmadan, genç larva aşamasındaki hayvanların gelişimi durdurulur. Bu durağanlığa girmenin bir sonucu olarak, hayvanlar en az bir ay hayatta kalabilir ve stok olarak sürekli beslenmeye ihtiyaç duymazlar. Sağlıklı, büyüyen hayvanlara ihtiyaç duyulduğunda, eski petrilerdeki agarın bir parçası bakteri içeren yeni bir petriye aktarılabilirler. Hayvanlar yeni bakterilere geçer ve gelişimlerine devam etmektedirler.

Diğer bazı özellikler, *C. elegans* stoklarının bakımını ve deneysel kullanımlarını büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır. **Birincisi**, *C. elegans* kendi kendine döllenebilen bir hermafrodit olduğundan, tek bir hayvan bir petride yerleşebilmektedir. İkincisi, hayvan popülasyonları yıllarca dondurulabilir ve gerektiğinde yeniden canlandırılabilirler. Üçüncüsü, hayvanın küçük boyutu, birçoğunun küçük bir alanda yetiştirilebileceği anlamına gelmektedir. **Dördüncüsü**, hayvanlar 12°C ila 25°C arasında değişen sıcaklıklarda yetiştirilebilmektedir. Farklı sıcaklıklarda büyüme, hayvan gelişim hızını kontrol etmeyi mümkün kılmaktadır ve sıcaklığa duyarlı mutantların izolasyonu ve kullanımına yardımcı olmaktadır. Hayvanlar kısır hale geldiği için 25°C'nin üzerinde sürekli büyüme mümkün değildir. Hayvanlar çok sıcak odalarda (sıcaklık kontrollü inkübatörler yerine) tutulursa üst sıcaklık sınırı sorun olabilmektedir. **Beşincisi**, hayvanlar yumurtadan yeni çıkmış larvaları izole ederek veya hamile yetişkinlere çamaşır suyu (embriyolar hariç her şeyi öldürerek dekontamine etmektedir) ve ağartma tedavisine dirençli yumurtaları izole ederek senkronize edilebilmektedir. **Altıncısı**, biyokimyasal çalışmaları kolaylaştırmak için hayvanlar sıvı ortamda toplu olarak büyütülebilmektedir. COPAS Biosorter gibi "solucan ayıklayıcılar" da istenen özelliklere sahip büyük miktarlardaki bireysel solucanları hızlı bir şekilde seçmek için kullanılabilirler. **Son olarak**, bu hayvanla çalışmak için iyi bir diseksiyon mikroskobu ve bir bileşik mikroskobun ötesinde özellikle pahalı ekipmanlara ihtiyaç yoktur. Genel olarak, hayvanlar ucuz ve bakımı kolay olmaktadır (Corsi ve ark., 2015).

3. *C. elegans*'ın cinsiyet formları ve önemi

Yabani tip *C. elegans*'ın kendi kendine döllenebilen hermafroditler ve erkekler olmak üzere iki cinsel formu vardır (Şekil 2). Hermafroditlerin gonadı, önce

L4 aşamasında spermatekada depolanan haploid amoeboid sperm üreten bir ovotestis oluşturur ve daha sonra yetişkinliğe doğru germ hattı kaderi değiştirir ve çok daha büyük oositler üretir. Esasen hermafroditler, gonadları oosit üretmeden önce geçici olarak sperm üreten dişilerdir. Hermafroditler, depolanan sperm tarafından döllenmiş 300'e kadar kendi soyunu üretebilmektedir. Erkeklerle çiftleşirse, hermafroditler ~1000 yavru üretebilirler, bu da hermafrodit tarafından üretilen sperm kendi kendine döllenmede sınırlayıcı bir faktör olduğunu göstermektedir. Her iki cinsiyet de beş otozomal kromozom için diploiddir. Cinsiyetler, hermafroditlerin iki X kromozomuna sahip olması ve erkeklerin tek bir X kromozomuna sahip olması (*C. elegans*'ın Y kromozomu olmaması) ve erkeklerin genotipinin XO olarak adlandırılması bakımından farklılık göstermektedir. Cinsiyet, X ile otozom (X:A) oranı ile belirlenmektedir (Zarkower, 2006). Kendi kendine döllenme yoluyla üretilen yavruların çoğu hermafroditlerdir; X kromozomunun nadir mayotik ayrılması nedeniyle, neslin sadece %0,1-0,2'si erkektir (Corsi ve ark., 2015).



Şekil 2. Erişkin *C. elegans* hermafrodit (üstte) ve erkekte (altta) temel anatomi. Hayvanların gri kısımları ilgili gonadlarını gösterir. Hermafrodit gonad, ventral tarafın ortasındaki vulvada açılan iki refleksi koldan oluşurken, erkekte kuyruktaki kloakta açılan sadece bir kol bulunur (Hansen & Pilgrim, 1999).

Kendi kendini dölleyen hermafroditler, genetik analiz için çeşitli avantajlar sağlamaktadır. İlk olarak, kendi kendine döllenme, tek bir hayvan tüm bir popülasyonu oluşturabileceğinden, stokları korumayı kolaylaştırır. İkincisi, Sydney Brenner'in (1974) yazdığı gibi, "hayvanlar homozigotluğa yönlendirilir", yani hermafrodit popülasyonları heterozigot kaybetme eğilimindedir (çünkü hermafroditler diğer hermafroditlerle çiftleşemez) (S. Brenner, 1974). Bununla birlikte,

mutajenize edilen suşlar esasen izogeniktir. Üçüncüsü, kendi kendileşme, standart Mendel ayrıştırma kurallarına uymaktadır, bu nedenle çekinik bir özellik için heterozigot olan bir ebeveyn, standart 1:2:1 ayrışma modelini üretecektir, öyle ki, neslin %25'i mutant alel için homozigot olacak ve otozomal çekinik özellik gösterecektir. Böylece, kendi kendileşme, bu tür mutantları bulmak için gereken çabayı büyük ölçüde azaltmaktadır. **Dördüncüsü**, çiftleşme yeteneğini bozan nöromüsküler kusurları olan mutantlar laboratuvarında bakımı sağlanabilmektedir. Aslında, hermafroditin grup olarak öldürüldüğünde hayvanların dauer larva haline gelmesine neden olan 302 sinir hücresinden sadece on biri (sekiz ADF, ASG, ASI ve ASJ nöronları) (Bargmann & Horvitz, 1991), iki CAN hücresi (Forrester & Garriga, 1997) ve farenksin M4 nöronu (Avery & Horvitz, 1989) üreme erişkin aşamasına gelişimi desteklemek için gerekli olduğu bilinmektedir. **Beşincisi**, ciddi şekilde kusurlu mutantların bile yaşayabilirliği ve kendi kendini dölleme yetenekleri, değiştirici (arttırıcı ve baskılayıcı) mutasyonlar için kolay taramalara izin vermektedir. Bu tür taramalar son derece yararlı ve bilgilendirici olmuştur. Örneğin, lin-12 mutantları vulva gelişiminde kusurludur ve LIN-12/Notch sinyal yolunun bileşenleri hem baskılayıcı hem de güçlendirici olarak tanımlanmıştır (Greenwald & Kovall, 2013).

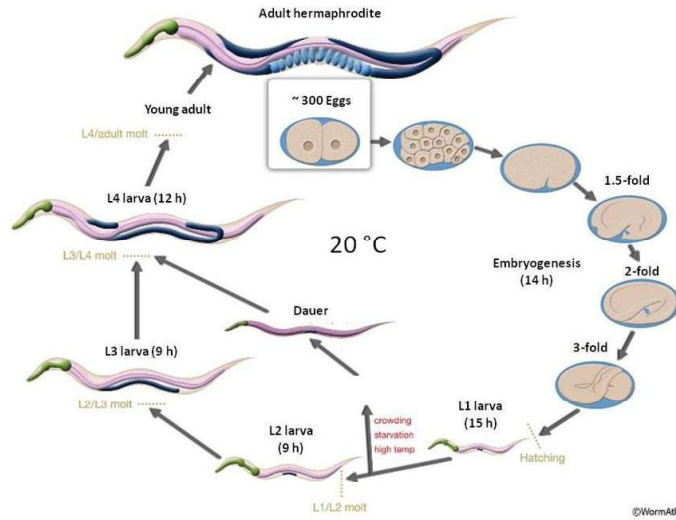
Farklı genetik bileşimlere sahip hayvanlar oluşturmak ve genleri haritalamak için gerekli olan genetik materyalin değiş tokuşuna izin verdiklerinden dolayı *C. elegans* erkekleri de önemlidir. Gerçekten de hayvan, hermafrodit spermi kullanmadan önce erkek (dış çapraz) sperm kullanarak nadir erkeklerin genetik katkısından yararlanmak için evrimleşmiştir. Bu nedenle, eğer erkekler çiftleşme yeteneğine sahipse, çapraz döl hakimdir (Ward & Carrel, 1979).

4. *C. elegans*'ın yaşam döngüsü

C. elegans embriyogenezi 20°C'de yaklaşık 16 saat sürmektedir (sonraki zamanların tümü de 20°C'de gelişim içindir) (Şekil 3). Döllenmeden sonra neredeyse geçirimsiz bir yumurta kabuğu yapılı ve embriyonun anneden tamamen bağımsız olarak gelişmesini sağlar. Bununla birlikte, embriyolar genellikle, yumurtlandıkları 24 hücre aşamasına kadar hermafrodit içinde tutulur. Hermafrodit embriyo 558 çekirdekle yumurtadan çıkar (bazı çekirdekler çok çekirdekli sınıftadır, bu nedenle hücre sayısı daha düşüktür) ve ilk aşama (L1) larva oluşur. Hayvanlar dört larva evresi (L1-L4) boyunca yemeye ve gelişmeye başlar. L1 aşaması ~16 saat uzunluğundadır; diğer aşamalar ~12 saat uzunluğundadır. Her aşama, yeni bir kütikülün (dış kollajen tabakası)

yapıldığı letargus adı verilen uyku benzeri bir hareketsizlik dönemi ile sona erer (Raizen ve ark., 2008). Lethargus, eski kütikülün dökülmesiyle sona erer. L4 tüy dökümünden yaklaşık 12 saat sonra, yetişkin hermafroditler, kendi ürettikleri tüm spermlerini kullanana kadar 2-3 günlük bir süre boyunca yeni nesiller üretmeye başlarlar; sperm tükenmiş hermafrodit bir erkekle çiftleşirse ek soy üretilebilmektedir. Üreme döneminden sonra, hermafroditler yaşlanmadan ölmeden önce birkaç hafta daha yaşayabilirler (Corsi ve ark., 2015).

Bakteriler tükendiğinde ve hayvanlar kalabalık olduğunda, L2 larvaları alternatif bir yaşam döngüsünü aktive etmektedir (Hu, 2007) ve “dauer” larva adı verilen alternatif bir L3 larva aşamasına dönüşürler. Almanca’da “dauer”, “kalıcı” anlamına gelmektedir; sinyal aslında L1 hayvanlar tarafından alınır ve işlenir, ancak sonuçları “L2d” aşaması olarak adlandırılan aşamaya kadar görülmemektedir (Golden & Riddle, 1984). Dauer larva kütikülü hayvanı tamamen çevreler ve ağzı tıkayarak hayvanın beslenmesini engellemektedir ve böylece gelişimi durdurmaktadır. Dauer kütikülü kimyasallara karşı gelişmiş bir dirence sahiptir, bu nedenle dauer’e çevresel streslere ve kostik ajanlara karşı daha fazla koruma sağlamaktadır. Dauer larvaları aylarca hayatta kalabilir ve vahşi doğada en sık karşılaşılan dağılım şeklidir. Dauer larvaları bakteri içeren petrilere aktarıldıklarında ağız tıkaçlarını dökerler, tüy dökerler ve biraz farklı L4 larvaları olarak gelişimlerini sürdürürler (Corsi ve ark., 2015).



Şekil 3: *C. elegans* yaşam döngüsü 20 °C’de (Elgeti, 2010).

5. Neden *C. elegans*'ı seçmeliyiz?

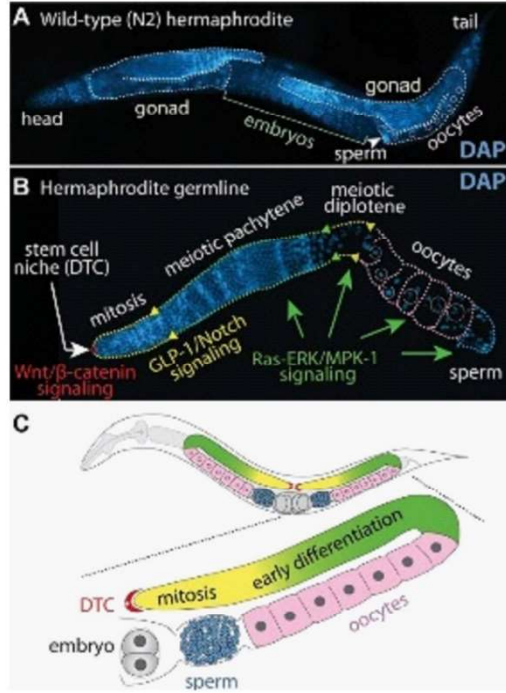
Genetik çalışmalar için güçlü bir sistem olmasının yanı sıra, *C. elegans* ökaryotik biyoloji için bir model olarak birçok doğal avantaja sahiptir. Bu özellikler arasında küçük boyutu, büyük kuluçka boyutu, yetiştirme kolaylığı, düşük bakım masrafı, uzun vadeli dondurarak saklama, hızlı üretim süresi, şeffaflık, değişmez hücre sayısı ve gelişimi ve besleme RNAi kullanarak gen aktivitesini azaltma yeteneği yer almaktadır. Genellikle bahsedilmese de, *C. elegans*'ın bir başka olumlu özelliği de organizmaların insanlara karşı oldukça iyi huylu olmasıdır. Aslında vücut ısısında gelişemedikleri için insanlarda da gelişemezler. Bazı nematodlar, örneğin *Ascaris suum*, zayıflatıcı bir alerjik reaksiyona neden olur ve havalandırılmalı kabinlerde incelenmelidir (Kennedy, 2013).

C. elegans'ı kullanan hücre ve gelişim biyolojisi çalışmalarına, hayvanın şeffaflığı büyük ölçüde yardımcı olur; bu, araştırmacıların, mutasyonlar veya değiştirilmiş ortamlar nedeniyle gelişme ve değişiklikleri, tüm bağlam içinde tek bir tanımlanmış hücre düzeyinde incelemesine olanak tanımaktadır. Böylece birçok biyolojik problem heterojen dokulardaki çok sayıda hücre yerine tek hücre düzeyinde “minyatür” olarak incelenebilmektedir. Şeffaflık ayrıca canlı hayvanlarda floresan protein raportörleri kullanan çok sayıda çalışma mevcuttur. Floresan proteinler, canlı hücrelerdeki hücreleri ve proteinleri etiketleyerek, genetik ekranların çeşitli hücresel süreçlerde kusurlu mutantları tanımlamasını sağlamaktadır. Ayrıca, hücre-hücre ve sinaptik temasların haritalanması, farklı hücrelerde tamamlayıcı GFP fragmanları eksprese edilerek gerçekleştirilebilir (GRASP) (Feinberg ve ark., 2008). Şeffaflık ayrıca, bireysel nöronların aktivitesini değiştiren optogenetik araçların özellikle *C. elegans*'ta etkili olduğu anlamına gelmektedir (Husson, Gottschalk, & Leifer, 2013). Tüm bu deneylerde, hayvanın konumu ve çevresi üzerinde daha fazla kontrol, aynı anda gen düzenlemesinin floresan okumasını veya mikroskopi ile elektrofizyolojik aktiviteyi izlerken çeşitli bileşiklerin veya diğer ajanların uygulanmasına izin veren özel tasarlanmış kanallara ayrı solucanların monte edildiği mikroakışkan cihazlarla gerçekleştirilebilmektedir (Lockery, 2007; San-Miguel & Lu, 2013).

6. Anti-kanser ilaç keşif araştırmalarında *C. elegans*

C. elegans, ayrıntılı genom analizleri sonucunda genom dizisi çıkartılmış ve çok sayıda çalışmada kullanımı neticesinde gen/protein ifadesi bulunmuş olup buna bağlı olarak model organizma statüsüne erişen nematod (solucan) olarak tanımlanmaktadır. *C. elegans* germ hattı gelişimi, Wnt, Notch ve Ras

dahil olmak üzere korunmuş harici sinyal yollarının yanı sıra gen ekspresyon düzenleyicileri ve hücre döngüsü düzenleyicileri dahil olmak üzere içsel düzenleyiciler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Şekil 4) (Kimble & Crittenden, 2007). Bu sinyal yollarının anormal kontrolü, somatik distal uç hücrelerin (germline kök hücre nişi olarak işlev gören DTC'ler) ve germline kök hücrelerinin yanı sıra ekstra DTC oluşumu, kontrolsüz germ hattı proliferasyonu ve anormal germ hücre kaderi spesifikasyonunun kaybına neden olabilir ve hepsi kısırılık ve germline tümörleri ile ilişkilidir (Kobet ve ark., 2014). Bu nedenle, *C. elegans* germ hattının bu özellikleri onu, onkojenik sinyal yollarını hedefleyen ilaçların fenotip tabanlı yüksek verimli taraması ve terapötik hedeflerin belirlenmesi için çok uygun bir organizma haline getirmektedir.



Şekil 4. *C. elegans* ve korunmuş sinyal yolları. (A) DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ile boyanmış yetişkin bir yabancı tip (N2) hermafrodit.

Hermafroditin iki gonadal tüpü vardır. (B) DAPI ile boyanmış yetişkin hermafroditin germline hattı. Distal uçta, DTC adı verilen somatik gonadal hücre (noktalı kırmızı daire), germline kök hücre bakımını için gerekli olan bir germline kök hücre nişi görevi görür. DTC kaderi, en azından kısmen, erken larva aşamasında (L1) Wnt/β-katenin sinyallemesi ile belirlenir. Distal mitotik bölgede (noktalı sarı çizgiler), GLP-1/Notch sinyali, germline kök hücrenin

kendi kendini yenilemesini sağlar ve progenitör hücrelerin mitotik hücre döngüsünü destekler. Mitotik hücreler mayotik hücre döngüsüne girdikten sonra, Ras-ERK MAPK sinyali mayotik germ hücre ilerlemesini (noktalı yeşil çizgiler), pakiten çıkışını (noktalı sarı çizgiler), oosit olgunlaşmasını (noktalı pembe çizgiler; daire, oosit çekirdekleri) ve spermi (noktalı mavi çizgiler) kader belirtimi. (C) Yetişkin bir *C. elegans* hermafrodit gonadının şeması. Somatik DTC, distal uçta bulunur. Germ hattı kök hücreleri de dahil olmak üzere germ hattının distal ucundaki hücreler mitotik olarak bölünür (sarı). Hücreler proksimal olarak hareket ettikçe mayoza (yeşil) girerler ve sperm (mavi) veya oositlere (pembe) farklılaşırlar (Kobet ve ark., 2014).

DTC, germ hattı kök hücre bakımı için gerekli olan germ hattı kök hücre nişi olarak işlev görmektedir (Kimble & Crittenden, 2007). Erken larva gelişimi sırasında, DTC başlangıçta somatik gonadal progenitör (SGP) hücrenin asimetrik hücre bölünmesinden kaynaklanır ve bu bölüm, bir yavru DTC potansiyelini ve başka bir DTC olmayan potansiyeli göstermektedir (Byrd, Knobel, Affeldt, Crittenden, & Kimble, 2014; Kimble & Crittenden, 2007). Hermafroditlerde, DTC potansiyeli, DTC'yi oluşturmak üzere terminal olarak farklılaşmak için bir kez daha asimetrik olarak bölünür. DTC kaderi, farklı Wnt/ β -katenin sinyal yollarıyla belirlenir. Öncü hücrelerin, Z1 ve Z4'ün asimetrik bölünmesini düzenleyen yol, Frizzled reseptörleri (LIN-17 ve MOM-5), Disheveled proteinleri (DSH-2 ve MIG-5), β -katenin (SYS-1) ve TCF transkripsiyon faktörünü (POP-1) içerir (Byrd ve ark., 2014; Kimble & Crittenden, 2007). Bu yolun anormal düzenlenmesi, ya DTC kaderinin kaybıyla ya da simetrik bölünme ile fazladan DTC'lerin üretilmesiyle sonuçlanmaktadır. Önemli olarak, POP-1/TCF ve SYS-1/ β -katenin, DTC potansiyellerinde *ceh-22*'nin (memelilerde Nkx2.5 homologu) transkripsiyonunu doğrudan aktive eder (Lam ve diğerleri, 2006). *CEH-22/Nkx2.5*, DTC spesifikasyonu için gereklidir (Lam, Chesney, & Kimble, 2006). Bu nedenle, Wnt/ β -katenin sinyali ve doğrudan hedefleri (örn., *CEH-22*), *C. elegans* gonadlarında DTC kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, zayıf veya hiç Wnt sinyali, DTC kaybına ve sonuç olarak kısmen veya tamamen steril olmasına neden olan germ hattı kök hücrelerinin oluşmamasına neden olmaktadır (Kobet ve ark., 2014).

Normalde, yabancı tip hermafroditlerin iki DTC'si bulunmaktadır (Byrd & Kimble, 2009). Bununla birlikte, POP-1, SYS-1 veya *CEH-22*'nin kaybı, DTC kaderini ortadan kaldırır ve ektopik SYS-1 veya *CEH-22*, ekstra DTC'ler üretir ve yeni germ hattı kök hücre popülasyonları oluşturmaktadır (Byrd ve ark.,

2014; Kimble & Crittenden, 2007). Özellikle, *ceh-22* mutantlarının yaklaşık %40'ını her iki DTC'yi üretmez ve tamamen sterildir. Bunların %40'ında iki DTC'den biri eksik ve kısmen sterildir ve %20'si iki DTC üretir ve fertildir (Lam ve ark., 2006). Şaşırtıcı bir şekilde, *ceh-22* geninin ektopik ifadesi ekstra DTC'ler üretir (Lam ve ark., 2006). Bu nedenle, *ceh-22* (q632) fonksiyon kaybı mutanı, Wnt/ β -katenin sinyal yolunu inhibe edebilen veya aktive edebilen ilaçları tanımlamak için çekici bir alel olmuştur (Kobet ve ark., 2014). Bir ilaç Wnt/ β -katenin'i doğrudan veya dolaylı olarak inhibe ederse, DTC kaybını artıracak ve *ceh-22* mutantlarının steril fenotipini üretecektir. Buna karşılık, eğer ilaç Wnt/ β -katenin sinyalini aktive ederse, *ceh-22* mutantlarının doğurganlığını koruyacak ve iki veya daha fazla DTC ile sonuçlanacaktır. Ayrıca, ilaç, Wnt/ β -katenin sinyalini inhibetörünü doğrudan veya dolaylı olarak baskılırsa, Wnt/ β -katenin sinyalini aktive edebilir ve *ceh-22* mutantlarının doğurganlığını koruyabilecektir (Kobet ve ark., 2014). DTC kaderi de en azından kısmen hücre döngüsü düzenleyicileri tarafından düzenlenmektedir. Tilmann ve Kimble daha önce DTC kaderi spesifikasyonu için Cyclin D'nin gerekli olduğunu bildirmiştir (Tilmann & Kimble, 2005). Ayrıca, hücre döngüsü düzenleyicilerinin, DTC kaderini belirlemek için Wnt/ β -katenin sinyalleme ile birlikte çalıştığı da ortaya konmuştur (Lee, Cha, Mamillapalli, Kwon, & Koo, 2014). Bu nedenle, tanımlanan ilaçların hücre döngüsü düzenleyicilerini ve/veya Wnt/ β -katenin sinyallemesini hedefleyebilmesi olasılığını ortaya koymaktadır. Spesifiklik, Wnt/ β -katenin mutantlarında veya hücre döngüsü mutantlarında kimyasal genetik ile incelenebilmektedir (Kobet ve ark., 2014). Bu nedenle, Wnt/ β -katenin sinyalleme için çeşitli *C. elegans* mutantları, kolon kanseri gibi Wnt/ β -katenin sinyallemeyle ilişkili insan hastalıklarını potansiyel olarak tedavi edebilen ilaçları belirlemek için büyük bir fırsat sağlayacağı düşünülmektedir (Kobet ve ark., 2014).

C. elegans'taki bir diğer önemli sinyal yolu ise temel bileşenleri yüksek oranda korunmuş olan Notch sinyal yoludur. *C. elegans*, gelişim sırasında hücre-hücre etkileşimine aracılık eden GLP-1 ve LIN-12 olmak üzere iki Notch reseptörüne sahiptir (Greenwald, 2005). Spesifik olarak, *C. elegans* germ hattındaki GLP-1/Notch sinyali, germ hattı kök hücre bakımı ve devam eden mitotik bölünme için kritiktir (Kimble & Crittenden, 2007). *C. elegans* somatik hücrelerindeki LIN-12/Notch sinyali, erken larva evreleri sırasında vulva hücre kaderini belirlemektedir (Greenwald, 2005). LAG-2 (GLP-1/Notch ligandı) DTC'lerde ifade edildiğinde (Henderson, Gao, Lambie, & Kimble, 1994) ve GLP-1/Notch reseptörü ile etkileşime girdiğinde, GLP-1/Notch reseptörünün

proteolitik bölünmesi takip etmektedir. GLP-1/Notch hücre içi alanı (NICD) daha sonra zardan çekirdeğe doğru yer değiştirmektedir. Çekirdekte, NICD, hedef genlerin ekspresyonunu aktive etmek için LAG-1/CSL DNA bağlayıcı protein ve LAG-3/SEL-8/Mastermind transkripsiyon ko-aktivatörü ile üçüncül bir kompleks oluşturur: fbf-2 (PUF RNA bağlayıcı protein) (Lamont, Crittenden, Bernstein, Wickens, & Kimble, 2004) ve lip-1 (MAPK fosfataz) (Berset, Hoier, Battu, Canevascini, & Hajnal, 2001; Lee, Hook, Lamont, Wickens, & Kimble, 2006), Ist-1 (Nanos benzeri çinko parmak alanı içeren protein) (Kershner, Shin, Hansen, & Kimble, 2014; Yoo, Bais, & Greenwald, 2004) ve sygl-1 (Noval protein) (Kershner ve ark., 2014). Önemli olarak, FBF-2 ve LIP-1, *C. elegans* germ hattındaki mayoz bölünmeyi teşvik eden düzenleyicileri (örneğin, GLD-1, GLD-2, GLD-3 ve MPK-1) inhibe etmektedir (Kimble & Crittenden, 2007; Lee ve ark., 2006; Yoo ve ark., 2004). Bu nedenle, germ hattında GLP-1/Notch sinyalinin kaybı, erken mayoz girişi sırasında ciddi bir proliferasyon kusuruna neden olmaktadır. Bu da germline kök hücre bakımı ve sterilitesi olmamasına sebep olur (Austin & Kimble, 1987). Bu sinyallemenin yapısal aktivasyonu ise proliferasyonu teşvik etmektedir ve germ hattı kök hücreleri ve progenitör hücrelerinin yanı sıra mayoz bölünmeye girişi inhibe ederek germ hattı tümörleri ve kısırılık ile sonuçlanmaktadır (Berry, Westlund, & Schedl, 1997). Bu nedenle, GLP-1/Notch sinyallemesinin anormal regülasyonu, germ hattı kök hücrelerinin kaybına veya belirli bir hücre tipinin aşırı çoğalmasına neden olarak steriliteye neden olabilmektedir (Kobet ve ark., 2014).

Bir diğer önemli sinyal yolu olan Ras-ERK MAPK sinyal yolları, tüm ökaryotlarda çoğalma, farklılaşma, hücre kaderi spesifikasyonu, homeostaz ve hayatta kalma dahil olmak üzere birçok hücresel süreci yönetmektedir. *C. elegans* germ hattındaki Ras-ERK MAPK sinyal yolları Sundaram tarafından iyi tanımlanmıştır (Sundaram, 2006). Özellikle, çekirdek sinyal yolları ve bileşenleri çarpıcı bir şekilde korunmuştur (Sundaram, 2006; Whelan, Hollis, Cha, Asch, & Lee, 2012). Kısaca, iki farklı RTK, LET-23 (bir EGFR homologu) ve EGL-15 (bir FGFR homologu), LET-60'ı (bir Ras homologu) ve LIN-45'ten (bir Raf homologu), MEK2 (bir MEK homologu) ve MPK-1'den (bir ERK homologu) oluşan akış aşağı kademesini uyarmaktadır. Bu *C. elegans* Ras-ERK MAPK sinyali, mayotik döngü ilerlemesi, oosit aktivasyonu, sperm kaderi spesifikasyonu, spermatogenez, fizyolojik apoptoz, akson rehberliği ve vulva gelişimi dahil olmak üzere çoklu gelişim olaylarını kontrol etmektedir (Lee ve ark., 2006; Lee, Ohmachi, ve ark., 2007; Morgan, Lee, & Kimble, 2010; Sundaram, 2006). Aktive MPK-1/ERK, germline kök hücre bölgesinde

fazladan iki aşağı regülasyon moduna tabidir: FBF-1/-2 (PUF RNA bağlayıcı protein ailesinin üyeleri) proteinleri, mpk-1/ERK mRNA'yı baskılamak için transkripsiyon sonrası hareket eder ve LIP-1, MPK-1/ERK aktivitesini inhibe etmek için post-translasyonel olarak hareket eder (Lee, Hook, ve ark., 2007). Bu düzenleme insan embriyonik kök hücrelerinde de korunur (Lee, Hook, ve ark., 2007; Whelan ve ark., 2012). Bu nedenle, MAPK/ERK'nin hem PUF baskısı hem de MKP (MAPK fosfataz) inhibisyonu tarafından ikili negatif düzenlenmesi, hem kök hücre bakımını hem de muhtemelen tümör ilerlemesini etkileyen korunmuş bir mekanizma olabilmektedir (Whelan ve ark., 2012). *C. elegans* germ hattında, *C. elegans* Ras-ERK MAPK sinyalinin inhibitörleri olarak ek düzenleyiciler de tanımlanmıştır: LARP-1 (La ile ilgili protein) ve İnsülin sinyali, oogenez sırasında Ras-ERK MAPK sinyalini inhibe etmektedir (Lopez ve ark., 2013; Nykamp, Lee, & Kimble, 2008). PUF-8 (PUF protein ailesinin bir üyesi), germ hattı kök hücre bölgesinde let-60/Ras mRNA ekspresyonunu baskılar (Vaid, Ariz, Chaturbedi, Kumar, & Subramaniam, 2013). Germ hattı merkezi kinaz (GCK1) ayrıca Ras-ERK MAPK sinyalini inhibe ederek apoptozu baskılamaktadır (Schouest ve ark., 2009). Bu nedenle, Ras-ERK MAPK sinyali, kinazlar, fosfatazlar veya RNA düzenleyicileri dahil olmak üzere çeşitli düzenleyiciler tarafından pozitif veya negatif olarak düzenlenmektedir.

7. Sonuç

C. elegans'ı türler arasında genetik uygunluk ve hücrel süreçlerin korunmasını içeren genetik araştırmalar için çok yönlü hedef haline getiren küçük boyutu, kısa üretim süresi ve fazla sayıda yavru üretme yeteneği gibi özellikleri *C. elegans*'ı tüm organizma tabanlı yüksek verimli tarama için mükemmel bir aday yapmaktadır. Bu amaç için *C. elegans* kullanmanın başlıca avantajları şunlardır: 1) *in vitro* veya tek hücreli modellerde kolayca çoğaltılamayan karmaşık insan hastalıklarını modelleme yeteneği, 2) ilaç etkinliğini ve absorpsiyonunu, dağılımını, metabolizmasını, atılımını aynı anda değerlendirme yeteneği veya ilaç keşif hattının ilk aşamalarındaki toksisite özellikleri, 3) geniş bir puanlanabilir fenotip repertuarı, 4) bir organizmanın tamamında var olan çok hücreli ve çok organlı sistem karmaşıklığı, ilaç tanımlama şansını artırmakta ve sonuçta insanlar gibi daha karmaşık çok hücreli organizmalarda daha etkili olabileme ihtimali ve 5) zamanla kanıtlanmış genetik araçların ve genomik kaynakların (örn., RNAi besleme kitaplığı) mevcudiyeti, ilaç hedefi tanımlamasını ortaya koymaktadır.

C. elegans'in sayısız insan hastalığının moleküler ve hücreyel yönlerini araştırmak için faydalı bir model organizma olduğu kanıtlanmıştır. Daha yakın zamanlarda, araştırmacılar bu organizmanın ilaç keşfi için bir araç olarak kullanımını araştırmışlardır. Buna göre, *C. elegans*, antimikrobiyal ilaçların (Ewbank & Zugasti, 2011; Squiban & Kurz, 2011), antifungal ilaçların (Anastassopoulou, Fuchs, & Mylonakis, 2011) ve Alzheimer hastalığı ilaçlarının (Lublin & Link, 2013) keşiflerinde kullanılmıştır. Bu nedenle, *C. elegans*, yeni hastalık veya hedefe özel ilaçların keşfi ve canlı bir hayvanda yeni tanımlanan veya bilinen ilaçların (veya küçük moleküllerin) etki mekanizmasının incelenmesi için muazzam şekilde umut vaat etmektedir.

Kaynakça

- Anastassopoulou, C. G., Fuchs, B. B., & Mylonakis, E. (2011). *Caenorhabditis elegans*-based model systems for antifungal drug discovery. *Curr Pharm Des*, 17(13), 1225-1233. doi:10.2174/138161211795703753
- Austin, J., & Kimble, J. (1987). glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell*, 51(4), 589-599. doi:10.1016/0092-8674(87)90128-0
- 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. doi:10.1016/0896-6273(89)90206-7
- Bargmann, C. I., & Horvitz, H. R. (1991). Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 251(4998), 1243-1246. doi:10.1126/science.2006412
- Barrière, A., & Félix, M. A. (2014). Isolation of *C. elegans* and related nematodes. *WormBook*, 1-19. doi:10.1895/wormbook.1.115.2
- Berry, L. W., Westlund, B., & Schedl, T. (1997). Germ-line tumor formation caused by activation of glp-1, a *Caenorhabditis elegans* member of the Notch family of receptors. *Development*, 124(4), 925-936. doi:10.1242/dev.124.4.925
- Berset, T., Hoier, E. F., Battu, G., Canevascini, S., & Hajnal, A. (2001). Notch inhibition of RAS signaling through MAP kinase phosphatase LIP-1 during *C. elegans* vulval development. *Science*, 291(5506), 1055-1058. doi:10.1126/science.1055642
- Boulin, T., Etchberger, J. F., & Hobert, O. (2006). Reporter gene fusions. *WormBook*, 1-23. doi:10.1895/wormbook.1.106.1
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94. doi:10.1093/genetics/77.1.71

- Brenner, S. (2002). The worm's turn. *Current Biology*, 12(21), R713. doi:[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01241-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01241-1)
- Byrd, D. T., & Kimble, J. (2009). Scratching the niche that controls *Caenorhabditis elegans* germline stem cells. *Semin Cell Dev Biol*, 20(9), 1107-1113. doi:10.1016/j.semdb.2009.09.005
- Byrd, D. T., Knobel, K., Affeldt, K., Crittenden, S. L., & Kimble, J. (2014). A DTC niche plexus surrounds the germline stem cell pool in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 9(2), e88372. doi:10.1371/journal.pone.0088372
- 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. doi:10.1126/science.8303295
- Corsi, A. K., Wightman, B., & Chalfie, M. (2015). A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387-407. doi:10.1534/genetics.115.176099
- Elgeti, D. D. (2010). Characterization of potential modulators of the intestinal peptide transporter PEPT1 in *Caenorhabditis elegans* and human colon carcinoma cells.
- Ewbank, J. J., & Zugasti, O. (2011). *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Dis Model Mech*, 4(3), 300-304. doi:10.1242/dmm.006684
- 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. doi:10.1016/j.neuron.2007.11.030
- Félix, M. A. (2008). RNA interference in nematodes and the chance that favored Sydney Brenner. *J Biol*, 7(9), 34. doi:10.1186/jbiol97
- Forrester, W. C., & Garriga, G. (1997). Genes necessary for *C. elegans* cell and growth cone migrations. *Development*, 124(9), 1831-1843. doi:10.1242/dev.124.9.1831
- 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. doi:10.1016/0012-1606(84)90201-x
- Greenwald, I. (2005). LIN-12/Notch signaling in *C. elegans*. *WormBook*, 1-16. doi:10.1895/wormbook.1.10.1
- Greenwald, I., & Kovall, R. (2013). Notch signaling: genetics and structure. *WormBook*, 1-28. doi:10.1895/wormbook.1.10.2

- Hansen, D., & Pilgrim, D. B. (1999). Sex and the single worm: sex determination in the nematode *C. elegans*. *Mechanisms of Development*, 83, 3-15.
- Henderson, S. T., Gao, D., Lambie, E. J., & Kimble, J. (1994). lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*. *Development*, 120(10), 2913-2924. doi:10.1242/dev.120.10.2913
- Hu, P. J. (2007). Dauer. *WormBook*, 1-19. doi: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. doi:10.1111/boc.201200069
- Kennedy, M. W. (2013). Chapter 3 - Ascaris – Antigens, Allergens, Immunogenetics, Protein Structures. In C. Holland (Ed.), *Ascaris: The Neglected Parasite* (pp. 51-79). Amsterdam: Elsevier.
- Kershner, A. M., Shin, H., Hansen, T. J., & Kimble, J. (2014). Discovery of two GLP-1/Notch target genes that account for the role of GLP-1/Notch signaling in stem cell maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(10), 3739-3744. doi:10.1073/pnas.1401861111
- Kimble, J., & Crittenden, S. L. (2007). Controls of germline stem cells, entry into meiosis, and the sperm/oocyte decision in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 405-433. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123326
- Kobet, R. A., Pan, X., Zhang, B., Pak, S. C., Asch, A. S., & Lee, M. H. (2014). *Caenorhabditis elegans*: A Model System for Anti-Cancer Drug Discovery and Therapeutic Target Identification. *Biomol Ther (Seoul)*, 22(5), 371-383. doi:10.4062/biomolther.2014.084
- Lam, N., Chesney, M. A., & Kimble, J. (2006). Wnt signaling and CEH-22/tinman/Nkx2.5 specify a stem cell niche in *C. elegans*. *Curr Biol*, 16(3), 287-295. doi:10.1016/j.cub.2005.12.015
- Lamont, L. B., Crittenden, S. L., Bernstein, D., Wickens, M., & Kimble, J. (2004). FBF-1 and FBF-2 regulate the size of the mitotic region in the *C. elegans* germline. *Dev Cell*, 7(5), 697-707. doi:10.1016/j.devcel.2004.09.013
- Lee, M. H., Cha, D. S., Mamillapalli, S. S., Kwon, Y. C., & Koo, H. S. (2014). Transgene-mediated co-suppression of DNA topoisomerase-1 gene in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Biochem Mol Biol*, 5(1), 11-20.
- Lee, M. H., Hook, B., Lamont, L. B., Wickens, M., & Kimble, J. (2006). LIP-1 phosphatase controls the extent of germline proliferation in *Caenorhabditis elegans*. *Embo j*, 25(1), 88-96. doi:10.1038/sj.emboj.7600901

- Lee, M. H., Hook, B., Pan, G., Kershner, A. M., Merritt, C., Seydoux, G., . . . Kimble, J. (2007). Conserved regulation of MAP kinase expression by PUF RNA-binding proteins. *PLoS Genet*, 3(12), e233. doi:10.1371/journal.pgen.0030233
- Lee, M. H., Ohmachi, M., Arur, S., Nayak, S., Francis, R., Church, D., . . . Schedl, T. (2007). Multiple functions and dynamic activation of MPK-1 extracellular signal-regulated kinase signaling in *Caenorhabditis elegans* germline development. *Genetics*, 177(4), 2039-2062. doi:10.1534/genetics.107.081356
- Lockery, S. (2007). Channeling the worm: microfluidic devices for nematode neurobiology. *Nat Methods*, 4(9), 691-692. doi:10.1038/nmeth0907-691
- Lopez, A. L., 3rd, Chen, J., Joo, H. J., Drake, M., Shidate, M., Kseib, C., & Arur, S. (2013). DAF-2 and ERK couple nutrient availability to meiotic progression during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. *Dev Cell*, 27(2), 227-240. doi:10.1016/j.devcel.2013.09.008
- Lublin, A. L., & Link, C. D. (2013). Alzheimer's disease drug discovery: in vivo screening using *Caenorhabditis elegans* as a model for β -amyloid peptide-induced toxicity. *Drug Discov Today Technol*, 10(1), e115-e119. doi:10.1016/j.ddtec.2012.02.002
- Morgan, C. T., Lee, M. H., & Kimble, J. (2010). Chemical reprogramming of *Caenorhabditis elegans* germ cell fate. *Nat Chem Biol*, 6(2), 102-104. doi:10.1038/nchembio.282
- Nykamp, K., Lee, M. H., & Kimble, J. (2008). C. elegans La-related protein, LARP-1, localizes to germline P-bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis. *Rna*, 14(7), 1378-1389. doi:10.1261/rna.1066008
- 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. doi:10.1038/nature06535
- Reeve, E. C. R. (1988). The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Edited by William B. Wood and the Community of C. elegans Researchers. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 667 pages. US \$97.00. ISBN 0 87969 307 X. *Genetics Research*, 52, 243-244.
- San-Miguel, A., & Lu, H. (2013). Microfluidics as a tool for C. elegans research. *WormBook*, 1-19. doi:10.1895/wormbook.1.162.1
- Schouest, K. R., Kurasawa, Y., Furuta, T., Hisamoto, N., Matsumoto, K., & Schumacher, J. M. (2009). The germinal center kinase GCK-1 is a negative

- regulator of MAP kinase activation and apoptosis in the *C. elegans* germline. *PLoS One*, 4(10), e7450. doi:10.1371/journal.pone.0007450
- Squiban, B., & Kurz, C. L. (2011). *C. elegans*: an all in one model for antimicrobial drug discovery. *Curr Drug Targets*, 12(7), 967-977. doi:10.2174/138945011795677854
- Sundaram, M. V. (2006). RTK/Ras/MAPK signaling. *WormBook*, 1-19. doi:10.1895/wormbook.1.80.1
- Tilman, C., & Kimble, J. (2005). Cyclin D regulation of a sexually dimorphic asymmetric cell division. *Dev Cell*, 9(4), 489-499. doi:10.1016/j.devcel.2005.09.004
- Vaid, S., Ariz, M., Chaturbedi, A., Kumar, G. A., & Subramaniam, K. (2013). PUF-8 negatively regulates RAS/MAPK signalling to promote differentiation of *C. elegans* germ cells. *Development*, 140(8), 1645-1654. doi:10.1242/dev.088013
- Ward, S., & Carrel, J. S. (1979). Fertilization and sperm competition in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 73(2), 304-321. doi:10.1016/0012-1606(79)90069-1
- Whelan, J. T., Hollis, S. E., Cha, D. S., Asch, A. S., & Lee, M. H. (2012). Post-transcriptional regulation of the Ras-ERK/MAPK signaling pathway. *J Cell Physiol*, 227(3), 1235-1241. doi:10.1002/jcp.22899
- Yoo, A. S., Bais, C., & Greenwald, I. (2004). Crosstalk between the EGFR and LIN-12/Notch pathways in *C. elegans* vulval development. *Science*, 303(5658), 663-666. doi:10.1126/science.1091639
- Zarkower, D. (2006). Somatic sex determination. *WormBook*, 1-12. doi:10.1895/wormbook.1.84.1