



Sistem Biyolojisi Bakışı İle Farklı Seviyelerde Biyolojik Moleküller Üzerinden Prostat Kanseri İçin İlaç Repozisyonu Uygulamaları

Program Kodu: 1001

Proje No: 117S489

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Kazım Yalçın ARĞA

Araştırmacılar:

Dr. Öğr. Üyesi Filiz KISAAYAK ÇOLLAK
Dr. Öğr. Üyesi Can ERZİK

Danışman:

Dr. Öğr. Üyesi Ümmühan DEMİR

Bursiyer(ler):

Dr. Esra Münire AYDOĞMUŞ
Gizem GÜLFİDAN
Hande BEKLEN

EYLÜL 2020
İSTANBUL



ÖNSÖZ

Prostat kanseri hem dünyada hem de ülkemizde en çok rastlanan kanser türlerinden biridir. Hastalığın tedavisi sırasında kullanılan majör ilaçlar, diğer anti-kanser ajanlar gibi DNA hasarına yol açmakta ve sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Dolayısıyla, etkinliği ve özgünlüğü yüksek ilaçların geliştirme çalışmalarına devam edilmektedir. Öte yandan, başka hastalıklarda kullanılan, FDA onaylı, etki mekanizmaları iyi tanımlanmış ilaçların kanserlerde etkinliğini araştırmak, yeni bir ilaç geliştirmek için harcanacak olan milyon dolarlar mertebesinde para ve on yıla yakın bir zamandan tasarruf edilmesi sağlamaktadır. Bu doğrultuda, projemiz, hem hesaplamalı sistem biyolojisi yaklaşımlarının tıp ve farmakoloji alanlarına uygulandığı hem de bulguların *in vitro* deneylerle doğrulanmasını hedefleyecek şekilde kurgulanmıştır. Prostat kanserinde ilaç repozisyonu hedefiyle gerçekleştirdiğimiz projede, prostat kanserinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına olanak sağlayacak işaretçi moleküllerin tespit edilmesi, bu işaretçi molekülleri hedef alan mevcut ilaçların belirlenmesi ve aday olarak önerilen ilaçların prostat kanserine olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Multidisipliner nitelikteki proje çalışmaları, Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Bölümü, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Bölümü ve İstanbul Medeniyet Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Proje çalışmaları Dr. Beste Turanlı'nın doktora tezinin önemli bir bölümünü oluşturmuştur. Dr. Beste Turanlı TÜBİTAK BİDEB bursiyeri olması sebebiyle proje ekibinde bursiyer olarak yer alamamış, ancak projedeki tüm iş paketlerinde aktif görevler üstlenmiştir. Projemiz TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu (SBAG) tarafından 1001 programı kapsamında 117S489 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	6
3.1 Transkriptom (gen ekspresyon) veri setlerinin eldesi	6
3.2 Biyolojik ağların kurulumu	6
3.2.1 İnsan protein-protein etkileşim ağı kurulumu.....	6
3.2.2 İnsan transkripsiyon düzenleyici ağı kurulumu	6
3.2.3 İnsan metabolik ağı kurulumu	7
3.3 mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genlerin tespit edilmesi	7
3.4 Genlerin isimlendirilmesi.....	8
3.5 Farklı biyolojik seviyelerdeki işaretçi moleküllerin tespiti	8
3.5.1 İşaretçi reseptörlerin tespiti.....	8
3.5.2 İşaretçi transkripsiyon faktörlerinin ve miRNA'ların tespiti	8
3.5.3 İşaretçi metabolitlerin tespiti	9
3.5.4 Merkezi nitelikteki hub proteinlerin tespiti.....	9
3.5.5 Gen ve protein setlerinin işlev zenginleştirme analizi	10
3.5.6 Metabolitlerin işlev zenginleştirme analizi	10
3.6 Aday ilaçların belirlenmesi	10
3.6.1 Mevcut ilaç repozisyonu web araçları ile aday ilaçların belirlenmesi	10
3.6.2 Prostat kanserine özgü genom ölçekli metabolik model üzerinden ilaç repozisyonu.....	11
3.7 Kullanılan hücre hatları	11
3.8 Besiyerleri ve hücre kültürü	12
3.9 İlaçların IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi ve sitotoksosite analizi	12
3.10 Kaspaz aktivasyonları ile aday ilaçların Apoptotik etkisinin belirlenmesi	13
3.11 Migrasyon ve invazyon analizleri	14
3.12 Monolayer koloni oluşumunun araştırılması.....	14
3.13 Soft agarda koloni oluşumunun araştırılması	15

4. BULGULAR.....	16
4.1 Prostat kanser verilerinin meta-analizi ile hastalık ile ilişkili transkriptlerin tespiti	16
4.1.1 Transkriptom (gen ekspresyon) veri setlerinin eldesi	16
4.1.2 Biyolojik ağların kurulumu.....	16
4.1.3 mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genler	17
4.2 Farklı biyolojik seviyelerdeki işaretçi moleküller ve ilgili biyolojik süreçler	18
4.2.1 İşaretçi reseptörler	18
4.2.2 İşaretçi transkripsiyon faktörleri ve miRNA'lar	19
4.2.3 İşaretçi metabolitler	20
4.2.4 Merkezi nitelikteki hub proteinler	21
4.2.5 İşaretçi gen ve proteinler ile ilişkili biyolojik süreçler.....	21
4.2.6 İşaretçi metabolitlerin ilişkili olduğu yollar.....	23
4.3 Hedef ilaçların belirlenmesi.....	24
4.3.1 Mevcut web araçları kullanılarak gerçekleştirilen ilaç repozisyonu çalışmaları.....	24
4.3.2 Prostat kanserine özgü genom ölçekli metabolik model üzerinden ilaç repozisyonu.....	26
4.3.3 İlaç repozisyonu sonuçlarının kapsamlı değerlendirilmesi ile ilaç adaylarına karar verilmesi	33
4.4 Aday ilaçların prostat kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkisinin araştırılması.....	34
4.4.1 Hedef ilaçlara yönelik deneysel çalışmaların tasarımı.....	34
4.4.2 İlaçların IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi	35
4.4.3 Alamar Blue yöntemi ile sitotoksitenin değerlendirilmesi	39
4.5 Kaspaz aktivasyonları ile aday ilaçların Apoptotik etkisinin belirlenmesi	42
4.5.1 İfenprodil'in Kaspaz 3/7, 8 ve 9 aktivasyonu ile Apoptotik etkisinin araştırılması..	44
4.5.2 Hydroflumethiazide'in Kaspaz 3/7, 8 ve 9 Aktivasyonu ile Apoptotik etkisinin araştırılması.....	46
4.6 Aday ilaçların prostat kanseri hücre hatlarında migrasyon ve invazyon davranışlarına etkisinin araştırılması	49
4.7 Aday ilaçların hücre hatlarında monolayer koloni oluşumuna etkisinin araştırılması	53
4.8 Aday ilaçların soft agarda koloni oluşumuna etkisinin araştırılması.....	56
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ	68
KAYNAKLAR LİSTESİ.....	70

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışma kapsamında analiz edilen prostat kanserine ait transkriptom veri setleri ...	16
Tablo 2. Analiz edilen prostat kanserine ait transkriptom veri setlerinde hastalık durumuna göre anlatımı değişen genlerin sayısı ve anlatımda azalma/artma durumları ($p<0.01$).....	18
Tablo 3. Prostat kanserine ait hub protein-TF-miRNA üçlüsü	20
Tablo 4. Prostat kanserine ait mRNA seviyesinde değişiklik gösteren genlerin yer aldığı moleküler yollar	22
Tablo 5. Prostat kanserine ait mRNA seviyesinde değişiklik gösteren genlerin yer aldığı biyolojik süreç bilgileri.....	23
Tablo 6. Prostat kanserine ait işaretçi metabolitlerin yer aldığı moleküler yollar bilgileri	23
Tablo 7. Kamuya açık web tabanlı ilaç repozisyonu araçları.....	24
Tablo 8. Aday ilaçların prostat kanser hücre hatlarında belirlenen IC50 değerleri.....	37
Tablo 9. İfenprodil uygulanan hücrelerde IC50 değerleri.....	37
Tablo 10. Hydroflumethiazide uygulanan hücrelerde IC50 değerleri.....	38
Tablo 11. Azlocillin uygulanan hücrelerde IC50 değerleri	38
Tablo 12. Sulfamethoxypyridazine uygulanan hücrelerde IC50 değerleri.....	38
Tablo 13. Zenarestat uygulanan hücrelerde IC50 değerleri	39
Tablo 14. Hücrelerin ifenprodil ve hydroflumethiazide için 24 saat inkübasyonda IC50 değerleri	44
Tablo 15. Kaspaz ölçümlerinde kullanılmak üzere RWPE-1 için revize edilen doz değerleri.....	44
Tablo 16. Kaspaz 3/7, 8 ve 9 için spektral dalga boyları	44
Tablo 17. Kullanılan ilaçların IC50 değerleri	51

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Prostat kanseri için protein-protein etkileşim ağı kurulumu ve analiz sonuçları.....	22
Şekil 2. Prostat kanserinde ilaç repozisyonu amacıyla farklı web-tabanlı araçlar kullanılarak gerçekleştirilen benzetimlerin değerlendirilmesi.....	26
Şekil 3. In silico modelleme sonuçları ve prostat kanserinde anahtar yolaklardan biri olarak streoid biyosentezi yolağı.....	30
Şekil 4. İlaç repozisyonunda takip edilen yol ve ara sonuçlar.....	32
Şekil 5. Tespit edilen aday ilaçlar.....	33
Şekil 6. İfenprodil konsantrasyonlarının, prostat kanseri hücre hatlarında Alamar Blue absorpsiyon sonuçlarına göre 24 ve 48. saat % hücre canlılık grafikleri	40
Şekil 7. Hydroflumethiazide konsantrasyonlarının, prostat kanseri hücre hatlarında 24 ve 48. saat % hücre canlılık grafikleri	41
Şekil 8. Azlocillin konsantrasyonlarının, prostat kanseri hücre hatlarında 24. saat % hücre canlılık grafikleri.....	41
Şekil 9. Sulfamethoxypyridazine konsantrasyonlarının, prostat kanseri hücre hatlarında 24. saat % hücre canlılık grafikleri	42
Şekil 10. Zenarestat konsantrasyonlarının, prostat kanseri hücre hatlarında 24. saat % hücre canlılık grafikleri.....	42
Şekil 11. Apoptozun hücre içi ve hücre dışı yolaklarının basit şematik gösterimi	43
Şekil 12. RWPE-1 hücre hattında 24 saat ve 48 saat İfenprodil inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler	45
Şekil 13. PC-3 hücre hattında 24 saat ve 48 saat İfenprodil inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler	45
Şekil 14. 22RV1 hücre hattında 24 saat ve 48 saat İfenprodil inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler	46
Şekil 15. LNCaP hücre hattında 24 saat ve 48 saat İfenprodil inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler	46
Şekil 16. RWPE-1 hücre hattında 24 saat ve 48 saat Hydroflumethiazide inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler.....	47
Şekil 17. PC-3 hücre hattında 24 saat ve 48 saat Hydroflumethiazide inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler.....	48
Şekil 18. 22RV1 hücre hattında 24 saat ve 48 saat Hydroflumethiazide inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler.....	48
Şekil 19. LNCaP hücre hattında 24 saat ve 48 saat Hydroflumethiazide inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler.....	49

Şekil 20. Transwell migrasyon analizi (Boyden chamber analizi). Hücrenin membrandaki pordan geçişi gösterilmektedir.....	50
Şekil 21. Transwell sistemin şematik gösterimi ve deney sisteminde besiyeri içerikleri. İnvazyon analizi için membran matrijel ile kaplanırken, migrasyon analizleri için hücreler membrana direkt ekildi.....	51
Şekil 22. İstatistiksel olarak analiz edilen koloni sayısı CFU (colony forming unit) değerlerinin grafikte gösterimi.....	55
Şekil 23. Koloni boyutlarında meydana gelen değişimlerin istatistiksel analizinin grafikte gösterimi..	58
Resim 1. İnvazyon ve migrasyon sonrası inserti geçen hücrelerin gemesa ile boyandıktan sonra ters ışık mikroskobunda elde edilen görüntüleri.....	53
Resim 2. Kristal viyole ile boyanmış koloni görüntüleri.....	55
Resim 3. Soft agarda oluşan kolonilerin ters ışık mikroskobu altında görüntüleri..	57

ÖZET

Prostat kanserinde farklı biyolojik seviyelerden moleküller üzerinden ilaç repozisyonu yapmayı amaçlayan proje çalışmaları kapsamında, sistem biyolojisi yaklaşımı altında prostat kanserinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına olanak sağlayacak işaretçi moleküller tespit edilmiş, çeşitli ilaç repozisyonu yaklaşımları kullanılarak bu işaretçi molekülleri hedef alan mevcut ilaçlar belirlenmiş ve ilgili literatür ışığında aday olarak önerilen ilaçların *in vitro* seviyede klinik açıdan önemli farklı özellikler gösteren üç prostat kanser hücre hattı (LNCaP, PC3 ve 22Rv1) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu doğrultuda, transkriptom verisetlerinin meta-analizi ve biyolojik ağlarla bütünleştirilmesi neticesinde, anlatımı istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) derecede değişen 6737 mRNA ile prostat kanserine özgü işaretçi moleküller olarak 4 transkripsiyon faktörü, 134 miRNA, 127 metabolit ve 51 hub protein belirlenmiştir. Potansiyel ilaç hedefi olarak tespit edilen işaretçi moleküller kullanılarak çeşitli ilaç repozisyonu yaklaşımları uygulanmış ve prostat kanseri tedavisinde aday olarak değerlendirilmek üzere çeşitli ilaç molekülleri tespit edilmiştir. Bu aşamada, prostat kanserine özgü bir genom-seviyeli metabolik model literatürde ilk kez bu proje kapsamında oluşturulmuştur. Aday ilaçların etkinliğinin ilgili literatür ve ileri biyoinformatik analizler yardımıyla değerlendirmeleri neticesinde farklı endikasyonlarda kullanılan beş ilaç (sülfametoksipiridazin, azlosilin, morantel, hidroflumetiyazide ve ifenprodil) ön plana çıkmıştır. Gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksisite analizler neticesinde ifenprodil ve hidroflumetiazide uygulamalarında kanser hücre hatlarında yüksek seviyede sitotoksisite gözlemlenirken, kontrol grubu hücre hattında (RWPE1) istatistiksel olarak anlamlı bir etki gözlemlenmemiştir. Ayrıca, ilaçların kaspaz 3/7, 8 ve 9 aktivasyonu ile apoptotik etkisinin incelenmesi sonucu, kaspaz seviyelerinde anlamlı artışlar gözlemlenmiş; gerçekleştirilen migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma testlerinde, hidroflumetiazide ve ifenprodil uygulamasının hücrelerin bu davranışlarını baskıladıkları tespit edilmiştir. Özellikle ifenprodil'e maruziyetin çalışılan tüm hücre hatlarında migrasyon, invazyon ve koloni oluşturma davranışları üzerinde oldukça yüksek bir engelleyici etkisi olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, iki ilacın, özellikle de ifenprodil'in, prostat kanserinin tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırılması için yapılacak ileri prelinik çalışmalara (*in vivo* hayvan deneyleri) önemli bir dayanak oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: prostat kanseri, ilaç repozisyonu, sistem biyolojisi, ifenprodil

ABSTRACT

Within the scope of the project which aims to make drug repositioning in prostate cancer over molecules from different biological levels, reporter molecules that will enable the enlightenment of the molecular mechanisms of prostate cancer under the system biology approach have been identified, existing drugs targeting these reporter molecules have been determined using various drug repositioning approaches and proposed as candidates in the light of the relevant literature. The effects of the proposed drugs on three prostate cancer cell lines (LNCaP, PC3 and 22Rv1) with different clinically important properties at the *in vitro* level were studied. In this direction, as a result of meta-analysis of transcriptome datasets and integration with biological networks, 6737 mRNAs whose expression varied statistically significantly ($p < 0.01$) were determined as reporter molecules specific to prostate cancer as well as 4 transcription factors, 134 miRNA, 127 metabolites and 51 hub proteins. Various drug repositioning approaches have been applied using reporter molecules identified as potential drug targets, and various drug molecules have been identified to be evaluated as candidates in the treatment of prostate cancer. At this stage, a genome-level metabolic model specific to prostate cancer has been created for the first time in the literature within the scope of this project. As a result of evaluating the effectiveness of candidate drugs with the help of relevant literature and advanced bioinformatics analysis, five drugs (sulfamethoxypyridazine, azlocillin, morantel, hydroflumethiazide and ifenprodil) used for different indications came into prominence. As a result of the *in vitro* cytotoxicity analyzes performed, a high level of cytotoxicity was observed in cancer cell lines in ifenprodil and hydroflumethiazide applications, while no statistically significant effect was observed in the control group cell line (RWPE1). In addition, as a result of examining the apoptotic effect of drugs with caspase 3/7, 8 and 9 activation, significant increases were observed in caspase levels; in the migration, invasion and colony formation tests, it was determined that hydroflumethiazide and ifenprodil suppressed these behaviors of cells. In particular, exposure to ifenprodil was found to have a very high inhibitory effect on migration, invasion and colony forming behaviors in all studied cell lines. The results obtained form an important basis for further preclinical studies (*in vivo* animal experiments) to be conducted to investigate the usability of the two drugs, especially ifenprodil, in the treatment of prostate cancer.

Keywords: prostate cancer, drug repositioning, systems biology, ifenprodil

1. GİRİŞ

Prostat kanseri hem dünyada hem de ülkemizde en çok rastlanan kanser türlerinden biridir. Hastalığın tedavisi sırasında kullanılan majör ilaçlar, diğer anti-kanser ajanlar gibi DNA hasarına yol açmakta ve sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Şimdiye kadar yapılan ilaç repozisyon denemelerinde, ilaçların etki ettikleri moleküler mekanizmalara göre kanser hücre hatlarında denendiği görülmektedir.

Gerçekleştirilen projenin temel amacı; prostat kanserinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına olanak sağlayacak işaretçi molekülün tespit edilmesi, bu işaretçi molekülü hedef alan mevcut ilaçların belirlenmesi ve aday olarak önerilen ilaçların prostat kanserine olan etkisinin incelenmesidir. Başka hastalıklarda kullanılan, FDA onaylı, etki mekanizmaları iyi tanımlanmış ilaçların prostat kanserinde etkinliğini araştırma çalışmamızda, yeni bir ilaç geliştirmek için harcanacak olan milyon dolarlar mertebesinde para ve on yıla yakın bir zamandan tasarruf edilmesi hedeflenmiştir.

Bu amaç ve hedefler doğrultusunda projenin birinci aşamasında, sistem biyotıp yaklaşımı altında işlevsel genomik verilerinin genom-boyutlu biyolojik ağlarla bütünleştirilmesi ile farklı biyolojik düzeyde işaretçi molekül (gen, metabolit, transkripsiyon faktörü, enzim ve diğer proteinler), işlevsel biyolojik süreç ve yollar tespit edilmiştir. Bu sayede olası ilaç hedefleri belirlenmiştir. İkinci aşamada çeşitli ilaç repozisyonu teknikleri kullanılarak aday ilaçlar tespit edilmiştir. Üçüncü ve son aşamada ise, belirlenen aday ilaçlar hücre kültürüne alınmış ve ilaçların moleküler düzeyde etkisi deneysel yöntemlerle doğrulanmıştır. Böylece, prostat kanseri tedavisine yönelik protein ve metabolit düzeyinde aday biyobelirteçler ve ilaç hedefleri belirlenmiş, prostat kanser tedavi süreçlerinin geliştirilmesi için bilgisayar tabanlı analizler aracılığıyla, çeşitli ilaç hedefi sunan hipotezler ortaya konmuş, prostat kanserinde kullanılması önerilen hedef ilaçlar, *in vitro* olarak denenmiş ve prostat kanser hücre hatlarında etki mekanizmaları moleküler düzeyde aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Gerçekleştirilen proje hem sistem biyolojisi yaklaşımlarının tıp ve farmakoloji alanlarına uygulandığı hem de *in vitro* deneylerle doğrulanmasını hedeflediği için bilgisayar tabanlı ve de deneysel bir çalışma olarak tamamlayıcı niteliktedir. Projede kullanılan yöntem ve bulgular, tedaviye yönelik çıktılarının yanı sıra, yeni ve doğru tanı ve teşhis yöntem ve araçlarının geliştirilmesi doğrultusunda da yön sunmakta ve gelecekte karmaşık insan hastalıklarına yönelik kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımları tasarlanmasında yardım potansiyeli taşımaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalması olarak tanımlanan kanser, günümüzdeki en büyük sağlık sorunlarından biridir. Uluslararası Kanser Ajansı tarafından yayınlanan 2020 yılı için yeni kanser tahminlerine - GLOBOCAN'e - göre 2019 yılında Dünya'da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur. Dünya'da en çok tanı konulan kanserler akciğer, meme ve kolon iken, kanserden ölümlerin ise en çok akciğer, karaciğer ve mide kanserlerinden dolayı gerçekleştiği belirtilmiştir. Kanser artış hızının bu şekilde devam etmesi durumunda ise, Dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası olacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca istatistiksel analizler, gerek kanser vakalarının gerekse de kanserden kaynaklanan ölümlerin yarısından fazlasının az gelişmiş ülkelerde olduğu göstermiştir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı'nın yayınladığı en son resmi verilere göre ülkemizde her yıl yaklaşık 97 bin erkek, 62 bin kadın ve toplamda 159 bin kişi kansere yakalanmaktadır (Türk Halk Sağlığı Kurumu, 2015). Türkiye'de en sık görülen kanser türlerinde ise prostat, akciğer, meme, tiroid ve sindirim sistemi ilişkili (mide, mesane) kanserler gözlenmektedir.

Çok faktörlü kompleks bir hastalık olan kanser, genetik mutasyonların ve çevresel etkenlerin işe karıştığı genetik, proteomik ve hücresel bir hastalıktır. Özellikle kanser gibi kompleks hastalıklarda hastalığın sebebini tek bir duruma indirgemek olası değildir. Yapılan birçok deneysel araştırmanın yanı sıra, gelişen teknoloji ile daha hassas ve geniş ölçekte analizlerin yapılabilmesi de gen, mRNA, protein veya metabolit seviyesinde bilgi birikiminin ivmeyle artışı sağlamıştır. Bu anlamda omik teknolojilerinin uygulamaları, özellikle sağlık sektöründe yeni görüşlerinin önünü açmış olup, moleküler araştırma alanında yeni bir yaklaşım oluşturmuştur. Genomik, proteomik, sitomik, metabolomik, interaktomik ve gelişen diğer omik teknolojilerinin pek çok hastalık türünde olduğu gibi kanser araştırmalarında ve kişiselleştirilmiş ilaç araştırmalarında da kullanımı hızla artmaktadır. Farklı düzeylerde omik teknoloji tanımı oluşmasına rağmen temel olarak genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik omik kaskat olarak anılmaktadır. Omik kaskatta elde edilen ve artan bir bilgi birikiminin olması, bunların geniş bir çerçevede ele alınabilmesi ve sistematik bakış açısının uygulanabilmesi için bilgisayar tabanlı analizlerin yani biyoinformatik ve sistem biyolojisinin kullanımını da son zamanlarda arttırmıştır. Farmakoloji ve tıp alanında sistem biyolojisi ilkelerin uygulanması anlamına gelen "sistem tıp ve farmakoloji" terimi ise, ilk olarak Çin ve Batı Tıbbi Ulusal Konferansı'nda, 1992 yılında B.J. Zeng tarafından ifade edilmiştir. Son zamanlardaki teknolojik gelişmelere bağlı olarak, farklı biyolojik seviyelerde omik veriler hızla birikmeye başlamış ve kamuya açık veri kaynaklarında toplanmıştır (Bradlow ve Carruba,

2011). Bunlara ek olarak, hastalıklarla ilişkili bilgilerin analizi için gerekli algoritmaların ve modelleme yöntemlerinin geliştirilmiş olması, biyoloji, translasyonel tıp ve ilaç endüstrisi gibi birçok alanda çok büyük önem arz etmektedir. Böylece tanı, prognoz, ya da tedaviye yanıt için yeni biyobelirteçler bulmanın önünü açan ve/veya hastalık mekanizmalarının anlaşılmasını sağlayan sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Özellikle kanser gibi karmaşık hastalıklar, birden çok faktöre bağlı olarak oluştuğu ve ilerlediği için biyolojik mekanizmaların aydınlatılmasında, bilimsel gelişmeler önem taşımaktadır (Bradlow ve Carruba, 2011; Menezes vd, 2009).

Hastalıklarla genler arasındaki ilişki çok tartışılan konulardan biridir. Bu nedenle, “Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)” (Hamosh vd., 2005) ve “Genetic Association Database (GAD)” (Becker vd., 2004) gibi gen ve hastalıklar arasında kuvvetli bağlantılar kurmaya çalışan önemli veri bankaları geliştirilmiştir. Bu veri bankalarının her biri fenotip-genotip ilişkisine farklı açılardan odaklanmıştır. Bu veri bankalarının bütünleştirilmesi ile oluşturulan DisGeNET ise hastalık-gen ilişkisini hem farklı veri bankalarından toplamış hem de literatürden araştırmıştır. Sonuç olarak, 17181 gen ve 14619 hastalık arasında 429111 ilişkidir bahsedilmektedir (Piñero vd., 2015). Biyomedikal çalışmalarda en büyük amaçlardan biri de karmaşık hastalıkların temelinde yatan mekanizmaların ortaya çıkarılmasıdır. Fakat birçok kez görüldüğü üzere çevresel risk faktörler ve genetik varyanslar düşünüldüğünde, çoğu insan hastalığını tek bir gen ile ilişkilendirmek mümkün değildir (Hirschhorn ve Daly, 2005). Bu anlamda geniş ölçekte ve bütünleştirici özellikte çalışmalar büyük önem arz etmektedir. Kanser araştırmalarında en büyük projelerden biri olan “The Cancer Genome Atlas (TCGA)” pilot fazda ilk olarak akciğer, beyin (glioblastoma) ve over kanseri ile ilgili çalışmalarla başlamış ve şu an kanser progresyonu ile ilişkili biyobelirteçleri ve süreçleri bulmayı amaçlayan çok sayıda bütünleştirici çalışmadan oluşmaktadır (The Cancer Genome Atlas, 2015).

Hastalıklarla ilişkili verilere ulaşılması ve modellenmesi ile ilgili yöntemler, biyoloji, translasyonel tıp ve farmasötik endüstri gibi birçok alanda büyük önem arz etmektedir. Yeni tedavi ajanlarının geliştirilmesinin önünü açan, teşhis, prognoz ya da tedaviye yanıt için yeni biyobelirteçlerin bulunması, hastalığın mekanizmasının anlaşılma potansiyelini arttırmaktadır. Hastalıklar birden çok faktöre bağlı oldukları için, biyolojik mekanizmaların çözülmesine olanak sağlayan ilerlemeler hem zorlu hem de merak uyandırıcıdır. Omik verilerin incelendiği bilgisayar tabanlı analizler kanser hücrelerinin; gen, transkript, protein, metabolit düzeyinde incelemesi ve yeni ilaç hedefleri araştırmalarında beklenmeyen yan etkiler için ilaç etkileşim mekanizmalarının tanımlanmasında, güncel ilaç hedeflerinin validasyonunda, yeni

biyobelirteçlerin tanımlanmasında, yeni ilaçların potansiyel uygulamalarının araştırılmasında güçlü ve önemli bir potansiyel yaratmıştır (Civelek ve Lusi, 2014).

Farmasötik endüstrisinde, yaşam bilimleri ve teknolojiye gelişmelere rağmen kabul gören yeni ilaçların sayısının, artan yatırım maliyetlerine kıyasla giderek azaldığı gözlenmektedir. Farmasötik endüstrisindeki Ar&Ge yatırımlarının milyonlarca dolara mal olduğu ve bir ürünün piyasaya çıkmasının ortalama 9-14 yıl arasında zaman gerektirdiği belirtilmektedir. Bu gibi problemlerin üstesinden gelebilmek için ise son zamanlarda, ilaç repozisyonu üzerine yoğun çalışmalar başlamıştır. İlaç repozisyonu, bir hastalık veya bir hastalık belirtisi için geliştirilme aşamasında veya piyasada hali hazırda kullanılmakta olan ilaçların, yeni klinik belirtiler için de kullanılabilirliğinin araştırılması anlamına gelmektedir (Li vd., 2015; Shim ve Liu, 2014).

İlaç repozisyon çalışmalarında kullanılan temel bilgi, gen-ilaç ilişkileridir. Bunun yanında ilaç ve etki mekanizması ile ilgili temel bilgilerin de var olması büyük önem taşımaktadır. Son birkaç yıl içerisinde, rapor edilen gen-ilaç ilişki sayısı gittikçe artmış ve bu bilgiler veri bankalarında toplanmaya başlanmıştır. En geniş ilaç veri bankaları DrugBank (Law vd., 2014), PharmGKB (Hewett vd., 2002) ve son olarak, 15 farklı veri bankasından gen-ilaç ilişkisi bilgisini alan DGIdb 2.0 (Wagner vd., 2016) en geniş bilgiyi sunmaktadır. Bu verilerin bazıları klinik, bazıları ise hücre kültürü çalışmalarından elde edilmiştir. İlaçların gen ekspresyonunu nasıl etkilediğini gösteren en geniş kapsamlı çalışma, Connectivity Map, çoğunluğu FDA onaylı 164 ilacı, dört kanser hücre hattı üzerinde denemiş ve 6 saat sonundaki gen ekspresyonundaki değişikliği incelemiştir (Lamb vd., 2006). Hangi ilaçların hangi hastalıklar için hedef olabileceği ise artık biyoinformatik temelli yöntemlerle belirlenmeye çalışılmaktadır. Sistem ve ağ yaklaşımları yoluyla, ilaç-hedef komponent etkileşimini inceleyen hesaplamalı yöntemler geliştirilmektedir. Bu yeni yaklaşımlar, büyük ölçekli ve yüksek işlem hacimli verileri kullanarak, ilaç ve kimyasal yapıların yapıları (Keiser vd., 2009), yan etkiler (Yang ve Agarwal, 2009), ilaç tedavisi sonrası transkripsiyonel değişimler (Hu ve Agarwal, 2009) gibi bir çok başlığı incelemekte ve ilişkilendirebilmektedir. Sonuç olarak, hesapsal biyoloji ile uğraşan bilim insanları için var olan bir ilacın başka bir hastalık için de kullanılabileceği hipotezinin sunulduğu, sistematik araştırmalar ortaya koymak büyük önem taşımaktadır.

İlaçların klinik denemelerde oluşan beklenmedik yan etkileri ve zayıf insan farmakokinetiği, piyasaya sürülen yeni ilaç sayısının yıldan yıla azalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle, ilaç repozisyonu; güvenilirliği ve farmakokinetik olarak iyi bir özelliğe sahip olmasıyla kanıtlanmış ilaçların, yeni hastalıklar üzerinde keşfi için oldukça faydalı bir yaklaşımdır (Banno vd., 2015). İlaç repozisyonu kavramı, Avrupa'da ve Birleşik Devletler'de yaygın

olmasına rağmen, Asya bölgesinde pek bilinmemektedir. Avrupa'da ve Birleşik Devletler'de 2001 yılında yalnızca 1 adet ilaç üretilirken; 2009'da ilaç repozisyonu yaklaşımı ile FDA tarafından onaylanan 6 adet ilaç üretilmiştir (Banno vd., 2015).

İlaç repozisyonu için yöntemler, özellikle kanser hastalıkları için de kullanılmaktadır. Şu ana kadar, aslında başka hastalıklar için kullanılmakta olan ve bilinen bazı ilaçların, prostat kanseri tedavisinde kullanılabileceği rapor edilmiştir. Bunların başlıcaları; Itracanazole, Nelfinavir, Digoxin ve Metformin'dir (Shim ve Liu, 2014; Zhang vd., 2008; Platz vd., 2011; Mayer vd. 2015). Mantar enfeksiyonu tedavisinde kullanılan Itracanazole, Hedgehog sinyal yolağını inhibe etmesi ve insan umbilikal venlerinden elde edilen endotel hücrelerin çoğalmasını inhibe ederek anti-anjiyojenik aktivite göstermesi sebebiyle prostat kanseri için aday ilaç olarak sunulmuştur (Shim, ve Liu, 2014). HIV enfeksiyonu tedavisinde kullanılan Nelfinavir ise 20S proteazom, AKT sinyalini, HSP90 ve HER2 sinyalini inhibe etmesi sebebiyle prostat kanseri tedavisi için bir başka aday olarak gösterilmiştir (Shim ve Liu, 2014). Kalp hastalıkları tedavisinde kullanılan Digoxin ile Tip2 diyabet tedavisinde kullanılan Metformin'in mitokondride oksidatif fosforilasyonu ve ATP oluşumunu inhibe ederek prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği rapor edilmiştir (Platz vd., 2011; Mayer vd. 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Transkriptom (gen ekspresyon) veri setlerinin eldesi

Prostat kanserine ait, iki fenotipte (sağlıklı vs. hastalıklı) örnekler içeren transkriptom veri setleri için NCBI-Gene Expression Omnibus (NCBI-GEO) (Barrett ve Edgar, 2006), ArrayExpress (Brazma vd., 2003) ve The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://cancergenome.nih.gov/>) gibi kamuya açık veri bankaları taranmıştır. Örneklerin herhangi bir uygulamaya veya ajana maruz kalmamış veya tedavi görmemiş olması ve her grupta (sağlıklı/hastalıklı) en az 3 örneğin bulunması dikkate alınmıştır.

3.2 Biyolojik ağların kurulumu

3.2.1 İnsan protein-protein etkileşim ağı kurulumu

Protein-protein etkileşimleri (PPI) çeşitli deneysel metotlarla tanımlanmış ve farklı veri bankalarında toplanmıştır. Fakat var olan tüm PPI verileri düşünüldüğünde verideki kirliliğin giderilmesi ve daha güvenilir bir veri elde edilmesi gerekmektedir. Proteinler arasındaki ikili ilişkiler düşünüldüğünde güvenilirliği yüksek ve insan protein-protein ağının tamamına yakınına kapsayan bir ağ olmadığı görülmüştü. O sebeple; protein-protein ilişkisi sunan 6 farklı veri bankasından (BioGRID, DIP, IntAct, HIPPIE, HomoMINT, HPRD) elde edilen veriler, 8 maddeye dayalı bir skorlama sonrası analiz edilerek (Şekil 2), toplam 15950 protein arasında 295288 etkileşim bulunmuştur. Bu etkileşimler arasından, 13213 protein arasındaki 147923 ikili etkileşimin yüksek güvenilirlikte olduğu görülmüş ve yakın zamanda güvenilir bir protein-protein etkileşim ağı olarak araştırma grubumuzca literatüre sunulmuştur (Karagoz vd., 2016). Bu projede, araştırma grubumuz bünyesinde oluşturulan yüksek güvenilirlikli protein-protein etkileşim ağı kullanılmıştır (Karagoz vd., 2016).

3.2.2 İnsan transkripsiyon düzenleyici ağı kurulumu

Mevcut projede, geçmişte oluşturulan miRNA-gen ve TF-gen ilişkilerini kapsayacak nitelikte bir bütünleşik transkripsiyon düzenleyici ağı (Gov ve Arga, 2016) güncellenerek kullanılmıştır. Bu kapsamda, tamamı deneysel yöntemlerle elde edilmiş TF-gen ve miRNA-gen ilişkileri Regnetwork, PAZAR, Trtrust, Tfacts, HTRIdb, iRegulon, miRTarBase, TransmiR miRecords, Starbase ve miRDB veri bankalarından toplanmış ve yeni bir bütünleşik transkripsiyon düzenleyici ağı kurulmuştur.

3.2.3 İnsan metabolik ağı kurulumu

The Human Metabolic Reaction Model (HMR) insana özgü genom boyutlu metabolik model olarak tasarlanmıştır. Literatürde bulunan generik genom boyutlu metabolik modeller iHuman1512, Recon 1, Edinburgh model (EHMN) ve hücre spesifik genom boyutlu metabolik modeller, iAdipocytes1809 ve HepatoNET1 birleştirilmiş ve yolizi-reaksiyonlara ait bilgiler KEGG, Reactome, LipidMap, HumanCyc gibi veri bankalarından alınarak bu model oluşturulmuştur. Modelin son sürümü olan HMR2, 3765 gen ile ilişkilendirilmiş, 8000'den fazla reaksiyon ve 3000'den fazla metabolitten oluşmaktadır (Mardinoglu vd. 2014). Model istenilen formatta indirilip kullanılabildiği gibi, BIOMET gereci kullanılarak da çevrim-içi analiz imkânı sunmaktadır. Mevcut projede, The Human Metabolic Reaction (HMR) modelinin son sürümü olan ve 3765 gen ile ilişkilendirilmiş 8186 tepkime ve farklı hücresel kompartımanlarda tanımlanmış 6008 metabolit bulunduran HMR2 metabolik modeli kullanılmıştır (Mardinoglu vd., 2014).

3.3 mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genlerin tespit edilmesi

Çalışma kapsamına alınan mikrodizin tabanlı veri setleri birbirinden bağımsız olarak Bioconductor (www.bioconductor.org) yazılım platformu altında RMA normalizasyon (Irizarry vd., 2003) ve mikrodizin verileri için doğrusal modeller (LIMMA) (Smyth, 2005) paketleri kullanılarak R programlama dilinde istatistiksel olarak analiz edilmiş, p-değeri 0.01'den küçük olan genler hastalıkta ekspresyonu farklılık gösteren genler (DEG) olarak belirlenmiştir.

RNA dizileme tabanlı, TCGA kaynaklı, veri seti NCBI Genome Data Commons'dan (Grossman vd., 2016) "TCGAbiolinks" R / Bioconductor paketi (Colaprico vd., 2016) kullanılarak elde edilmiştir. Transkriptom verileri, FPKM cinsine dönüştürülmüş ve medyan ekspresyon değeri $FPKM \geq 1$ kriteri kullanılarak filtrelenmiştir (Bidkhori ve diğerleri, 2018). Söz konusu transkript verileri R / Bioconductor paketi "DESeq" el kitabı kullanılarak iki fenotip arasındaki DE'ler saptanmıştır. Benjamini ve Hochberg yanlış keşif oranı kullanılarak çoklu hipotez düzeltmesi gerçekleştirilmiştir. DEG'ler FDR düzeltilmiş p değeri < 0.001 eşliğine göre filtrelenmiştir. Yukarı ve aşağı regüle edilen genleri belirlemek için 1'in kat değiştirme eşiği uygulanmıştır.

Hastalık durumunda sağlıklı duruma göre ekspresyon seviyesinin ne kadar miktarda değiştiğini ifade eden kat değişiminin sınırı en az %20 olarak belirlenerek gen anlatımındaki değişikliğin yönü (gen anlatımı artan/azalan) belirlenmiştir.

3.4 Genlerin isimlendirilmesi

Genlerin isimlendirmeleri (gen sembol, Entrez Gen ID, Ensembl ID vs.) için bioDBnet platformu (Mudunuri vd., 2009) kullanılmıştır.

3.5 Farklı biyolojik seviyelerdeki işaretçi molekülün tespiti

3.5.1 İşaretçi reseptörlerin tespiti

Fiziksel etkileşimi olan reseptörlere ait bilgi, Karagoz vd. (2016) tarafından yayınlanmış yüksek güvenilirlik skoruna sahip insan protein-protein etkileşim ağından elde edilmiştir. Kullanılan etkileşim listesinde 5501 protein kodlayan gen ve 916 reseptör protein arasında toplam 20120 etkileşim baz alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Reseptör-gen etkileşim listesindeki genler referans olarak kullanılıp, her kanser veri setindeki farklı eksprese olan genler “reporter features” algoritması vasıtasıyla skorlanmış ve işaretçi reseptörler bulunmuştur. Patil ve Nielsen (2005) tarafından yayınlanan “reporter features” algoritması, genel olarak işaretçi molekülün (reseptör, miRNA, TF vb.) hesaplanabilmesine uygun olacak şekilde MATLAB yazılımı altında grubumuzca uyarlanmıştır. İşaretçi biyomoleküllerin z-skorları hesaplanmış, sonrasında p-değerine çevrilmiştir. Hesaplanan işaretçilerin p-değerleri çoklu karşılaştırmalarda kullanılan bir doğrulama metodu olan FDR ile belirlenmiş ve p-değeri 0.05’ten küçük olanlar önemli sayılmıştır.

3.5.2 İşaretçi transkripsiyon faktörlerinin ve miRNA’ların tespiti

Deneyssel olarak kanıtlanmış TF-gen etkileşimleri, HTRId (Bovolenta vd., 2012) ve PAZAR (Portales-Casamar vd., 2009) veri bankalarından elde edilmiştir. 284 TF ve 18302 gen arasında 51871 etkileşimin olduğu HTRId veri bankasının, PAZAR veri bankasındaki etkileşimleri de içerisinde barındırdığı görülmüştür. O yüzden, HTRId tarafından sunulan TF-gen etkileşim listesindeki genler referans olarak kullanılıp; TF’ler, meta-analiz sonucu anlatımı farklılaşan genler üzerinden “reporter features” algoritması vasıtasıyla skorlanmış ve işaretçi transkripsiyon faktörleri bulunmuştur. p-değeri 0.05’ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Deneyssel olarak kanıtlanmış miRNA-gen etkileşimleri ise miRTarbase (Release 4.5) veri bankasından elde edilmiştir (Hsu vd., 2014). 2599 miRNA ve 14845 gen arasında bulunan 322134 etkileşim listesindeki genler referans olarak kullanılıp; meta-analiz sonucu anlatımı farklılaşan genler üzerinden “reporter features” algoritması vasıtasıyla miRNA’lar skorlanmış

ve işaretçi miRNA'lar bulunmuştur. İşaretçi TF'lerin tespitinde olduğu gibi, p-değeri 0.05'ten küçük olanlar önemli sayılmıştır.

Transkripsiyon faktör ve miRNA gibi transkripsiyonu düzenleyici moleküller tespit edildikten sonra, bu moleküllerin transkripsiyonunu düzenlediği genlerin kodladığı hub proteinlerle, araştırma grubumuz tarafından kurulan bütünleşik transkripsiyon düzenleyici ağ olan TF-gen, miRNA-gen ve TF-miRNA ilişkileri kullanılarak potansiyel hub protein-TF-miRNA üçlüsü kurgulanmıştır.

3.5.3 İşaretçi metabolitlerin tespiti

İşaretçi metabolitlerin tespiti için İnsan Metabolik Atlas (Human Metabolic Atlas-HMA) veri bankasında yer alan jenerik Human Metabolic Reaction (HMR 2.0) (Mardinoglu vd., 2014) modeli ile meta-analiz sonucu anlatımı farklılaşan genlerin bilgisi bütünleştirilerek, enzim kodlayan genlerin etrafındaki metabolitlere ait p-değerleri hesaplanmıştır. P-değeri 0.05'ten küçük olanlar, işaretçi metabolitler şeklinde sunulmuştur. Simülasyonların gerçekleştirilmesi için ara yüz olarak BioMet Toolbox (v2.0) (Garcia-Albornoz vd., 2014) kullanılmıştır.

3.5.4 Merkezi nitelikteki hub proteinlerin tespiti

Farklı veri bankalarındaki bilgileri kapsayan, grubumuzca oluşturulmuş olan protein-protein etkileşim ağı bu çalışmada da kullanılmıştır (Karagoz vd., 2016). Meta-analiz sonucu anlatımı farklılaşan genler ile ilişkilendirilen protein etkileşimleri tanımlanmış ve ekspresyon yönüne göre protein-protein etkileşim ağı inşa edilmiştir. Protein-protein etkileşim ağı grafik teorisi kullanılarak, yönlendirilmemiş çizgeye çevrilmiş ve $G = (V, E)$ fonksiyonu oluşturulmuştur: V proteinleri gösteren düğümleri, E proteinler arasındaki ikili etkileşimlerdeki bağıntıyı ifade etmektedir. Ağın görselleştirilmesi ve topolojik özelliklerin hesaplanması Cytoscape (Shannon vd., 2003) yazılımı ve CytoHubba (Lin vd., 2008) paketi ile yapılmıştır. Merkezi proteinlerin (çekirdek veya hub proteinler) belirlenmesi için daha önce de kullanmış olduğumuz dual-metrik topolojisi uygulanmıştır (Karagoz vd., 2015). Kullanılan lokal metrik derece (degree), global metrik ise yakınlık merkeziliğidir (betweenness centrality). Derece ağdaki bir düğüme bitişik düğüm sayısına göre tanımlanan bir ölçü iken yakınlık merkeziliği ağdaki bir düğümün diğer tüm düğümlere en kısa yoldan uzaklıklarını hesaba katan bir ölçüdür. Bu iki ölçünün birlikte değerlendirildiği dual-metrik topoloji sonrası çekirdek (hub) protein setleri belirlenmiştir.

3.5.5 Gen ve protein setlerinin işlev zenginleştirme analizi

Ekspresyonunda farklılık gösteren genlerin işlev zenginleştirme analizleri, moleküler yolak ve Gen Ontolojisi (GO) terimi olan biyolojik süreç için ConsensusPathDB gen seti zenginleştirme aracı (Kamburov vd., 2009) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde, yolaklarla ilişkili olarak KEGG, Reactome ve Biocarta veri bankalarından çekilen bilgiler tercih edilmiştir. Zenginleştirme analizlerinde p-değeri 0.05'ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.5.6 Metabolitlerin işlev zenginleştirme analizi

Tespit edilen işaretçi metabolitlere ait zenginleştirme analizi için MBRole 2.0 biyoinformatik aracı (López-Ibáñez vd., 2016) kullanılmıştır. Analizde metabolitlere ait KEGG bileşen isimleri belirlenerek bu metabolitler ile ilişkili KEGG yolakları tespit edilmiştir. P-değeri 0.05'ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.6 Aday ilaçların belirlenmesi

3.6.1 Mevcut ilaç repozisyonu web araçları ile aday ilaçların belirlenmesi

Kapsamlı bir literatür taraması yapılarak, ilaç repozisyonu amacıyla geliştirilmiş kamuya açık web tabanlı araçlar tespit edilmiştir. Daha sonra çeşitli girdiler kullanılarak bu araçlar prostat kanseri tedavisinde kullanılabilecek ilaçların tespiti için denenmiştir. Mevcut web tabanlı araçların bir bölümü tek gen/protein verisini girdi (input) olarak kabul etmektedir. Bu doğrultuda, proje kapsamında tespit edilen işaretçi mRNA ve proteinler kullanılmıştır. Öte yandan, bu araçların büyük bölümü ise girdi olarak gen veya protein setini kabul etmektedir. Bu araçlarda girdi olarak kullanılmak üzere, prostat kanseri ilişkili Kanseri Genom Atlası (TCGA) ve diğer transkriptom veri setlerinin meta-analizi ile elde edilen “anlatımı prostat kanserli dokularda önemli oranda değişen genlerin” listeleri kullanılmıştır.

3.6.2 Prostat kanserine özgü genom ölçekli metabolik model üzerinden ilaç repozisyonu

Projede, prostat kanseri metabolizmasını araştırmak ve aynı zamanda etkili tedavi olarak uygulanabilecek yeni terapötik ajanları keşfetmek için kişiselleştirilmiş transkriptom verileri (> 450 örnek) ve prostat kanserine özgü proteom verisi yardımıyla prostat kanserine özgü bir GEM oluşturulmuştur. Bu aşamada, anlatımı farklılaşan genlerin tespitinin yanı sıra, gereklilik

(essentiality) (Zhang vd., 2015) ve DIRAC (Differential Rank Conservation) (Eddy vd., 2010) analizleri gibi farklı yöntemlerle fenotip değerlendirmesi yapıldı. Ayrıca, CMap2 (Lamb vd., 2006) verileri kullanılarak üç farklı kanser hücre hattına (PC3, MCF7, HL60) ait, 1000'den fazla ilacın bu hücre hatlarına uygulaması sonrasındaki gen ekspresyon profilleri incelendi ve ilaç-gen etkileşimleri istatistiksel olarak tahmin edildi. Prostat kanseri metabolizmasındaki değişikliklerin tam tersini gösteren gen-ilaç etkileşimleri bulunup, GEM üzerinde yer aldıkları biyokimyasal reaksiyonlardaki akı profilleri değiştirilerek prostat kanser metabolizmasına etkisi incelendi. Son aşamada *in silico* hücre canlılığı analizleriyle aday ilaçların prostat kanser hücresinin çoğalması üzerindeki etkileri incelendi ve sonraki çalışmalar için aday olabilecek ilaçlar belirlendi.

Oluşturulmuş modelin diğer gen kümeleriyle birlikte gen düzenini analiz etmek için MATLAB'da DIRAC algoritması (Eddy vd., 2010) uygulanmıştır. Algoritmanın merkezi kavramı, katılan genlerin göreceli ifade sıralarına dayanmaktadır. Sonuçlar, yolların sıralamasının, fenotiplerin içinde ve arasında nasıl farklılaştığının niceliksel bir ölçümünü göstermektedir. Gereklilik (essentiality) analizlerinde (Zhang vd., 2015) ise, GEM vasıtasıyla sentetik öldürücü genlerin varlığı araştırılmış ve bu amaçla RAVEN (Agren vd., 2013) yazılımı, Mosek çözücü (versiyon 8) ve MATLAB kullanılmıştır. Sık kullanılan analizlere ek olarak (yani, anlatımı farklılaşmış genler analizi ve işaretçi metabolitlerin belirlenmesi), prostat kanseri metabolizmasını ayrıntılı olarak değerlendirmek için iki ağ bağlantılı analiz çerçevesi ile oluşturulan metabolik model değerlendirilmiştir.

3.7 Kullanılan hücre hatları

Çalışmada, ilgili literatür dikkate alınarak, prostat kanserinde klinik açıdan önemli farklı özellikler gösteren üç kanser hücre hattı (LNCaP, PC3 ve 22Rv1) ile bir kontrol grubu hücre hattı (RWPE1) kullanılması planlanmıştır: RWPE1 (ATCC-CRL-11609) immortalize edilmiş normal insan prostat epitel hücreleridir ve çalışmada kontrol grubu olarak kullanılmıştır. LNCaP (ATCC-CRL-1740) prostat kanserinin metastaz yaptığı lenf nodlarından izole edilmiş androjen reseptörü pozitif (AR+) bir hücre hattıdır. PC-3 (ATCC-CRL-1435) prostat kanserinin metastaz yaptığı kemik dokularından izole edilmiş androjen reseptörü negatif (AR-) bir hücre hattıdır. 22Rv1 (ATCC-CRL-2505) immun yetersizliği olan farede ksenogrefte edilmiş insan primer prostat karsinom hücreleri olan androjen reseptörü pozitif (AR+) bir hücre hattıdır. Tüm hücre hatları ATCC hücre bankasından temin edilmiştir.

3.8 Besiyerleri ve hücre kültürü

RWPE1 hücreleri inek hipofiz bezi ekstresi (BPE- bovine pituitary extract) ve insan rekombinant epidermal büyüme faktörü (EGF) içeren özel serum olmayan keratinosit (Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM) Kit, (Katalog no. 17005-042, GIBCO)) besiyeri, LNCaP, PC3 ve 22Rv1 hücreleri RPMI-1640 (Katalog no. P04-16500, Pan Biotech) besiyeri, VCaP DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, katalog no. 30-2002, ATCC) besiyeri, %10 fetal sığır serumu (FBS-fetal bovine serum, Katalog no. 10500-064, GIBCO) ve 1% penisilin-streptomisin (Katalog no. P06-07050, Pan Biotech) kullanılarak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin yoğunluğu büyütüldükleri petri kabında yaklaşık %70-80 oranına ulaştığında alt kültürleri (pasaj) yapılmıştır. Petrideki besiyeri çekildikten sonra yaklaşık 8-10 ml (10 cm'lik petri için) 1X PBS ile yıkama yapılmış, hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantılarını koparmak için hücrelerin üstüne 1-1.5 ml 1X Tripsin-EDTA (katalog no. P10-020100, Pan Biotech) eklenip yaklaşık 2-3 dk 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. Enzimatik reaksiyonu durdurmak için petri kabına besiyeri eklenip karışım pipetlenerek santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Oda sıcaklığında yaklaşık 1200 rpm'de 5 dk santrifüjün ardından üst sıvı çekilip ve belirlenen oranda seyreltmek amacıyla tüpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstüne taze besiyeri eklenmiştir. Hücre çökeltisi homojen olarak dağıtıldıktan sonra taze besiyeri bulunan petrilere damla damla ilave edilip 37°C'de nemli, %5 CO₂ inkübatöründe büyümesi sağlanmıştır. Çoğaltılan hücreler %5 DMSO içeren bazal besiyeri ile dondurularak çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de mililitrede 10⁶ hücre olacak şekilde stoklanmıştır.

3.9 İlaçların IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi ve sitotoksite analizi

Hücreler sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta RWPE1 için 6 x 10³ hücre/kuyu, PC-3 için 8 x 10³ hücre/kuyu, LNCaP ve 22Rv1 için 12 x 10³ hücre/kuyu olacak şekilde besiyeri ortamına ekildi ve yapışmaları için inkübasyona bırakıldı. Farklı çözücülerde çözülerek hazırlanmış olan İfenprodil (12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µM), Hydroflumethiazide (10, 100, 250, 500, 750, ve 1000 µM), Azlocillin (100, 200, 300, 400, 500, 600, ve 700 µM), Sulfamethoxypyridazine (10, 100, 250, 500, 750 ve 1000 µM) ve Zenarestat (10, 100, 250, 500, 750, ve 1000 µM) stok solüsyonlarından hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak her bir ilaca özgü parantez içinde belirtilen çalışma konsantrasyonları hazırlandı ve hücrelere uygulandı. Kontrol grubundaki hücrelere de çözücüye bağlı olarak %0.1 oranında aseton (Hydroflumethiazide), %0.1 dH₂O (Azlocillin), %0.1 DMSO (Sulfamethoxypyridazine ve Zenarestat) içeren besiyeri uygulandı. Daha sonra plakalar 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlara bırakıldı.

İnkübasyon sonrası canlılık belirlemeleri Alamar Blue (AB) cell viability reagent (Katalog no. DAL1100, Thermo Fisher) kullanılarak yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µL AB eklenerek 37°C'de 1-4 saat inkübe edildi. Spektrofotometrede (Synergy H1, Biotek) 570 nm ve 600 nm'de absorpsiyon ölçümleri alındı. AB değerleri aşağıda verilen Formül 1 kullanılarak negatif kontrol grubuna göre normalize edildi.

Formül 1:

$$ReductionPercentage = \frac{\epsilon_{ox_600nm} * A_{570nm_tx} - \epsilon_{ox_570nm} * A_{600nm_tx}}{\epsilon_{RED_570nm} * A_{600nm_t0} - \epsilon_{RED_600nm} * A_{570nm_t0}} * 100$$

ϵ_{ox} = AB'nun oksidize olmuş formunun molar sönmülleme katsayısı (mavi)

ϵ_{RED} = AB'nun indirgenmiş formunun molar sönmülleme katsayısı (kırmızı)

A = verilen dalga boyunda ölçülen absorpsiyon değeri,

t_0 = ilk ölçüm t_x = x zamanında alınan ölçüm.

Elde edilen veriler ile her hücre hattı için 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonunda IC₅₀ değerleri hesaplandı. Hesaplamalar ve verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism (versiyon 7.0) programı kullanıldı.

Her bir ilacın hücrelere sitotoksik etkisi alamar blue kullanılarak belirlendi.

3.10 Kaspaz aktivasyonları ile aday ilaçların Apoptotik etkisinin belirlenmesi

İlaç maruziyeti sonrası apoptozun hangi yolak aracılığıyla başladığı ve apoptozun erken veya geç evrede olup olmadığının belirlenmesi için, Kaspaz 3/7, 8 ve 9 ölçümleri Cell Meter Multiplexing Caspase 3/7, 8 and 9 activity assay floresan kit (Aat bioquest) kullanıldı. RWPE1, PC3, 22RV1 ve LNCaP hücreleri 96 kuyucuklu tabakalara her kuyuda 100 µl besiyerinde kit protokolüne uygun olarak 20000 hücre olacak şekilde ekildi ve yapışmaları için bir gece boyunca CO₂ etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her hücre hattı 24 saat süreyle belirlenen IC₅₀ değerlerinde hidroflumethiazide ve ifenprodil'e maruz bırakıldı. Maruziyetin ardından kit protokolüne uygun olarak kaspaz belirteçleri eklendi ve floresan mikrotplate okuyucuda floresan ölçümleri alındı. Kaspaz seviyeleri her hücre hattı için kontrole göre normalize edildi.

3.11 Migrasyon ve invazyon analizleri

Çalışmamızda, Hydroflumethiazide ve ifenprodil ile 24 saat inkübe edilen prostat kanseri hücre hatlarında migrasyon ve invazyon davranışında meydana gelebilecek değişimlerin saptanması için transwell metodu kullanıldı. Kontrol hücresi RWPE-1 hücreleri bu çalışmada kullanılmadı. Araştırmamızda, her hücre hattı için hydroflumethiazide ve ifenprodil'in IC₅₀ değerleri kullanıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 1.8×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücrelerin yapışmaları için bir gece boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde bekletildi. Yapışmalarının ardından her hücre için kendi IC₅₀ değerlerinde ilaç uygulaması yapıldı ve 24 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve tripan mavisi kullanılarak toma camında sayıldı.

İnvazyon analizi için, hücre sayımının ardından hücreler bir gün önceden matrijel eklenen insertlere ekildi. İnsertler ekimden bir gece önce matrijel ile kaplandı. Matrijel serumuz RPMI ile 1:3 oranında seyreltildi. Her bir inserte, insert yüzeyini kaplayacak şekilde 90 ul matrijel eklendi. Matrijel eklenmesinin ardından 24 kuyulu plakaya yerleştirilen insertler bir gece boyunca 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde bekletildi. Hücre sayısı PC-3 için 40000 hücre/kuyu, 22RV1 ve LNCaP için 75000 hücre/kuyu olarak belirlendi. Belirlenen sayıda hücre 400 ul %1 FBS içeren RPMI' da insertlere ekildi. İnsertin içinde bulunduğu kuyulara PC-3 için %10 FBS içeren besiyeri eklendi ve invazyon için 48 saat boyunca inkübe edildi.

Matrijel ile kaplanmış insertlerde invazyondan sonuç alınamaması durumunda söz konusu hücre hatları için matrijel içermeyen insertlere ekim yapıldı. Hücreler insertlere %1 FBS içeren besiyerinde ekildi. İnsertlerin içinde bulunduğu kuyulara %20 FBS içeren besiyeri eklendi ve invazyon için 72 saat inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkandı ve metanol ile fikse edildi. Fiksasyondan sonra tekrar PBS ile yıkanan hücreler 1:10 oranında steril dH₂O ile seyreltilen Gemsa boyası ile boyandı. Boyamanın ardından tekrar yıkama yapılarak boyadan arındırılan insertlerin görüntüleri ters ışık mikroskopunda alındı.

3.12 Monolayer koloni oluşumunun araştırılması

Seçilen ilaçların koloni oluşumuna olan etkilerini belirlemek için, RWPE1 kontrol hücresi olmak üzere, PC-3, LNCaP ve 22RV1 prostat kanseri hücre soylarında 24 saat ilaç uygulaması sonrasında koloni oluşumunda meydana gelebilecek değişimler saptandı ve koloni oluşumu analizleri yapıldı. Her hücre hattı için hydroflumethiazide ve ifenprodil'in IC₅₀

değerleri kullanıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 1.8×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücreler yapışmaları için bir gece boyunca 37°C 'de %5 CO_2 içeren etüvde bekletildi. Yapışmalarının ardından her hücre için kendi IC_{50} değerlerinde ilaç uygulaması yapıldı ve 24 saat 37°C 'de % 5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve tripan mavisi kullanılarak toma camında sayıldı. Hücre sayımının ardından hücreler PC-3 için 500 hücre/kuyu, RWPE1, 22RV1 ve LNCaP için 1500 hücre/kuyu hücre olacak şekilde tekrar 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek 14-21 gün süre ile 37°C ' de %5 CO_2 içeren etüvde, koloni oluşumun sağlanması için inkübasyona bırakıldı. Koloni oluşumunun gözlenmesinin ardından koloniler metanolde hazırlanan %0.1'lik kristal viyole boyası ile boyanarak sayımı yapıldı. Bu çalışma üç kez tekrarlandı ve koloniler sayıldı. Hücre canlılığını sağlayan ve 50 hücreden fazla hücre içeren her bir koloni sayıma dahil edildi. Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak "unpaired t-test" metoduyla yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

3.13 Soft agarda koloni oluşumunun araştırılması

İlaç uygulamalarının, hücrelerin yüzeye yapışmadan koloni oluşturup oluşturmadığına olan etkilerinin belirlenmesi için, RWPE1, PC-3, 22RV1 ve LNCaP hücre hatlarında hydroflumethiazide ve ifenprodil maruziyetinden sonra soft agar koloni analizi yapıldı. Hücre sayımı aşamasında monolayer koloni oluşumu aşamasındaki yöntem kullanıldı. Hücre sayımının ardından hücre sayıları PC-3 için 2500 hücre/kuyu, RWPE1, 22RV1 Ve LNCaP için 5000 hücre/kuyu olarak belirlendi. Belirlenen sayıdaki hücreler % 0.5'lik agaroz içeren 6 kuyucuklu plakalara, %0.3'lük agaroz ve medium eşliğinde ekildi. Soft agarda koloni oluşumunun gözlenebilmesi için 14-21 gün boyunca %5 CO_2 'lik etüvde bırakıldı, hafta da 2 kez olmak üzere taze besiyeri eklendi. Oluşan kolonilerin görüntüleri ters ışık mikroskobu ile alındı ve ilaç maruz bırakılmayan (kontrol grubu) ve maruz bırakılan (test grubu) hücrelerin koloni boyutları karşılaştırıldı. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi Student's t test ve two way ANOVA metodları kullanılarak GraphPad Prism 8 programında yapıldı. P değerinin 0.05'ten küçük olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Her deney için en az üç tekrar yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 Prostat kanser verilerinin meta-analizi ile hastalık ile ilişkili transkriptlerin tespiti

4.1.1 Transkriptom (gen ekspresyon) veri setlerinin eldesi

Prostat kanserine ait, iki fenotipte (sağlıklı vs. hastalıklı) örnekler içeren transkriptom veri setleri için NCBI-Gene Expression Omnibus (NCBI-GEO), ArrayExpress ve The Cancer Genome Atlas (TCGA) gibi kamuya açık veri bankalarının yanı sıra ilgili literatür de taranmıştır. Örneklerin herhangi bir uygulamaya veya ajana maruz kalmamış veya tedavi görmemiş olması ve her grupta (sağlıklı/hastalıklı) en az 3 örneğin bulunması dikkate alınarak mikrodizin tabanlı 5 veri seti ile RNA dizileme (RNAseq) tabanlı bir veri seti çalışmaya dahil edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışma kapsamında analiz edilen prostat kanserine ait transkriptom veri setleri

Veri seti	Örnek sayısı	Platform
GSE26910	12	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
GSE34312	20	Illumina HumanWG-6 v3.0 expression beadchip
GSE38241	39	Agilent-014850 Whole Human Genome 4x44K G4112F
GSE45016	11	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
GSE6919	164	Affymetrix Human Genome U95C
TCGA-PRAD	547	RNA-Seq

4.1.2 Biyolojik ağların kurulumu

İnsan hücrelerinde gerçekleşen protein-protein etkileşimleri çeşitli deneysel yöntemlerle tanımlanmış ve kamuya açık veri bankaları üzerinden araştırmacıların hizmetine sunulmaktadır. Öte yandan, özellikle yüksek giriş çıkışlı (high-throughput) teknolojiler kullanılarak elde edilen etkileşim verilerinin güvenilirliği de sıklıkla tartışılmaktadır. Bu sebeple, önceki çalışmamızda, protein-protein ilişkisi sunan 6 farklı veri bankasından (BioGRID, DIP, IntAct, HIPPIE, HomoMINT, ve HPRD) elde edilen toplam 295288 etkileşim, 8 biyolojik ilişkiye dayalı bir skrolama ile analiz edilmiş ve 13213 protein arasında gerçekleşen 147923 ikili etkileşimin yüksek güvenilirlikte olduğu görülmüştür (Karagoz vd., 2016). Bu projede, araştırma grubumuz bünyesinde oluşturulan yüksek güvenilirlikli protein-protein etkileşim ağı kullanılmıştır. Oluşturulan protein-protein etkileşim ağının içinde insanda

reseptör aktivitesi gösteren 916 reseptör proteinin varlığı ve bu proteinlerin diğer proteinlerle 20120 etkileşim gösterdiği görülmüştür.

Transkripsiyon faktörü (TF) ve miRNA'ların çok sayıda genin işlevini kontrol ederken birlikte çalıştığı bilinmektedir (Liang vd., 2015). Farklı istatistiksel ve bilgisayar tabanlı analiz ile sunulan birçok bilginin yanında deneysel olarak kanıtlanmış miRNA-gen ilişkileri de veri bankalarında mevcuttur. Fakat bilgilerdeki kirlilik, ileri analizleri olumsuz etkilemekte ve yanlış tahminlere sebebiyet verebilmektedir. Bu sorunu ortadan kaldırmak ve güvenilir bir transkripsiyon düzenleyici ağ oluşturabilmek için, araştırma grubumuz bünyesinde, miRNA-gen ve TF-gen ilişkilerini kapsayacak nitelikte bir bütünlük transkripsiyon düzenleyici ağ oluşturulmuştu (Gov ve Arga, 2016). Mevcut projede, geçmişte oluşturulan söz konusu ağ güncellenerek kullanılmıştır. Bu kapsamda, tamamı deneysel yöntemlerle elde edilmiş TF-gen ve miRNA-gen ilişkileri Regnetwork, PAZAR, Trtrust, Tfacts, HTRldb, iRegulon, miRTarBase, TransmiR miRecords, Starbase ve miRDB veri bankalarından toplanmış ve yeni bir bütünlük transkripsiyon düzenleyici ağ kurulmuştur. Kurulan ağ 284 TF, 2599 miRNA ve 22808 hedef gen arasında 51871 TF-gen ve 322133 miRNA-gen ilişkisinden oluşmaktadır.

Mardinoglu vd. (2014), literatürde bulunan genom boyutlu metabolik modeller (iHuman1512, Recon 1, EHMN) ile hücre spesifik genom boyutlu metabolik modelleri (iAdipocytes1809 ve HepatoNET1), KEGG, Reactome, LipidMap, ve HumanCyc veri bankalarından alınan metabolik tepkimelere ait bilgiler ile bütünlükleştirerek insana özgü genom boyutlu bir metabolik model, The Human Metabolic Reaction (HMR), tasarlamışlardır. Mevcut projede, HMR modelinin son versiyonu olan ve 3765 gen ile ilişkilendirilmiş 8186 tepkime ve farklı hücresel kompartımanlarda tanımlanmış 6008 metabolit bulunduran HMR2 metabolik modeli kullanılmıştır.

4.1.3 mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genler

Çalışma kapsamına alınan mikrodizin tabanlı veri setleri birbirinden bağımsız olarak Bioconductor (www.bioconductor.org) yazılım platformu altında RMA normalizasyon (Irizarry vd., 2003) ve mikrodizin verileri için doğrusal modeller (LIMMA) (Smyth, 2005) paketleri kullanılarak R programlama dilinde istatistiksel olarak analiz edilmiş, p-değeri 0.01'den küçük olan genler hastalıkta ekspresyonu farklılık gösteren genler (DEG) olarak belirlenmiştir. Genlerin isimlendirmeleri (gen sembol, Entrez Gen ID, Ensembl ID vs.) için bioDBnet platformu (Mudunuri vd., 2009) kullanılmıştır. Hastalık durumunda sağlıklı duruma göre ekspresyon seviyesinin ne kadar miktarda değiştiğini ifade eden kat değişiminin sınırı en az

%20 olarak belirlenerek gen anlatımındaki değişikliğin yönü (gen anlatımı artan/azalan) belirlenmiştir.

RNA dizileme tabanlı, TCGA kaynaklı, veri setinin analizinde 52 sağlıklı prostat dokusu ile 495 primer prostat tümörü olan kişiden alınan transkriptom verileri, NCBI Genome Data Commons'dan (Grossman vd., 2016) "TCGAbiolinks" R / Bioconductor paketi (Colaprico vd., 2016) kullanılarak elde edilmiştir. Transkriptom verileri, FPKM cinsine dönüştürülmüş ve medyan ekspresyon değeri $FPKM \geq 1$ kriteri kullanılarak filtrelenmiştir (Bidkhorı ve diğerleri, 2018). Söz konusu transkript verileri R / Bioconductor paketi "DESeq" el kitabı kullanılarak iki fenotip arasındaki DEG'ler saptanmıştır. Benjamini ve Hochberg yanlış keşif oranı kullanılarak çoklu hipotez düzeltmesi gerçekleştirilmiştir. DEG'ler false discovery rate (FDR) ile düzeltilmiş p değeri <0.001 eşliğine göre filtrelenmiştir. Yukarı ve aşağı regüle edilen genleri belirlemek için 1'in kat değiştirme eşiği uygulanmıştır.

Prostat kanseri için 6 veri setine meta-analiz yapıldığında, istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) derecede anlatımı azalan 3803 gen, anlatımı artan 2934 gen olmak üzere toplam 6737 hastalıkta anlatımı farklılaşan gen tespit edilmiştir. Her bir veri setine göre anlatımı değişen gen sayıları ve artma/azalma durumları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Analiz edilen prostat kanserine ait transkriptom veri setlerinde hastalık durumuna göre anlatımı değişen genlerin sayısı ve anlatımda azalma/artma durumları ($p < 0.01$)

Veri seti	Anlatımı değişen gen sayısı	Anlatımı azalan gen sayısı	Anlatımı artan gen sayısı
GSE26910	1069	562	507
GSE34312	1196	495	701
GSE38241	1159	680	479
GSE45016	654	470	184
GSE6919	3824	2225	1599
TCGA-PRAD	3776	2266	1510

4.2 Farklı biyolojik seviyelerdeki işaretçi moleküller ve ilgili biyolojik süreçler

4.2.1 İşaretçi reseptörler

Fiziksel etkileşimi olan reseptörlere ait bilgi, Karagoz vd. (2016) tarafından yayınlanmış yüksek güvenilirlik skoruna sahip insan protein-protein etkileşim ağından elde edilmiştir. Kullanılan etkileşim listesinde 5501 protein kodlayan gen ve 916 reseptör protein arasında

toplam 20120 etkileşim baz alınarak analizler gerçekleştirilmiştir. Reseptör-gen etkileşim listesindeki genler referans olarak kullanılıp, her kanser veri setindeki farklı eksprese olan genler “reporter features” algoritması vasıtasıyla skorlanmış ve işaretçi reseptörler bulunmuştur. Patil ve Nielsen (2005) tarafından yayınlanan “reporter features” algoritması, genel olarak işaretçi moleküllerin (reseptör, miRNA, TF vb.) hesaplanabilmesine uygun olacak şekilde MATLAB yazılımı altında grubumuzca uyarlanmıştır. İşaretçi biyomoleküllerin z-skorları hesaplanmış, sonrasında p-değerine çevrilmiştir. Hesaplanan işaretçilerin p-değerleri çoklu karşılaştırmalarda kullanılan bir doğrulama metodu olan FDR ile belirlenmiş ve p-değeri 0.05’ten küçük olanlar önemli sayılmıştır.

Yapılan analizlerle prostat kanserinde 253 reseptör işaretçi olarak bulunmuştur. Elimizdeki diğer 12 kanser türüne (Akciğer kanseri, Beyin tümörü, Cilt kanseri, Kolorektal kanser, Lösemi, Meme kanseri, Oral kanser, Over kanseri, Özofagus kanseri, Pankreas kanseri, Servikal kanser, Tiroid kanseri) ait sonuçlar ile karşılaştırıldığında bu reseptörlerin hiçbirinin prostat kanserine özgü işaretçi molekül olmadığı gözlemlenmiştir.

4.2.2 İşaretçi transkripsiyon faktörleri ve miRNA’lar

Deneyssel olarak kanıtlanmış TF-gen etkileşimleri, HTRId (Bovolenta vd., 2012) ve PAZAR (Portales-Casamar vd., 2009) veri bankalarından elde edilmiştir. 284 TF ve 18302 gen arasında 51871 etkileşimin olduğu HTRId veri bankasının, PAZAR veri bankasındaki etkileşimleri de içerisinde barındırdığı görülmüştür. O yüzden, HTRId tarafından sunulan TF-gen etkileşim listesindeki genler referans olarak kullanılıp; TF’ler, meta-analiz sonucu anlatımı farklılaşan genler üzerinden “reporter features” algoritması vasıtasıyla skorlanmış ve işaretçi transkripsiyon faktörleri bulunmuştur. p-değeri 0.05’ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Deneyssel olarak kanıtlanmış miRNA-gen etkileşimleri ise miRTarbase (Release 4.5) veri bankasından elde edilmiştir (Hsu vd., 2014). 2599 miRNA ve 14845 gen arasında bulunan 322134 etkileşim listesindeki genler referans olarak kullanılıp; meta-analiz sonucu anlatımı farklılaşan genler üzerinden “reporter features” algoritması vasıtasıyla miRNA’lar skorlanmış ve işaretçi miRNA’lar bulunmuştur. İşaretçi TF’lerin tespitinde olduğu gibi, p-değeri 0.05’ten küçük olanlar önemli sayılmıştır.

Yapılan analizlerle prostat kanserinde 22 transkripsiyon faktörü ve 425 miRNA düzeyinde işaretçi molekül tespit edilmiştir. Elimizdeki diğer 12 kanser türüne ait sonuçlar ile karşılaştırıldığında, 4 TF ve 134 miRNA’nın prostat kanserine özgü işaretçi moleküller olduğu

gözlemlenmiştir. Öte yandan, prostat kanserinde işaretçi olduğu tespit edilen 12 TF ve 75 miRNA'nın ise incelenen 13 kanser türünde ortak olduğu gözlemlenmiştir.

13 kanser türünü (Akciğer kanseri, Beyin tümörü, Cilt kanseri, Kolorektal kanser, Lösemi, Meme kanseri, Oral kanser, Over kanseri, Özofagus kanseri, Pankreas kanseri, Prostat kanseri, Servikal kanser, Tiroid kanseri) içeren karşılaştırmalı analiz sonucunda; 4 TF, 134 miRNA, 127 metabolit ve 51 hub proteinin prostat kanserine özgü işaretçi moleküller olduğu, prostat kanserinde de bulunan 12 TF, 75 miRNA ve 18 hub proteinin ise bütün kanserlerde ortak olduğu gözlemlenmiştir.

Transkripsiyon faktör ve miRNA gibi transkripsiyonu düzenleyici moleküller tespit edildikten sonra, bu moleküllerin transkripsiyonunu düzenlediği genlerin kodladığı hub proteinlerle, araştırma grubumuz tarafından kurulan bütünleşik transkripsiyon düzenleyici ağ olan TF-gen, miRNA-gen ve TF-miRNA ilişkileri kullanılarak potansiyel hub protein-TF-miRNA üçlüsü kurgulanmıştır. Prostat kanseri için toplam 8 hub protein-TF-miRNA üçlüsü tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Prostat kanserine ait hub protein-TF-miRNA üçlüsü

Hub protein	TF	miRNA
CDK1	TP53	hsa-mir-107
C1QBP	ESR1	hsa-mir-375
MYC	ESR1	hsa-mir-375
JUN	MYC	hsa-mir-429
MYC	MYC	hsa-mir-429
PTEN	MYC	hsa-mir-429
RBBP4	MYC	hsa-mir-429
MYC	E2F1	hsa-mir-449a

4.2.3 İşaretçi metabolitler

İşaretçi metabolitlerin tespiti için İnsan Metabolik Atlas (Human Metabolic Atlas-HMA) veri bankasında yer alan jenerik Human Metabolic Reaction (HMR 2.0) (Mardinoglu vd., 2014) modeli ile meta-analiz sonucu anlatımı farklılaşan genlerin bilgisi bütünleştirilerek, enzim kodlayan genlerin etrafındaki metabolitlere ait p-değerleri hesaplanmıştır. P-değeri 0.05'ten küçük olanlar, işaretçi metabolitler şeklinde sunulmuştur. Simulasyonların gerçekleştirilmesi için ara yüz olarak BioMet Toolbox (v2.0) (Garcia-Albornoz vd., 2014) kullanılmıştır.

Yapılan analizlerle prostat kanserinde 546 metabolit, düzeyinde işaretçi molekül tespit edilmiştir. Elimizdeki diğer 12 kanser türüne ait sonuçlar ile karşılaştırıldığında, 127 metabolitin prostat kanserine özgü işaretçi moleküller olduğu görülmüştür.

4.2.4 Merkezi nitelikteki hub proteinler

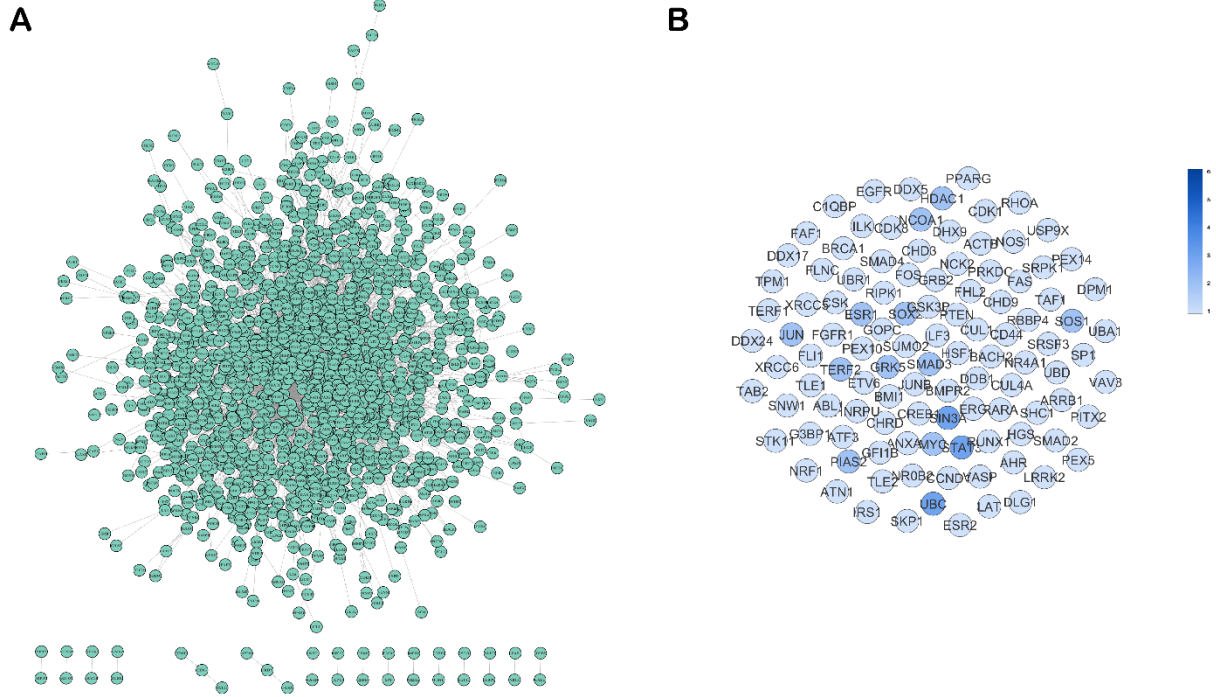
Farklı veri bankalarındaki bilgileri kapsayan, grubumuzca oluşturulmuş olan protein-protein etkileşim ağı bu çalışmada da kullanılmıştır (Karagoz vd., 2016). Meta-analiz sonucu anlatımı farklılaşan genler ile ilişkilendirilen protein etkileşimleri tanımlanmış ve ekspresyon yönüne göre protein-protein etkileşim ağı inşa edilmiştir. Protein-protein etkileşim ağı grafik teorisi kullanılarak, yönlendirilmemiş çizgeye çevrilmiş ve $G = (V, E)$ fonksiyonu oluşturulmuştur: V proteinleri gösteren düğümleri, E proteinler arasındaki ikili etkileşimlerdeki bağıntıyı ifade etmektedir. Ağın görselleştirilmesi ve topolojik özelliklerin hesaplanması Cytoscape (Shannon vd., 2003) yazılımı ve CytoHubba (Lin vd., 2008) paketi ile yapılmıştır. Merkezi proteinlerin (çekirdek veya hub proteinler) belirlenmesi için daha önce de kullanmış olduğumuz dual-metrik topolojisi uygulanmıştır (Karagoz vd., 2015). Kullanılan lokal metrik derece (degree), global metrik ise yakınlık merkeziliğidir (betweenness centrality). Derece ağdaki bir düğüme bitişik düğüm sayısına göre tanımlanan bir ölçü iken yakınlık merkeziliği ağdaki bir düğümün diğer tüm düğümlere en kısa yoldan uzaklıklarını hesaba katan bir ölçüdür. Bu iki ölçünün birlikte değerlendirildiği dual-metrik topoloji sonrası çekirdek (hub) protein setleri belirlenmiştir.

Prostat kanseri için kurulan protein-protein etkileşim ağı incelendiğinde 1422 protein arasındaki 3313 etkileşim görülmektedir (Şekil 1A). Yapılan analizlerde prostat kanserinde 110 hub protein düzeyinde işaretçi molekül tespit edilmiştir (Şekil 1B). Elimizdeki diğer 12 kanser türüne ait sonuçlar ile karşılaştırıldığında, 51 hub proteinin prostat kanserine özgü işaretçi moleküller olduğu, 18 hub proteinin ise bütün kanserlerde ortak olduğu gözlemlenmiştir.

4.2.5 İşaretçi gen ve proteinler ile ilişkili biyolojik süreçler

Birçok gen veya protein aynı biyolojik yolakta/süreçte yer alabilmektedir. Tek bir geni analiz etmek yerine bir gen kümesini analiz etmenin daha güçlü sonuçlar verdiği bilinmektedir. Gen seti işlev zenginleştirme analizi (Subramanian vd., 2005) hangi gen kümelerinin hangi biyolojik yollarda veya süreçlerde görev aldığını belirlemede kullanılan istatistiksel bir analizdir. Bu çalışmada da ekspresyonunda farklılık gösteren genlerin işlev zenginleştirme analizleri, moleküler yolak ve Gen Ontolojisi (GO) terimi olan biyolojik süreç için

ConsensusPathDB gen seti zenginleştirme aracı (Kamburov vd., 2009) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde, yollarla ilişkili olarak KEGG, Reactome ve Biocarta veri bankalarından çekilen bilgiler tercih edilmiştir. Zenginleştirme analizlerinde p-değeri 0.05'ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 1. Prostat kanseri için protein-protein etkileşim ağı kurulumu ve analiz sonuçları. A) Prostat kanseri için oluşturulan protein-protein etkileşim ağı. B) Prostat kanserinde derece ve yakınlık merkeziliği ölçülerine göre anlamlı çıkan işaretçi hub proteinler.

Tablo 4. Prostat kanserine ait mRNA seviyesinde değişiklik gösteren genlerin yer aldığı moleküler yollar

Moleküler yolak ismi	P-değeri	FDR düzeltmesi
Fokal adezyon	2.84×10^{-16}	5.19×10^{-13}
ECM-reseptör etkileşimi	1.01×10^{-11}	9.24×10^{-9}
Aktin sitoskeleton düzenlenmesi	1.77×10^{-11}	1.05×10^{-8}
Kanser yolları	2.31×10^{-11}	1.05×10^{-8}
Kardiyomiyopati	7.59×10^{-11}	2.31×10^{-8}

Prostat kanseri için moleküler yolak bilgileri ve biyolojik süreç bilgilerinin p-değerine göre en anlamlı ilk 5'i Tablo 4 ve 5'de gösterilmektedir.

Tablo 5. Prostat kanserine ait mRNA seviyesinde değişiklik gösteren genlerin yer aldığı biyolojik süreç bilgileri

Biyolojik süreç ismi	P-değeri	FDR düzeltmesi
Hücrel süreçlerin negatif düzenlenmesi	8.02×10^{-37}	1.22×10^{-33}
Hücrel süreçlerin pozitif düzenlenmesi	3.02×10^{-35}	2.30×10^{-32}
Hücrel bileşenlerin organizasyonunun düzenlenmesi	1.34×10^{-28}	6.81×10^{-26}
Hücre farklılaşması	3.05×10^{-27}	1.16×10^{-24}
Sinyal iletiminin düzenlenmesi	1.38×10^{-26}	4.21×10^{-24}

4.2.6 İşaretçi metabolitlerin ilişkili olduğu yollar

Tespit edilen işaretçi metabolitlere ait zenginleştirme analizi için MBRole 2.0 biyoinformatik aracı (López-Ibáñez vd., 2016) kullanılmıştır. Analizde metabolitlere ait KEGG bileşen isimleri belirlenerek bu metabolitler ile ilişkili KEGG yolları tespit edilmiştir. P-değeri 0.05'ten küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Prostat kanserine ait işaretçi metabolitlerin yer aldığı en anlamlı ilk 5 moleküler yolak, p-değeri ve düzeltilmiş p-değeri ile birlikte Tablo 6'da verilmiştir. Tabloya bakıldığında, pürin ve pirimidin gibi nükleik asit metabolizmaları ve yağ asidi metabolizmalarıyla ilgili yolların prostat kanserinde ön plana çıktığı görülmektedir.

Tablo 6. Prostat kanserine ait işaretçi metabolitlerin yer aldığı moleküler yolak bilgileri

Metabolik yolak ismi	p-değeri	Düzeltilmiş p-değeri
Metabolik yollar	$<1.00 \times 10^{-20}$	$<1.00 \times 10^{-20}$
Sitokrom P450 ksenobiyotiklerin metabolizması	$<1.00 \times 10^{-20}$	$<1.00 \times 10^{-20}$
Yağ asidi biyosentezi	3.71×10^{-10}	2.24×10^{-8}
Pirimidin metabolizması	1.23×10^{-9}	5.57×10^{-8}
Arjinin ve prolin metabolizması	6.38×10^{-8}	2.31×10^{-6}
Pürin metabolizması	4.47×10^{-7}	1.35×10^{-5}
Oksidatif fosforilasyon	7.28×10^{-7}	1.88×10^{-5}
Glisin, serin ve treonin metabolizması	1.59×10^{-6}	3.60×10^{-5}
Pirüvat metabolizması	5.26×10^{-6}	1.06×10^{-4}
Birincil safra asidi biyosentezi	6.30×10^{-6}	1.14×10^{-4}

4.3 Hedef ilaçların belirlenmesi

Hedef ilaçların belirlenmesinde prostat kanseri hastalarında mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genler ile tespit edilen işaretçi moleküller dikkate alınarak çeşitli ilaç repozisyonu algoritmaları kullanılmıştır.

4.3.1 Mevcut web araçları kullanılarak gerçekleştirilen ilaç repozisyonu çalışmaları

Kapsamlı bir literatür taraması yapılarak, ilaç repozisyonu amacıyla geliştirilmiş kamuya açık web tabanlı araçlar tespit edilmiştir (Tablo 7). Bunların arasında geneXpharma, araştırma grubumuz tarafından geliştirilmiş transkriptom tabanlı bir ilaç repozisyonu algoritmasıdır (Turanlı vd., 2017).

Tablo 7. Kamuya açık web tabanlı ilaç repozisyonu araçları

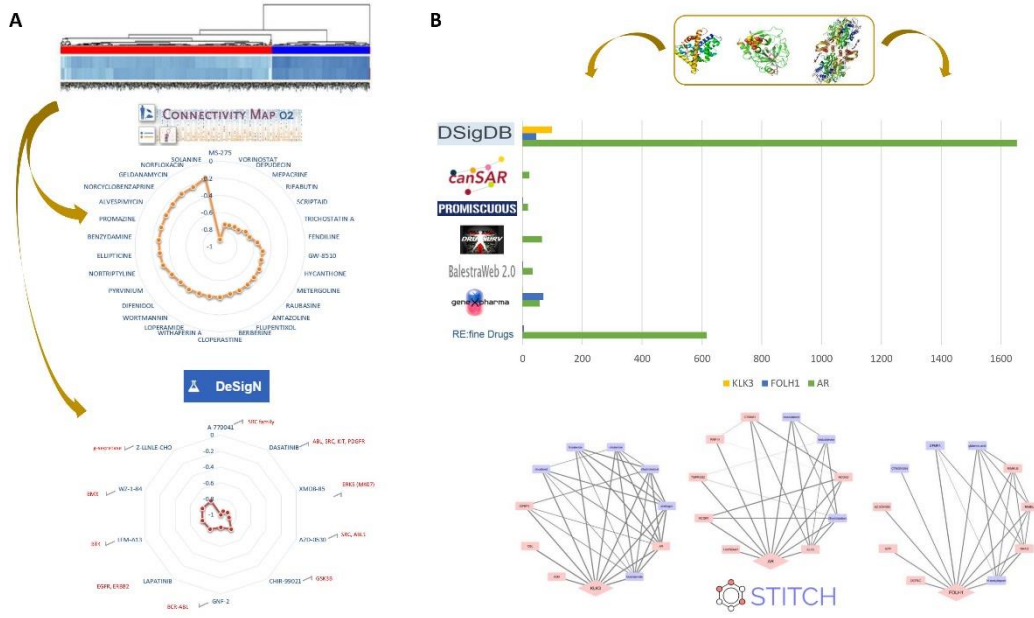
Araç ismi	Web bağlantı adresi
BalestraWeb	http://balestra.csb.pitt.edu/
canSAR	http://cansar.icr.ac.uk
ConnectivityMap	https://portals.broadinstitute.org/cmap/
DeSigN	http://design.cancerresearch.my/
DrugSURV	http://www.bioprofiling.de/GEO/DRUGSURV
DSigDB	http://tanlab.ucdenver.edu/DSigDB/DSigDBv1.0/
DT-Web	http://alpha.dmi.unict.it/dtweb/
geneXpharma	http://genexpharma.org
PROMISCUOUS	http://bioinformatics.charite.de/promiscuous/
RE:fine drugs	http://drug-repurposing.nationwidechildrens.org
repoDB	http://apps.chiragjpgroup.org/repoDB/
RepurposeDB	http://repurposedb.dudleylab.org
STITCH	http://stitch.embl.de/

Daha sonra çeşitli girdiler kullanılarak bu araçlar prostat kanseri tedavisinde kullanılabilecek ilaçların tespiti için denenmiştir. Mevcut web tabanlı araçların bir bölümü tek gen/protein verisini girdi (input) olarak kabul etmektedir. Bu doğrultuda, proje kapsamında tespit edilen işaretçi mRNA ve proteinler kullanılmıştır. Girdi olarak kullanılan bu işaretçi proteinler arasında prostat kanserinin en iyi bilinen ve klinikte kullanılan üç biyoişaretçisi olan “androjen reseptörü (AR), folat hidrolaz 1 (FOLH1) ve kallikrein ilişkili peptidaz 3 (KLK3)” de bulunmaktadır. Öte yandan, bu araçların büyük bölümü ise girdi olarak gen veya protein

setini kabul etmektedir. Bu araçlarda girdi olarak kullanılmak üzere, 1 numaralı iş paketi kapsamında gerçekleştirilen, prostat kanseri ilişkili Kanser Genom Atlası (TCGA) ve diğer transkriptom veri setlerinin meta-analizi ile elde edilen “anlatımı prostat kanserli dokularda önemli oranda değişen genlerin” listeleri kullanılmıştır.

Bu çalışmada, ayrıca, Gato ve ark. (2015) tarafından primer prostat tümörlerinden elde edilmiş proteom verileri analiz edilerek, anlatımı önemli oranda değişen ($p < 0.05$) 9000 civarında protein tespit edilmiştir. Transkriptom verilerinin meta-analizi ile elde edilen “anlatımı farklılaşan mRNAların listesi” ile bu proteinlerin listesinin kesişimi alınarak hem protein hem de mRNA seviyelerinde anlatımın yönü aynı (artan/azalan) olacak şekilde ortak moleküllerin tespiti sağlanmış ve web araçlarına girdi olarak kullanılmıştır. Ayrıca, CMap2 ve DeSigN gibi araçlarda, anlatımı artan ve azalan moleküllerin listelerinin ayrı ayrı girdi olarak verilmesi gerektiğinden, gerek görülen durumlarda anlatım düzeylerinin farklılaşma yönleri dikkate alınarak girdiler oluşturulmuştur.

Yukarıda özetlenen çeşitli girdi setleri ve Tablo 7’de sunulan web tabanlı ilaç repozisyonu araçlarının büyük bölümü (BalestraWeb 2.0, CMap2, DeSigN, DT-Web, DrugSURV, geneXpharma, RE:fine drugs, repoDB, RepurposeDB, STITCH ve PROMISCUOUS) ile gerçekleştirilen benzetimler neticesinde, çok sayıda aday ilaç tespit edilebilmiştir. Öte yandan, DSigDB ve canSAR ile gerçekleştirilen benzetimlerde istatistiksel olarak anlamlı ilaç-gen/protein etkileşimi tespit edilememiştir. Farklı girdiler ve araçlarla gerçekleştirilen benzetim sonuçlarındaki ortaklıklar belirlenerek, en olası ilaç adaylarının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Benzetim sonuçlarının bir bölümü Şekil 2’de örneklendirilmiştir. Bu doğrultuda, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri “entinostat”, “vorinostat” ve “depucein” ile quinacrine olarak da bilinen “mepacrine”, mycobutin olarak da bilinen “rifabutin” ve “dasanatib” en olası ilaç adayları olarak belirlenmiştir. Diğer Hsp90 inhibitörleri olan “alvespimycin” ve “geldanamycin”, anti-enfeksiyon ajanları “norfloxacin”, “berberine” ve “pyrvinium”, anti-histamin “antazoline”, anti-psikotikler “flupentixol” ve “nortriptyline” ve daha onlarca molekül benzetimlerde ön plana çıkan ilaç adayları arasında yer almıştır.



Şekil 2. Prostat kanserinde ilaç repozisyonu amacıyla farklı web-tabanlı araçlar kullanılarak gerçekleştirilen benzetimlerin değerlendirilmesi. A) Anlatımı hem mRNA hem de protein seviyesinde farklılaşan moleküller girdi olarak kullanılarak CMap2 ve DeSigN araçlarında gerçekleştirilen benzetimlerin çıktıları B) Tek gen/protein bilgisinin (AR veya FOLH1 veya KLK3) girdi olarak kullanılması sonucu çeşitli araçlarda benzetim sonuçları.

4.3.2 Prostat kanserine özgü genom ölçekli metabolik model üzerinden ilaç repozisyonu

Transkriptom ve/veya proteom verileriyle desteklenmiş genom ölçekli metabolik modeller (GEM'ler), kanser metabolizması hakkında bilgi sunmakta ve potansiyel biyobelirteçleri, terapötik ajanları ve ilaç hedeflerini tanımlamak için sıkça kullanılmaktadır. Proje çalışmalarının bu bölümünde, özetle, prostat kanseri metabolizmasını araştırmak ve aynı zamanda etkili tedavi olarak uygulanabilecek yeni terapötik ajanları keşfetmek için kişiselleştirilmiş transkriptom verileri (> 450 örnek) ve prostat kanserine özgü proteom verisi yardımıyla prostat kanserine özgü bir GEM oluşturulmuştur. Bu aşamada, anlatımı farklılaşan genlerin tespiti yanı sıra, gereklilik (essentiality) (Zhang vd., 2015) ve DIRAC (Differential Rank Conservation) (Eddy vd., 2010) analizleri gibi farklı yöntemlerle fenotip değerlendirmesi yapıldı. Ayrıca, CMap2 (Lamb vd., 2006) verileri kullanılarak üç farklı kanser hücre hattına (PC3, MCF7, HL60) ait, 1000'den fazla ilacın bu hücre hatlarına uygulaması sonrasındaki gen ekspresyon profilleri incelendi ve ilaç-gen etkileşimleri istatistiksel olarak tahmin edildi. Prostat kanseri metabolizmasındaki değişikliklerin tam tersini gösteren gen-ilaç etkileşimleri bulunup, GEM üzerinde yer aldıkları biyokimyasal reaksiyonlardaki akı profilleri değiştirilerek prostat kanser metabolizmasına etkisi incelendi. Son aşamada *in silico* hücre canlılığı

analizleriyle aday ilaçların prostat kanser hücresinin çoğalması üzerindeki etkileri incelendi ve sonraki çalışmalar için aday olabilecek ilaçlar belirlendi.

İlk aşamada, 495 primer prostat tümörü olan kişiden alınan transkriptom verileri, NCBI Genome Data Commons'dan (Grossman vd., 2016) "TCGAbiolinks" R / Bioconductor paketi (Colaprico vd., 2016) kullanılarak elde edilmiştir. Transkriptom verileri, FPKM cinsine dönüştürülmüş ve medyan ekspresyon değeri $FPKM \geq 1$ kriteri kullanılarak filtrelenmiştir (Bidkhorı vd., 2018). Hastalığa ve dokuya özel protein bilgisinin GEM'le bütünleştirilmesi için, proteom verileri HPA sürüm 18.0'dan elde edilmiştir (Uhlén vd., 2015). Her proteinin anlatımı, düşük, orta ve yüksek gibi bolluk seviyeleri aracılığıyla transkriptom verileri ile bütünleştirilmiştir. ICancerCore modeli (Uhlen vd., 2017) kalıp model olarak kullanılarak, RAVEN araç kutusundaki tINIT (dokular için bütünleştirici ağ çıkarımı) algoritması (Agren vd., 2014) ve Mosek çözücü (versiyon 8) aracılığıyla prostat kanserine özgü modelin kurulumu sağlanmıştır. Prostat kanseri için toplam 471 kişiselleştirilmiş GEM, İnsan Patolojisi Atlası'ndan (Uhlen vd., 2017) sağlanmış ve MATLAB (R2017b)'de bireysel metabolik varyasyonları kapsayacak şekilde birleştirilmiştir. Verilerinin birleşik bir modelle bütünleştirilmesi, bireysel metabolik varyasyonları yakalayan prostat kansere özgü bir GEM sunmuştur.

Bu çalışmada oluşturulmuş prostat kansere özgü GEM, kişilerden alınan transkriptom ve prostat kanser dokusuna özgü proteom verisini içerir. Prostat tümörleri arasındaki heterojenite, hastalığın kanserli olmayan prostatla karşılaştırılmasını da engellemektedir. Bu nedenle, prostat kanserli hastalarda tüm metabolik reaksiyonları ve ilgili gen ekspresyonlarını içeren 450'i aşkın kişiselleştirilmiş modelin birleşimine dayanan bir GEM kurulumu gerçekleştirilmiştir. Prostat kanser metabolizmasını ifade eden modelin analizleri sürekli olarak değişmiş lipit metabolizması / steroid biyosentez yollarını vurgulamaktadır.

İkinci aşamada, anlatımı farklılaşan genler (DEGler) ve metabolik imzaları tanımlanmıştır. TCGA'dan çekilen ham transkript verileri ve R / Bioconductor paketi "DESeq" el kitabı kullanılarak iki fenotip arasındaki anlatım seviyesi farklılık gösteren genler saptanmıştır. Gen ekspresyonu değişikliklerine bağlı olarak önemli ölçüde zenginleştirilmiş metabolitleri tanımlamak için, oluşturulmuş modelin ağ topolojisi aracılığıyla RAVEN (Agren vd., 2013) yazılımı üzerinden işaretçi metabolit algoritması ile işaretçi moleküller belirlenmiştir. Bu metabolitler, metabolik ağın farklı bileşenleri arasındaki tedirginliklerden etkilenen merkezi bileşenleri vurgulamaktadır (Patil ve Nielsen, 2005).

Benzetimler, hücresel kompartmanlarına bakılmaksızın 86 yukarı regüle olmuş metabolit ve 76 aşağı regüle metabolit ile sonuçlanmıştır. Yukarı regüle edilen işaretçi metabolitlerin bir örneği olarak folat, PRAD hücrelerinin invazivliğini (Green vd., 2013) ve folik asitin yüksek fizyolojik seviyelerini çeşitli prostat kanseri hücre hatlarının hem büyümesini hem de invazivliğini stimüle etmektedir (Petersen vd., 2012). Başka bir regüle edilmiş metabolit olan prostaglandin E2, arakidonik asitten siklooksijenaz enzimleri (örn., COX2) ile üretilen biyoaktif bir lipiddir; prostat tümörü büyümesi ve anjiyogenez ile pozitif bir korelasyona sahiptir (Jain vd., 2008). Ayrıca, yağ asidi biyosentezinde rol oynayan diğer işaretçi metabolitleri, primer safra asidi biyosentezi, mitokondride yağ asidi uzaması, folattan etkilenen bir karbon havuzu ve kalsiyum sinyal yolları PRAD'de yukarı regüle edilen genler ile ilişkili bulunmuştur. Özellikle, steroid biyosentezine katılan 4-alfa-metilzosterol, 14-demetillanosterol, 4-alfa-metilzosterol-4-karboksilat ve 4,4-dimetil-5alfa-cholesta-8-en-3beta-ol gibi metabolitler işaretçi olarak karşımıza çıkmaktadır. Prostat kanserinde aşağı regüle edilen metabolitlerin, pürin-pirimidin metabolizması, nikotinat ve nikotinamid metabolizması ile ilişkili oldukları da gözlemlenmiştir.

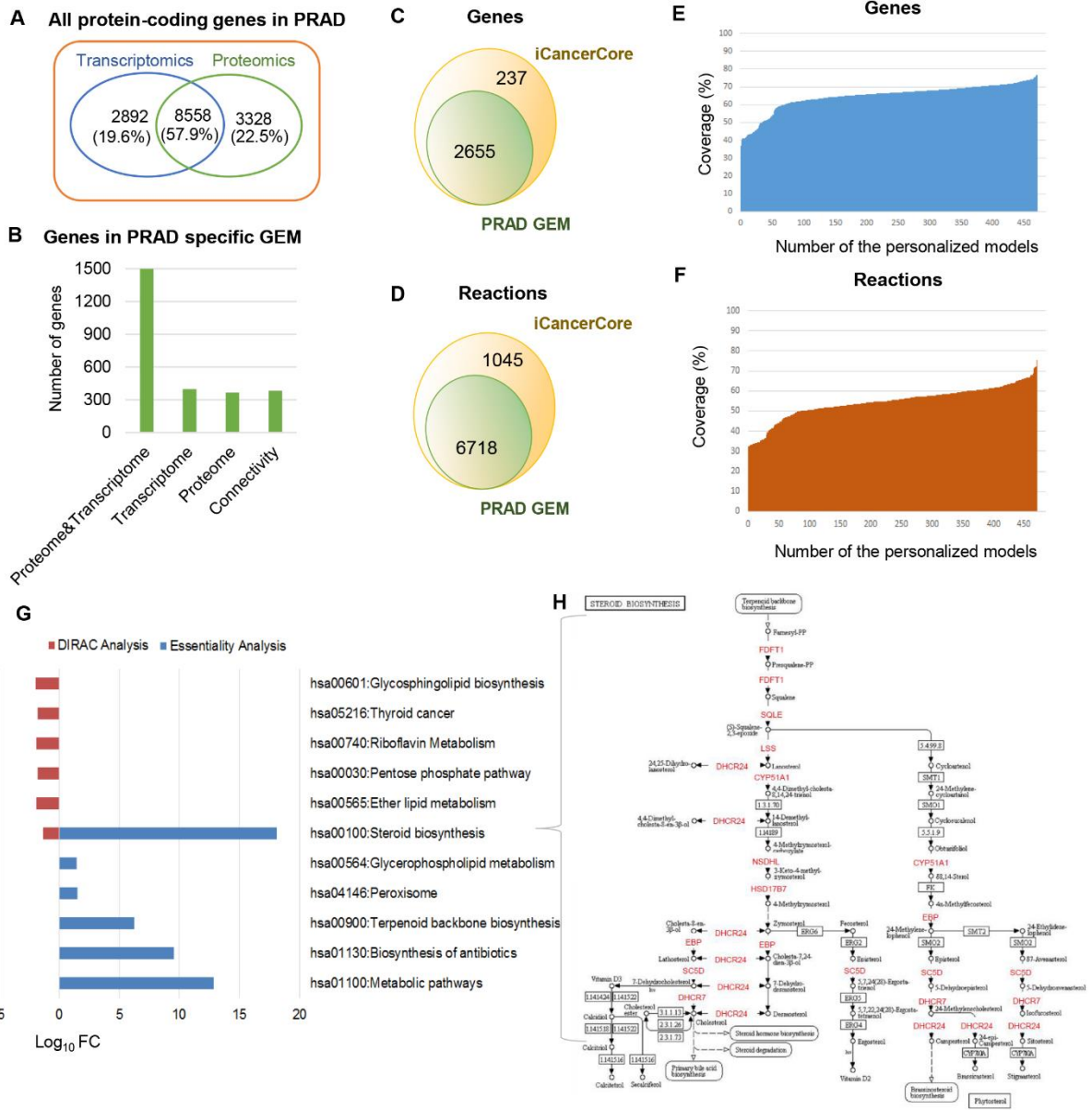
Oluşturmuş modelin diğer gen kümeleriyle birlikte gen düzenini analiz etmek için MATLAB'da DIRAC algoritması (Eddy vd., 2010) uygulanmıştır. Algoritmanın merkezi kavramı, katılan genlerin göreceli ifade sıralarına dayanmaktadır. Sonuçlar, yolların sıralamasının, fenotiplerin içinde ve arasında nasıl farklılaştığının niceliksel bir ölçümünü göstermektedir. Gereklilik (essentiality) analizlerinde (Zhang vd., 2015) ise, GEM vasıtasıyla sentetik öldürücü genlerin varlığı araştırılmış ve bu amaçla RAVEN (Agren vd., 2013) yazılımı, Mosek çözücü (versiyon 8) ve MATLAB kullanılmıştır. Sık kullanılan analizlere ek olarak (yani, anlatımı farklılaşmış genler analizi ve işaretçi metabolitlerin belirlenmesi), prostat kanseri metabolizmasını ayrıntılı olarak değerlendirmek için iki ağ bağlantılı analiz çerçevesi ile oluşturulan metabolik model değerlendirilmiştir.

Öncelikle, GEM'lerin belirli bir biyolojik fonksiyonu gerçekleştirmek için gerekli genleri veya reaksiyonları belirlemek için kullanıldığı gereklilik (essentiality) analizi yapılmış ve 23 esas gen belirlenmiştir. Bu esas genler, ekspresyonu farklılık gösteren genlerden bağımsız olarak tümör büyümesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip, anahtar genler olarak tahmin edilmiştir. Esas genler için yapılan fonksiyonel zenginleştirme analizi, bu genlerin, zymosterol biyosentezi (FDFT1, SQLE, LSS, CYP51A1, NSDHL, HSD17B7, DHCR24) ve kolesterol üretimi (DHCR24, DHCR7, SC5D, EBP) ile ilişkili genler dahil olmak üzere steroid biyosentez yolunda zenginleştirilmiş olduğunu göstermektedir. MVD, HMGCR, MVK ve PMVK, hem terpenoid biyosentezinde hem de mevalonat yolunda zenginleştirilmiş genlerdir.

DIRAC algoritması ise, tümör ve tümörsüz olarak seçilen iki fenotip için biyolojik ağları arasındaki farklılıklarını ölçmeye yarayan popülasyon düzeyinde karşılaştırmalı bir testtir. Bir anlamda çeşitli biyolojik yolların nicelleştirilmesi için kombinatoryal etkileşimlerin değerlendirilmesine izin verir. Analiz sonucunda, lipid metabolizmasının (ve daha spesifik olarak glikosifingolipid biyosentezi, eter lipid metabolizması ve steroid biyosentezi) prostat kanserinde kansersiz prostat dokusu ile karşılaştırıldığında değişken olarak ifade edildiği ortaya çıkmıştır. Ek olarak, tümör örneklerinde riboflavin metabolizması, pentoz fosfat yolu ve tiroid kanseri yolağı ön plana çıkmaktadır. Bu gözlemler, steroid biyosentezin önemini vurgulamıştır (Şekil 3). Steroid biyosentez yolu sadece normal prostat gelişimi için değil aynı zamanda prostat kanserinin ilerlemesi için de büyük önem taşımaktadır (Sharifi ve Auchus, 2012).

Farklı analizlerden elde edilen tutarlı sonuçlar, oluşturulan metabolik modelin temsili işlevselliğini ortaya çıkarmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar, prostat tümörlerinin esas olarak ortaya çıktığı prostat tümörlerinin çevrelerinde kolesterol ve steroid biyosentezine yol açan bu genlerin önemli bir oranının olduğunu göstermiştir (Kadhi vd., 2017; Sinnott vd., 2015). Prostat kanseri metabolizmasının çalışmanın içinde ve başka çalışmalarla arasındaki tutarlılığına ek olarak, bu anahtar genler ve bunların ilişkili yolları ilaç keşfi veya ilaç repozisyonu için bir fırsat sunmaktadır. Örneğin, statinler gibi lipid düşürücü ilaçlar prostat kanseri ile ilişkili mortaliteyi azaltmada ve genel tümör riskini azaltmada yararlı bir etki göstermiştir (Turanlı vd., 2018).

Çalışmada metabolik gen imzalarının tersine dayalı bir ilaç repozisyonu hedeflenmiştir. Bu maksatla, metabolik model içerisinde tanımlanan anlatımı farklılaşmış genler, metabolik gen imzaları olarak tanımlanmıştır. Bu genlerin KEGG biyolojik yollarında araştırılması, özellikle lipid yollarında (örneğin, sifingolipid, eter lipid, gliserofosfolipid ve gliserolipid metabolizması), antibiyotiklerin ve peroksizomun biyosentezinde p-değeri<0,05 anlamlılık düzeyinde zenginleşme eğiliminde olduklarını göstermektedir. DIRAC tarafından ortaya konulan gözlemlere ve zenginleştirme analize ek olarak, bu genler ayrıca glutatyon, P-alanin, pürin metabolizması, arginin-prolin metabolizması, müsin tip O-glikan biyosentezi ve ilaç metabolizması-sitokrom P450 gibi diğer yollarında da yer almaktadırlar. Bu sonuçlar, tüm protein kodlayıcı genlerin bir alt grubunu temsil etmesine rağmen, prostat kanseri modelinde bulunan metabolik genlerin, hala terapötik hedefleme için hastalık metabolizmasını ve anahtar metabolik yolları yakalayabildiğini göstermektedir.



Şekil 3. *In silico* modelleme sonuçları ve prostat kanserinde anahtar yollardan biri olarak steroid biyosentezi yolağı. A) TCGA'dan alınan transkriptom verisi ile HPA'dan alınan proteom verisinin protein-kodlayan genler açısından karşılaştırılması. B) Farklı düzeylerdeki metabolik gen sayıları. C) Prostat kanserine özgü GEM ile iCancerCore modelindeki gen sayıları. D) Prostat kanserine özgü GEM ile iCancerCore modelindeki tepkişme sayıları. E) ve F) Prostat kanserine özgün GEM'in gen ve tepkime sayıları açısından kapsamı. G) Yolak seviyesindeki kat değişimleri (FC) (p-değeri<0.05). H) 23 esas genden 11'inin içeren KEGG steroid biyosentez yolağı

İlaç repozisyonu yapılabilmesi için, çeşitli ilaçların 274 yukarı ve 367 aşağı düzenlenmiş olmak üzere toplam 641 gen üzerindeki etkileri CMap2 verilerinde taranmıştır. CMap2, farklı kanser hücre dizileri üzerinde gerçekleştirilen 1309 ilaç pertürbasyon deneyi için 6100 gen ekspresyon profili içerir (Lamb vd., 2006). İlaçların etki derecesi, CMap2'de girdi olarak

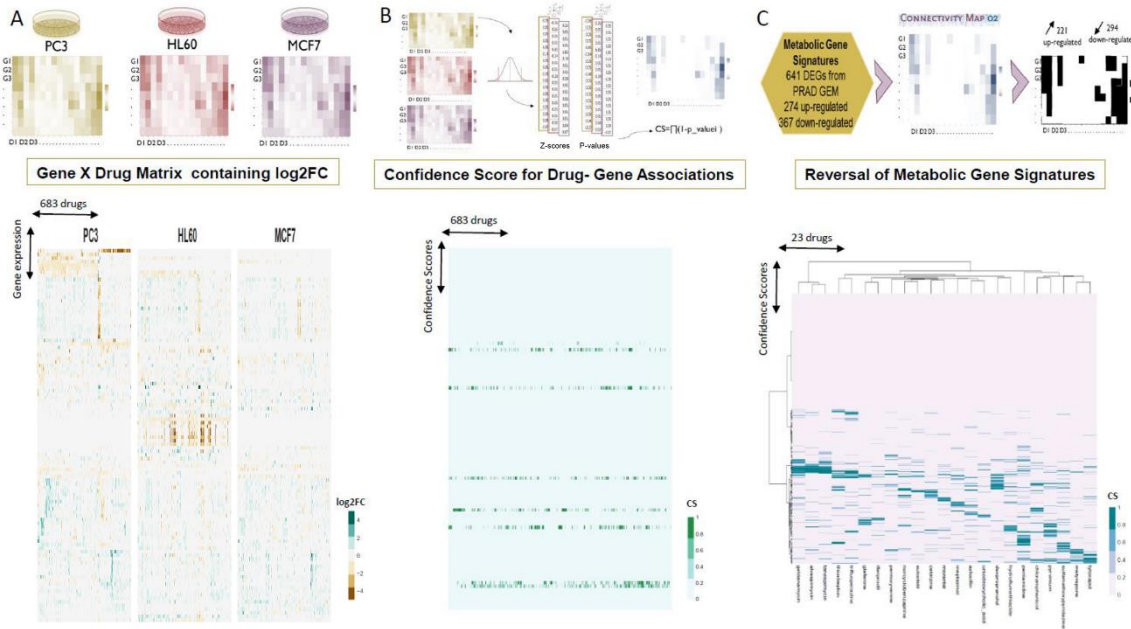
sorgulanan metabolik gen ifadesi profillerine göre, Kolmogorov-Smirnov (KS) benzerlik skorları ve rastgele permütasyon testine bağlı istatistiksel anlamlılıklarına (p değeri) göre hesaplanmıştır. Pozitif bir benzerlik puanı, ilaca bağlı ifade profilinin sorguya benzerliğini, negatif bir puan ise tersini göstermektedir. P değeri ise, rastgele bir imza verildiğinde aynı ilişkiyi bulma olasılığını gösterir. Prostat kanserinde metabolik imzaların tersine çevrilmesi için negatif benzerlik skoruna ve düşük p değerine (p değeri <0.05) sahip önemli ilaçlar, ilaç adayları olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda, negatif skora sahip ilaçlardan istatistiksel olarak anlamlı olan (p-değeri $<0,05$), 43 tane ilaç adayı belirlenmiştir.

In silico olarak ilaç etkinliğini test etmek için, önce ilaç-gen ilişkilerinin belirlenmesi gerekmektedir. Hem tedavi edici etkisini ön gördüğümüz 43 ilacı daha fazla filtrelemek hem de yeni ilaç-gen etkileşimlerini belirleyerek metabolik model üzerinde denemek amacıyla ilaçla ilişkili gen ekspresyon profilleri aşağıdaki gibi bütünleştirilmiştir: CMap2 (Build 02, <https://portals.broadinstitute.org/cmap/>) veri setlerinin (HT-HG U133A) arasından, HL60 (İnsan promyelositik lösemi), MCF7 (İnsan göğüs adenokarsinomu) ve PC3 (İnsan prostat kanseri) olmak üzere 3 hücre hattı için veri setler elde edilmiştir. Tüm analizler her hücre hattı için ayrı ayrı yapılmıştır. Ham veriler, gcrma paketi (<https://bioconductor.org/packages/>) kullanılarak R'de işlenmiştir (Iskar vd., 2010). Normalizasyondan sonra, en yüksek konsantrasyona sahip tek bir tedavi, gen ifadesi en yüksek korelasyonları gösteren tedavilere dayanılarak seçilmiştir. Hiyerarşik kümelenmeye dayanan analiz sonrası, aykırı değerler ve ortalama gen ifadesi, kontroller arasında hesaplanmıştır. Bu yaklaşım, 683 tedavi örneği ve hücre hattı başına tek bir kontrol ile sonuçlanmıştır. Daha sonra, her hücre-gen etkileşimine göre güven skoru, üç hücre hattından Log2 FC değerleri kullanılarak hesaplanmış, her ilaç için yaklaşık 12.300 gen ve 683 ilaçtan oluşan Log2FC içeren ilaç gen matrisi değerlendirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uyduğu görülmüş ve standart z-skorları, her bir ilaç-gen çiftinin matrisindeki üç hücre hattı için ayrı ayrı hesaplanarak p-değerine dönüştürülmüştür. Her bir hücre hattından gelen bilginin bütünleştirilmesine dayanarak her bir ilaç-gen çiftinin bir güven skorunu hesaplamak için Bayes formülü kullanılmıştır. Düşük p-değerine sahip etkileşimlerde, güven puanı 1'e yaklaştığı için; $CS>0.5$ kriteri yüksek güven seviyesi olarak kabul edilmiştir.

Veri uyumu ve filtreleme işleminden sonra, üç hücre hattındaki (PC3, HL60 ve MCF7) 683 ilaçta yaklaşık 12300 gen için ilaçların genin ekspresyonuna etkisi log2 kat değişikliği (FC) ve güven puanı (CS) olarak hesaplanmıştır. Her ilaç için kontrol edilen 12228 genden kriter uyan gen sayıları 24 ile 97 arasında değişiklik göstermiştir. Metabolik gen seti, güven puanını içeren 683 ilaçla 515 genden oluşan bir etkileşim matrisi üzerine haritalandığında, 43

negatif skora sahip aday ilaçtan sadece 23 tanesinin 683 tane gen-ilaç etkileşim bilgisine sahip olduğumuz veriyle örtüştüğü görülmüştür (Şekil 4).

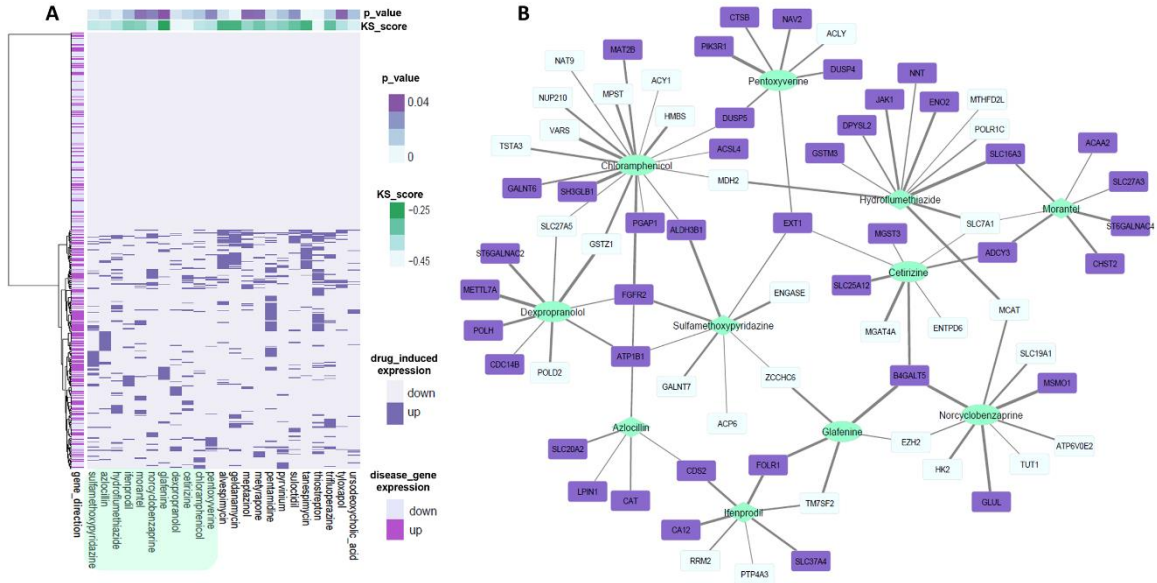
Metabolik model üzerinden gerçekleştirilen benzetimler sırasında ilaçların prostat tümör metabolik modelinde etkisini test etmek için, amaç fonksiyonu olarak biyokütle üretimi seçilmiştir. İlacın etkileşim gösterdiği genleri içeren tepkimeler bulunup, PRAD gen ekspresyon verilerinin tersi olacak şekilde reaksiyonların akı değerlerinin, alt ve üst sınırları % 20 oranında artırılmış veya azaltılmıştır. Belirlenen kısıtlar içinde amaç fonksiyon değerinin maksimize edilmesi için lineer programlama algoritması uygulandıktan sonra, metabolik model üzerinde inhibitör etki gösteren ilaçlar prostat kanseri tedavisi için ilaç adayları olarak sunulmuştur. Bu analizler sonucunda, 23 ilaç adayının metabolik gen setindeki genlerin anlatımının tersine ilaç etkisi gösterdiği görülmüş ve olası aday ilaçlar olarak değerlendirmeye alınmıştır (Şekil 5).



Şekil 4. İlaç repozisyonunda takip edilen yol ve ara sonuçlar. A) 3 hücre hattında (PC3, HL60, MCF7) ilaçların gen anlatım seviyelerine etkilerini gösteren ısı haritaları (log2FC > 0.2 kriterini sağlayan genler gösterilmiştir). B) Her hücre hattında ilaç-gen etkileşimleri için hesaplanan güven skorları ve p-değerlerine çevrilmesi. C) Ters yönde metabolik etki gösteren 23 ilaç ile 515 metabolik gen imzasının güven skorları.

Bu çalışmada önerilen etkileşimlerin ve ilaç hedeflerinin, çözünmüş taşıyıcı (SLC) proteinleri (örneğin, SLC19A1), büyüme faktörleri (örneğin, FGFR) veya karbonik anhidrazlar (CAs, EC 4.2.1.1) ve glutatyon S-transferazlar (GSTler, EC 2.5.1.18; GSTM3, GSTM4, GSTZ1 ve MGST3) gibi enzimler gibi bilinen anti-kanser ilaç hedeflerine sahip benzer bir protein

ailelerine mensup olduğu görülmüştür. Tüm belirlenen hedefler arasında (CS>0.5), %10 SLC protein ailesindendir.



Şekil 5. Tespit edilen aday ilaçlar. A) 23 aday ilacın 515 imza genin anlatımına etkisini gösteren ısı haritası, KS benzerlik skorları ve p-değerleri. B) 11 aday ilaç işe 71 gen (CS>0.5) için ilaç-gen etkileşim ağı.

4.3.3 İlaç repozisyonu sonuçlarının kapsamlı değerlendirilmesi ile ilaç adaylarına karar verilmesi

Gerek mevcut web araçları kullanılarak gerçekleştirilen, gerekse prostat kanserine özgü genom ölçekli metabolik model üzerinden gerçekleştirilen ilaç repozisyonu çalışmaları neticesinde çok sayıda ilaç adayı tespit edilmiştir. Bu aday ilaçlar, prostat kanseri ile daha önce ilişkilendirilmiş mi diye bulmak için PubMed üzerinden kapsamlı bir literatür taraması yapılmıştır. Literatür taraması, gözlemlerimize olan güvenimizi daha da güçlendirerek, prostat kanseri tedavisi için bu çalışmada önerilen ilaçlardan 12'sinin zaten prostat kanseri tedavisinde önerildiği veya test edildiği görülmüştür. Bu sonuçları gelecek analizler için pozitif kontrol olarak kabul ederek kalan ilaçlara yoğunlaşıldığında, diğer kanserle ilgili mevcut çalışmalar, ilaç etki mekanizması bilgisi, etkileşimde bulunduğu proteinler ve bu proteinlerin kanserleşme mekanizmaları ile ilişkisi, ilacın temin kolaylığı ve benzeri açılardan ilgili literatür ve veri bankaları (DrugBank, PharmGKB, KEGG Drugs, vb.) çerçevesinde değerlendirilerek 11 ilacın daha önce prostat kanseri için anti-kanser ajan olarak tanımlanmadığı ve deneysel çalışmalar için uygun olabileceği değerlendirilmiştir. Bunlar

arasında, anti-bakteriyel, anti-helminetik ve anti-protozoal ajanlar, diüretikler, opioidler, p-adrenerjik antagonist ve NMDA reseptör inhibitör tipleri dahil olmak üzere çeşitli ilaç grupları vardır.

Çalışmanın ilerleyen safhalarında, 11 aday ilacın gen/protein etkileşimlerine odaklanılmış olup ilaç hedeflerinin, antibiyotiklerin biyosentezi, amino asitlerin biyosentezi, gliksilat ve dikarboksilat metabolizması ve kanserde merkezi karbon metabolizması gibi KEGG biyolojik yollarında zenginleşirken; O-glikan işleme, protein glikozilasyonu, uzun zincir yağ asidi metabolizması, sterol ve kolesterol biyosentezi, lipid metabolizması, glutatyon türevi biyosentez, defosforilasyon, folik asit metabolizması ve transportu Gene Ontology (GO) biyolojik süreçlerinde zenginleştiği görülmüştür.

Prostat kansere özgü metabolik model ile *in silico* hücre canlılığı testleri 11 ilaç için incelendiğinde, 5 ilacın (sülfametoksipiridazin, azlosilin, morantel, hidroflumetiyazid ve ifenprodil) tümör büyümesini %80-90 oranda inhibe ettiği görülmüş ve bu 5 ilaç deneysel çalışmalar için öncelikli adaylar olarak değerlendirilmiştir. Öte yandan, morantel, insanlar da dahil olmak üzere bir nörotransmitter olarak asetilkolin kullanan tüm organizmalar için toksik olduğundan (Holden-Dye, 2007), geçmişte insan tedavisinde kullanılmadığından ve günümüzde temininde büyük güçlükler çekilmekte olduğundan çalışmanın ilerleyen deneysel safhalarında aday bir ilaç olarak değerlendirilmemiştir. Yerine benzetimlerde diğer bir aday ilaç olarak karşımıza çıkan “zenarestat” çalışmaya dahil edilmiştir.

4.4 Aday ilaçların prostat kanseri hücre hatlarında sitotoksik etkisinin araştırılması

4.4.1 Hedef ilaçlara yönelik deneysel çalışmaların tasarımı

Çalışmada, ilgili literatür dikkate alınarak, prostat kanserinde klinik açıdan önemli farklı özellikler gösteren üç kanser hücre hattı (LNCaP, PC3 ve 22Rv1) ile bir kontrol grubu hücre hattı (RWPE1) kullanılması planlanmıştır: RWPE1 (ATCC-CRL-11609) immortalize edilmiş normal insan prostat epitel hücreleridir ve çalışmada kontrol grubu olarak kullanılmaktadır. LNCaP (ATCC-CRL-1740) prostat kanserinin metastaz yaptığı lenf nodlarından izole edilmiş androjen reseptörü pozitif (AR+) bir hücre hattıdır. PC-3 (ATCC-CRL-1435) prostat kanserinin metastaz yaptığı kemik dokularından izole edilmiş androjen reseptörü negatif (AR-) bir hücre hattıdır. 22Rv1 (ATCC-CRL-2505) immun yetersizliği olan farede ksenogrefte edilmiş insan primer prostat karsinom hücreleri olan androjen reseptörü pozitif (AR+) bir hücre hattıdır.

Ayrıca, androjen reseptörünün overeksprese olduğu, prostat kanserinin metastaz yaptığı omurgadan izole edilen VCaP (ATCC-CRL-2876) hücre hattının deney grubu olarak kullanılması planlanmış ve bu amaçla hücreler kültür ortamına alınmıştır. Ancak, hücreler tüm optimizasyon çalışmalarına rağmen büyütülemedi. Çalışmada, metastatik özellikte AR+ olan hücre hattı LNCaP sağlıklı bir şekilde büyütüldüğü için ATCC'den yeni bir VCaP hücre hattı sipariş edilmemiştir. Bunun yerine daha önce çalışmada öneri metninde kullanılması planlanmayan ancak *in silico* çalışmalarda kullanılan veri setlerinin de özelliklerini daha iyi yansıtmaları açısından primer prostat kanseri hücre modeli olarak 22Rv1'in kullanılmasına karar verilmiştir. Tüm hücre hatları ATCC hücre bankasından temin edilmiştir.

RWPE1 hücreleri inek hipofiz bezi ekstresi (BPE- bovine pituitary extract) ve insan rekombinant epidermal büyüme faktörü (EGF) içeren özel serum olmayan keratinosit (Keratinocyte Serum Free Medium (K-SFM) Kit, (Katalog no. 17005-042, GIBCO) besiyeri, LNCaP, PC3 ve 22Rv1 hücreleri RPMI-1640 (Katalog no. P04-16500, Pan Biotech) besiyeri, VCaP DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, katalog no. 30-2002, ATCC) besiyeri, %10 fetal sıgır serumu (FBS-fetal bovine serum, Katalog no. 10500-064, GIBCO) ve 1% penisilin-streptomisin (Katalog no. P06-07050, Pan Biotech) kullanılarak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Hücrelerin yoğunluğu büyütüldükleri petri kabında yaklaşık %70-80 oranına ulaştığında alt kültürleri (pasaj) yapılmıştır. Petrideki besiyeri çekildikten sonra yaklaşık 8-10 ml (10 cm'lik petri için) 1X PBS ile yıkama yapılmış, hücre-hücre ve hücre-yüzey bağlantılarını koparmak için hücrelerin üstüne 1-1.5 ml 1X Tripsin-EDTA (katalog no. P10-020100, Pan Biotech) eklenip yaklaşık 2-3 dk 37°C, %5 CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. Enzimatik reaksiyonu durdurmak için petri kabına besiyeri eklenip karışım pipetlenerek santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Oda sıcaklığında yaklaşık 1200 rpm'de 5 dk santrifüjün ardından üst sıvı çekilip ve belirlenen oranda seyreltmek amacıyla tüpün dibinde oluşan hücre pelletinin üstüne taze besiyeri eklenmiştir. Hücre çökeltisi homojen olarak dağıtıldıktan sonra taze besiyeri bulunan petrilere damla damla ilave edilip 37°C'de nemli, %5 CO₂ inkübatöründe büyümesi sağlanmıştır. Çoğaltılan hücreler %5 DMSO içeren bazal besiyeri ile dondurularak çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de mililitrede 10⁶ hücre olacak şekilde stoklanmıştır.

4.4.2 İlaçların IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi

Sitotoksosite deneylerine ilaçların IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi ile başlanmıştır. Sitotoksosite deneylerine ilk olarak N-Methyl-D-aspartate (NMDA) reseptör antagonisti olan İfenprodil ile başlanmıştır. Hücreler sayılarak 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta RWPE1 için 6 x

10³ hücre/ kuyu, PC-3 için 8 x10³ hücre/ kuyu, LNCaP ve 22Rv1 için 12 x 10³ hücre/ kuyu olacak şekilde besiyeri ortamına ekildi ve yapışmaları için inkübasyona bırakıldı. Farklı çözücülerde çözülerek hazırlanmış olan İfenprodil (12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µM), Hydroflumethiazide (10, 100, 250, 500, 750, 1000 µM), Azlocillin (100,200,300,400,500,600,700 µM), Sulfamethoxypyridazine (10,100, 250, 500,750 ve 1000 µM) ve Zenarestat (10, 100, 250, 500, 750, 1000 µM) stok solüsyonlarından hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak her bir ilaca özgü parantez içinde belirtilen çalışma konsantrasyonları hazırlandı ve hücrelere uygulandı. Kontrol grubundaki hücrelere de çözücüye bağlı olarak %0.1 oranında aseton (Hydroflumethiazide), %0.1 dH₂O (Azlocillin), %0.1 DMSO (Sulfamethoxypyridazine ve Zenarestat) içeren besiyeri uygulandı. Daha sonra plakalar 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlara bırakıldı.

İnkübasyon sonrası canlılık belirlemeleri Alamar Blue (AB) cell viability reagent (Katalog no. DAL1100, Thermo Fisher) kullanılarak yapıldı. Her bir kuyucuğa 10 µL AB eklenerek 370C'de 1-4 saat inkübe edildi. Spektrofotometrede (Synergy H1, Biotek) 570 nm ve 600 nm'de absorbans ölçümleri alındı. AB değerleri aşağıda verilen Formül 1 kullanılarak negatif kontrol grubuna göre normalize edildi.

Elde edilen veriler ile her hücre hattı için 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonunda IC₅₀ değerleri (Tablo 8) hesaplandı. Hesaplamalar ve verilerin istatistiksel analizi için GraphPad Prism (versiyon 7.0) programı kullanıldı.

Tablo 8'de boş gösterilen sonuçlar IC₅₀ hesaplamalarının yapılamadığı ya da GraphPad Prism programının çok yüksek değerler verdiği durumları ifade etmektedir. Tablo 8'de gösterilen sonuçlar ışığında her bir ilaç özelinde aşağıdaki yorumlar yapıldı ve sürecelecek çalışmalarda kullanılacak ilaçlara karar verildi.

İfenprodil: Tüm hücreler ve uygulama saatleri dikkate alındığında en anlamlı sonuçlar 24 saatlik uygulama sonucunda görüldü (Tablo 9). Kontrol grubu hücresi olarak kullanılan RWPE1 için IC₅₀ 905 olup ilacın bu hücrelere etki etmediğini gösterdi. PC3 ve LNCaP için daha düşük değerler elde edilmiş olmakla birlikte en düşük değer 22RV1 için hesaplandı.

Tablo 8. Aday ilaçların prostat kanser hücre hatlarında belirlenen IC₅₀ değerleri

İlaçlar (24 saat inkübasyon)	RWPE 1	PC 3	22 RV1	LNCaP
Ifenprodil	905.0	275.0	76.9	370.2
Hydroflumethiazide	904.7	66.71	275.7	244.7
Azlocillin	596.3	121.1	444.4	51.4
Sulfamethoxypyridazine	-	-	-	-
Zenarestat	335.8	778.5	-	209.6
İlaçlar (48 saat inkübasyon)	RWPE 1	PC 3	22 RV1	LNCaP
Ifenprodil	831.0	834.0	527.1	826.0
Hydroflumethiazide	869.0	-	81.32	29.15
Azlocillin	684.4	527.5	1322.0	646.5
Sulfamethoxypyridazine	-	34.54	-	22.78
Zenarestat	133.3	270.8	-	206.0
İlaçlar (72 saat inkübasyon)	RWPE 1	PC 3	22 RV1	LNCaP
Ifenprodil	836.0	830.1	300.6	370.9
Hydroflumethiazide	114.4	754?	640.1	33.18
Azlocillin	24.48	18.51	18.29	5504
Sulfamethoxypyridazine	-	42.08	140.7	744.3
Zenarestat	140.5	245.1	-	183.2

Tablo 9. İfenprodil uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerleri

RWPE 1	PC 3	22 RV1	LNCaP	Süre
905.0	275.0	76.9	370.2	24 saat
831.0	834.0	527.1	826.0	48 saat
836.0	830.1	300.6	370.9	72 saat

Hydroflumethiazide: Tüm hücreler ve uygulama saatleri dikkate alındığında en anlamlı sonuçlar 48 saatlik uygulama sonucunda görüldü (Tablo 10). Bu sürede RWPE1 için IC₅₀ 869'dur ve ilacın hücrelere etkisinin 22RV1 (IC₅₀ 81.32) ve LNCaP (IC₅₀ 29.15)'e kıyasla olmadığını düşündürdü. Ancak 48 saatlik uygulama sonundaki hesaplamada PC3 için anlamlı bir değer bulunamadığı için 24 saatlik uygulamada elde edilen IC₅₀ dikkate alındı.

Tablo 10. Hydroflumethiazide uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerleri

RWPE 1	PC 3	22 RV1	LNCaP	Süre
904.7	66.71	275.7	244.7	24 saat
869.0	-	81.32	29.15	48 saat
114.4	754.0	640.1	33.18	72 saat

Azlocillin: Her bir hücre hattı için 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonunda IC₅₀ değerleri oldukça yüksek hesaplandı ve özellikle 48 saatlik uygulamada ilacın kanser hücrelerini çok etkilemediği düşünüldü. 72 saatlik uygulamada kanser hücre hatları PC3 ve 22RV1 için IC₅₀ değerleri düşük olmakla birlikte, RWPE1 için de düşük bir değer bulunduğu için 72 saatlik uygulamanın kontrol hücrelerini de etkilediği düşünüldü. LNCaP için çok yüksek bir değer hesaplandı.

Tablo 11. Azlocillin uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerleri

RWPE 1	PC 3	22 RV1	LNCaP	Süre
596.3	121.1	444.4	51.4	24 saat
684.4	527.5	1322.0	646.5	48 saat
24.48	18.51	18.29	5504.0	72 saat

Sulfamethoxypyridazine: Antibakteriyel bir ilaç olan sulfamethoxypyridazine uygulaması sonucunda özellikle kontrol grubu olarak kullanılan RWPE1 için her üç saat (24, 48 ve 72) uygulaması için anlamlı bir IC₅₀ değeri hesaplanamadı (Tablo 12). Diğer kanser hücre hatları için de kendi içinde tutarlı IC₅₀ değerleri bulunamadı. Örneğin LNCaP hücre hattı için 48 saatte IC₅₀ 22.78 iken, 72 saatte IC₅₀ 744.3 olarak hesaplandı. 22RV1 için sadece 72 saatte IC₅₀ hesaplandı. PC3 için 48 ve 72 saatlik IC₅₀ değerleri birbiri ile tutarlı olmakla birlikte kontrol hücrelerine ait IC₅₀ değerleri olmadığı için tam bir yorum yapılamadı.

Tablo 12. Sulfamethoxypyridazine uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerleri

RWPE 1	PC 3	22 RV1	LNCaP	Süre
-	-	-	-	24 saat
-	34.54	-	22.78	48 saat
-	42.08	140.7	744.3	72 saat

Zenarestat: İlaç uygulamasının her üç farklı sürede özellikle kontrol grubu hücreleri RWPE1'leri, PC3 ve LNCaP hücrelerine göre daha çok etkilediği görüldü (Tablo 13). Deneysel çalışmalar sırasında 22RV1 hücreleri yeterli sayıda olmadığı için ilaç bu hücre

hattına uygulanmadı. Ancak zaten kontrol grubu hücreleri etkilendiği için uygulamanın 22RV1’de devam ettirilmemesine karar verildi.

Tablo 13. Zenarestat uygulanan hücrelerde IC₅₀ değerleri

RWPE 1	PC 3	22 RV1	LNCaP	Süre
335.8	778.5	-	209.6	24 saat
133.3	270.8	-	206.0	48 saat
140.5	245.1	-	183.2	72 saat

4.4.3 Alamar Blue Yöntemi ile Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

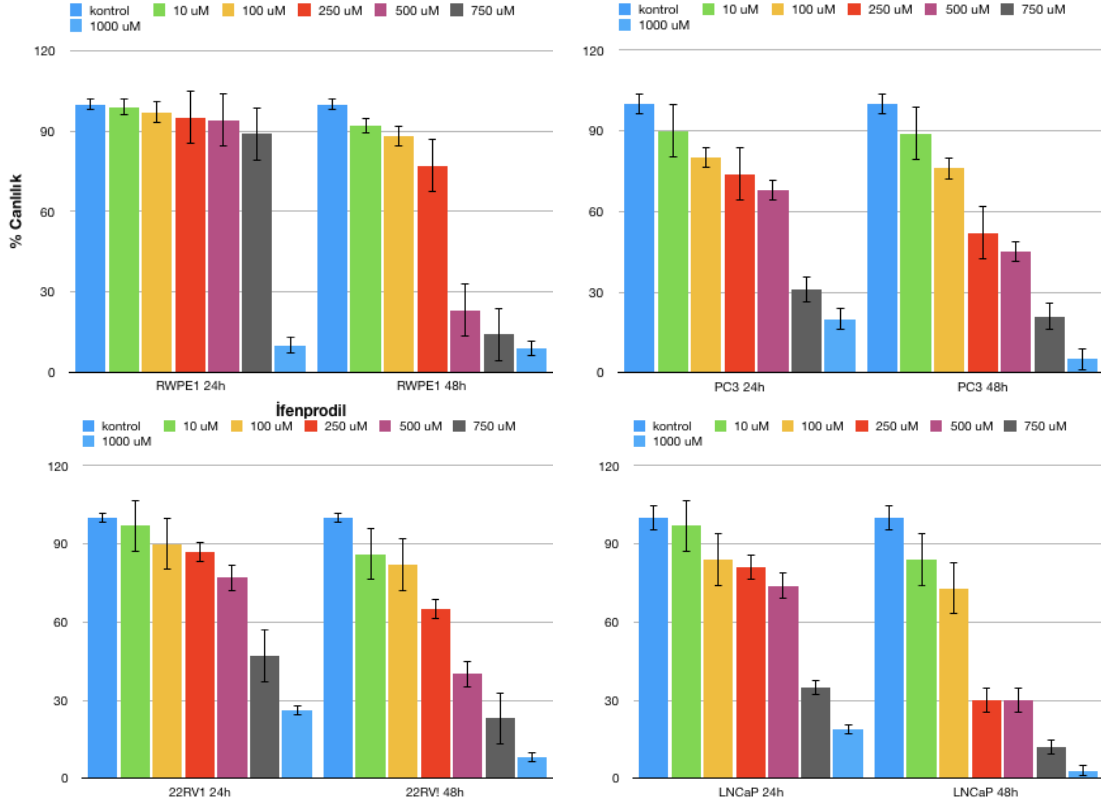
Her bir ilacın hücrelere sitotoksik etkisi alamar blue kullanılarak belirlendi.

İfenprodil: Şekil 6’da görüldüğü gibi, ifenprodilin RWPE1 hattı üzerinde özellikle 24 saatte sitotoksik etkisinin çok olmadığı görüldü. PC3, 22RV1 ve LNCaP hücre hatları için ifenprodilin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki yaptığı ve hücre proliferasyonunun azaldığı tespit edildi.

Hydroflumethiazide: Hydroflumethiazide kullanımının RWPE1 hattı üzerinde özellikle 24 saatte sitotoksik etkisinin çok olmadığı görüldü (Şekil 7). PC3, 22RV1 ve LNCaP hücre hatları için Hydroflumethiazide konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksik etki yaptığı ve hücre proliferasyonunun azaldığı tespit edildi.

Azlocillin: Şekil 8’de görüldüğü gibi, RWPE1, PC3, 22RV1 ve LNCaP hücre hatlarının hiçbirisinde 24 saatlik azlocillin uygulamasının konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki yapmadığı ve hücre proliferasyonunu azaltmadığı tespit edildi.

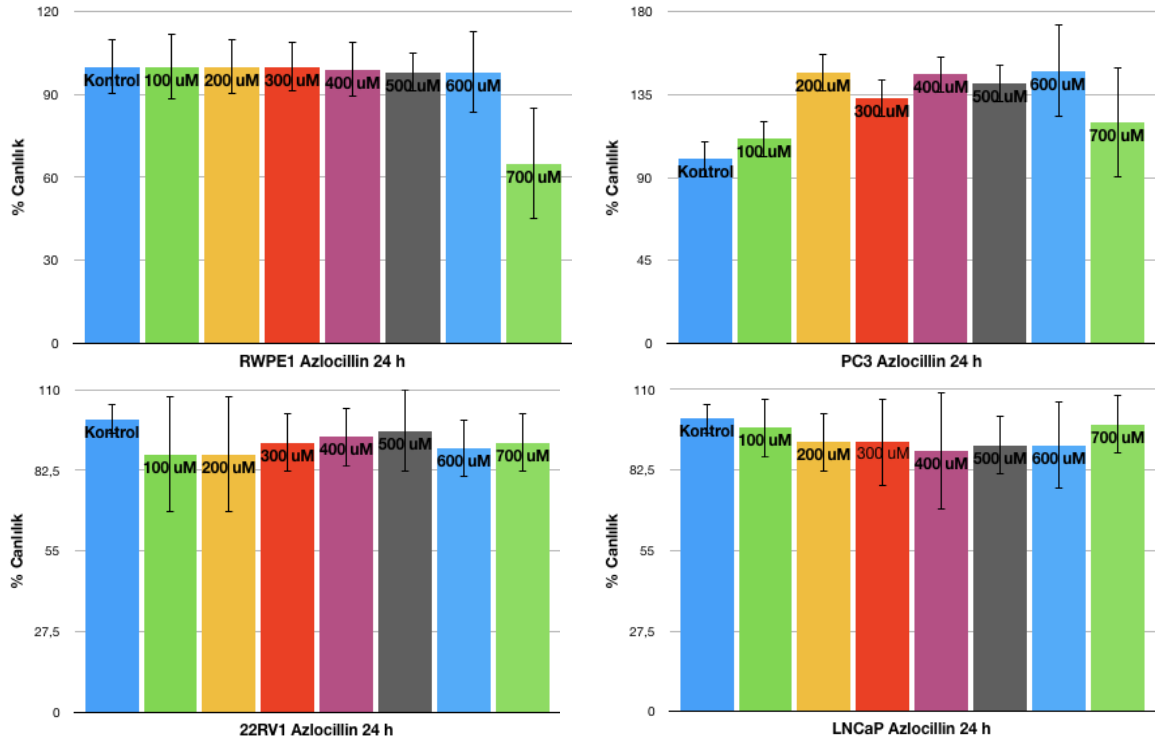
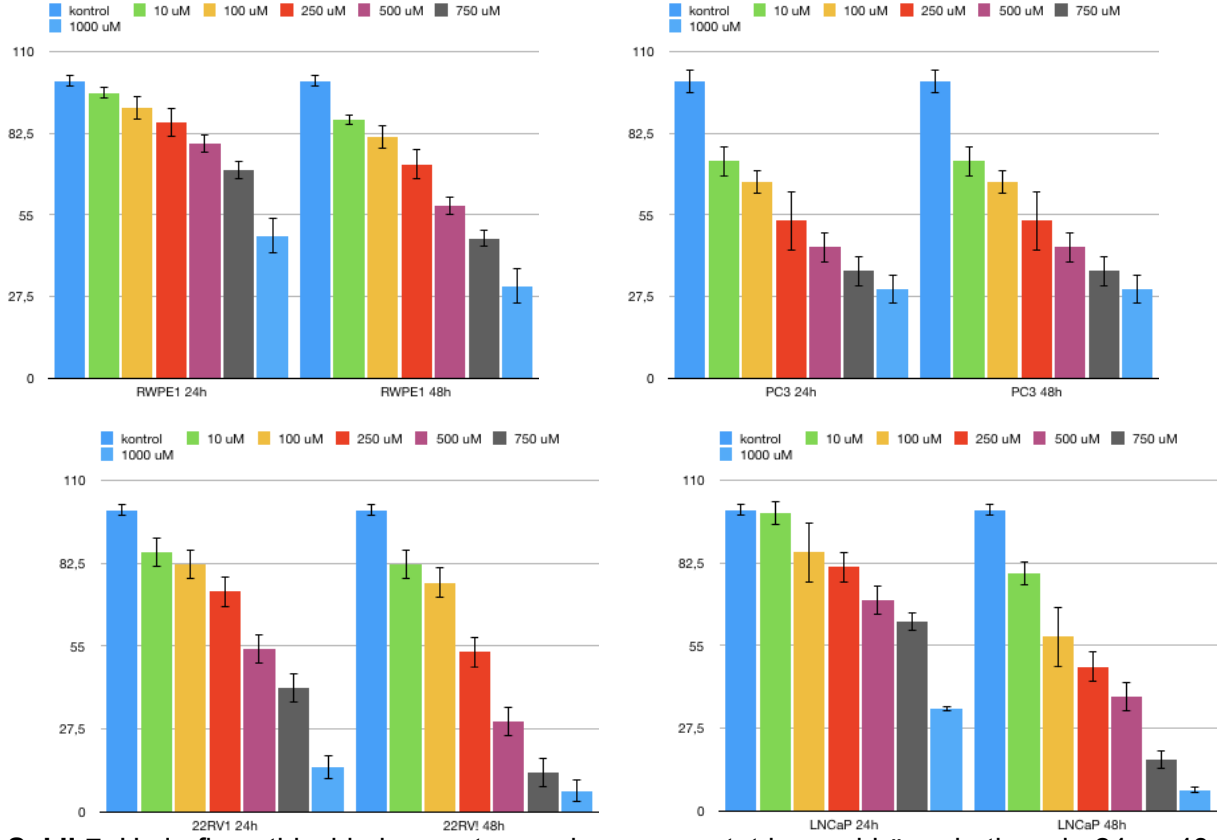
Sulfamethoxypyridazine: Şekil 9’da görüldüğü gibi, RWPE1, PC3, 22RV1 ve LNCaP hücre hatlarının hiçbirisinde 24 saatlik sulfamethoxypyridazine uygulamasının konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki yapmadığı ve hücre proliferasyonunu azaltmadığı tespit edildi.

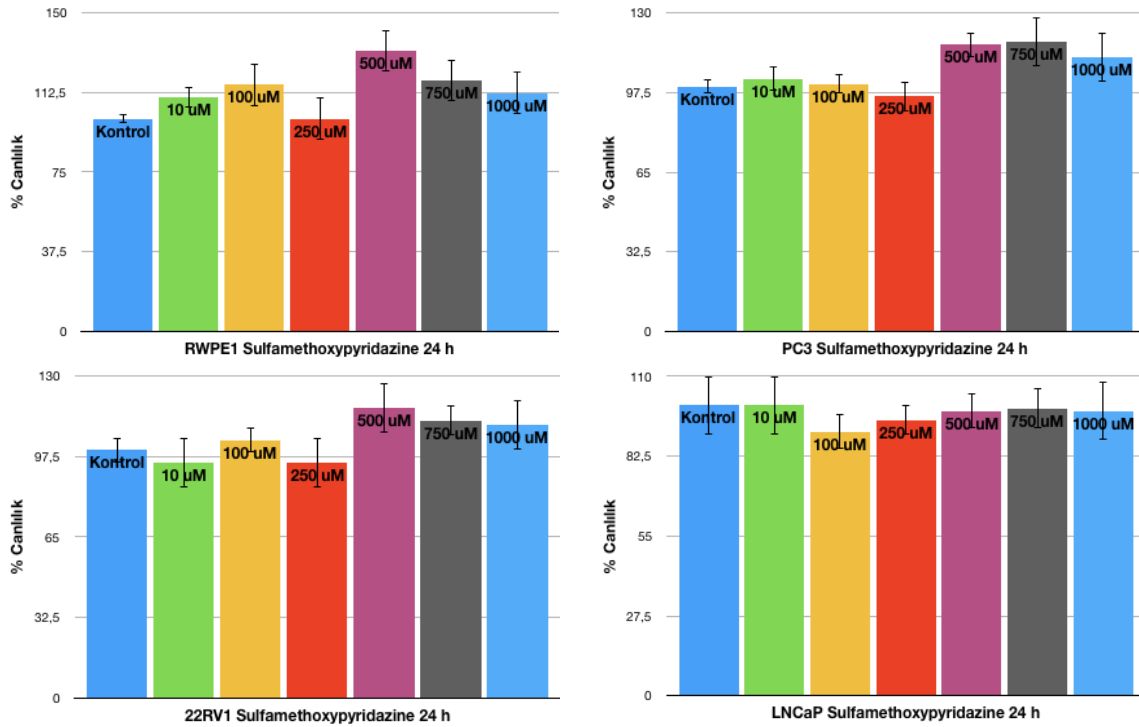


Şekil 6. İfenprodil konsantrasyonlarının, prostat kanseri hücre hatlarında Alamar Blue absorpsiyon sonuçlarına göre 24 ve 48. saat % hücre canlılık grafikleri (Kontrol: medyum içinde % 0.1 DMSO)

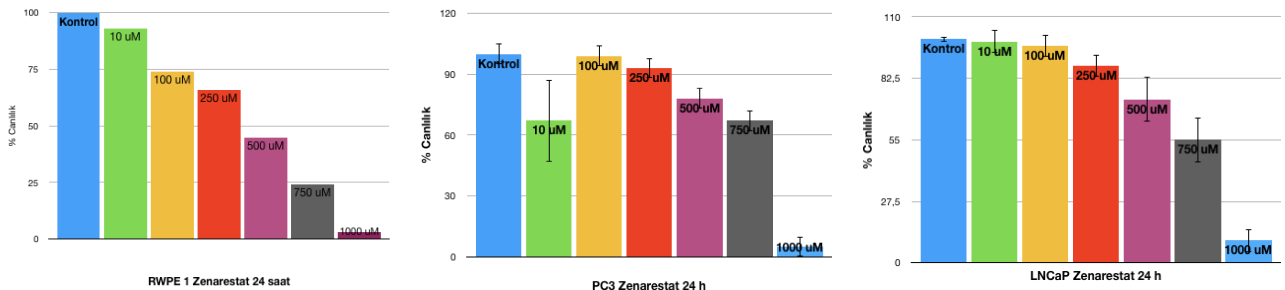
Zenarestat: Zenarestat kontrol grubu RWPE1 için sitotoksik etki gösterip hücre proliferasyonunu azalttı (Şekil 10). PC3 ve LNCaP hücre hatlarının hiçbirisinde 24 saatlik zenarestat uygulamasının konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki yapmadığı ve hücre proliferasyonunu azaltmadığı tespit edildi.

Bu sonuçlar ışığında, IC₅₀ değerleri ve sitotoksite analizleri dikkate alınarak proje kapsamında yapılması planlanan ileri deneylere İfenprodil ve Hydroflumethiazide ile devam edilmesine karar verilmiştir.





Şekil 9. Sulfamethoxypyridazine konsantrasyonlarının, prostat kanseri hücre hatlarında 24. saat % hücre canlılık grafikleri (Kontrol: medyum içinde % 0.1 DMSO)

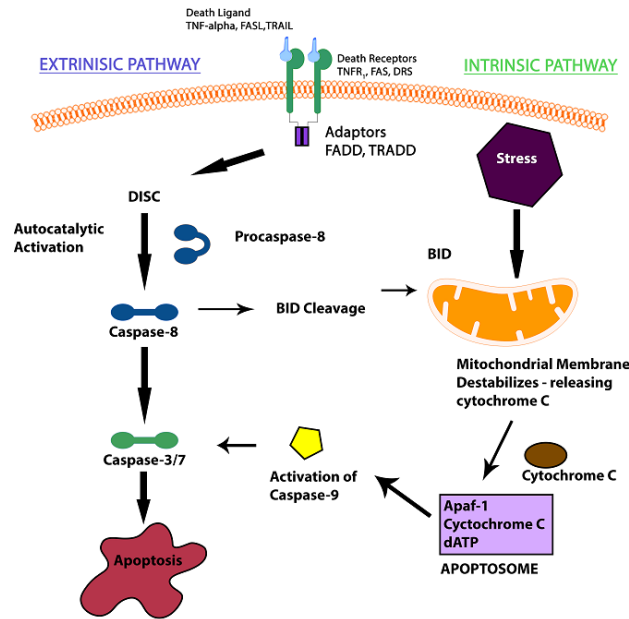


Şekil 10. Zenarestat konsantrasyonlarının, prostat kanseri hücre hatlarında 24. saat % hücre canlılık grafikleri (Kontrol: medyum içinde % 0.1 DMSO)

4.5 Kaspaz aktivasyonları ile aday ilaçların Apoptotik etkisinin belirlenmesi

Kaspazlar gerek ölüm reseptörleri aracılığı ile gerekse mitokondriyal apoptozda görev alan proteazlardır. Apoptoz hücre içinden veya hücre dışından gelen ölüm sinyalini aldıktan sonra proteazların (kaspaz) aktivasyonunu içeren hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptotik süreçte rol oynayan kaspazlar üç gruba ayrılır. (1) Başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2,8,9,10), (2) Efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7), (3) İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14).

Kaspaz 3,6 ve 7 apoptozun başlatılmasında görevli değildir ve apoptoz sinyalini güçlendirip hücresel bozulmaya aracılık ederler. Kaspaz 8 ve 9 başlatıcı kaspazlardır ve kaspaz 8 apoptozun hücre dışı yolağın, kaspaz 9 apoptozun hücre içi yani mitokondri yolağından başlatıldığını belirtir. Kaspaz-3, apoptoz mekanizmasının tamamlanma fazında yer alan ve apoptozun sonlandırılmasından sorumlu (sonlandırıcı) kaspazlardan biridir. Kaspaz-3 hem dışsal apoptotik yolak üzerinden, hem de içsel (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden aktifleşebilir. Kaspaz-3, kromatin kondensasyonundan, DNA fragmentasyonundan ve hücre iskeletine ait proteinlerin yıkımından sorumludur. Bu nedenle bir hücrede kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesi, o hücrenin apoptoza gittiğinin en önemli kanıtlarından biridir (Şekil 11).



Şekil 11. Apoptozun hücre içi ve hücre dışı yollarının basit şematik gösterimi.

İlaç maruziyeti sonrası apoptozun hangi yolak aracılığıyla başladığı ve apoptozun erken veya geç evrede olup olmadığının belirlenmesi için, Kaspaz 3/7, 8 ve 9 ölçümleri Cell Meter Multiplexing Caspase 3/7,8 and 9 activity assay floresan kit (Aat bioquest) kullanıldı.

RWPE1, PC3, 22RV1 ve LNCaP hücreleri 96 kuyucuklu tabakalara her kuyuda 100 µl besiyerinde kit protokolüne uygun olarak 20000 hücre olacak şekilde ekildi ve yapışmaları için bir gece boyunca CO₂ etüvde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her hücre hattı 24 saat süreyle belirlenen IC₅₀ değerlerinde hydroflumethiazide ve ifenprodil'e maruz bırakıldı (Tablo 14). Maruziyetin ardından kit protokolüne uygun olarak kaspaz belirteçleri eklendi ve floresan mikropate okuyucuda floresan ölçümleri alındı (Tablo 15, 16). Kaspaz seviyeleri her hücre hattı için kontrole göre normalize edildi.

Tablo 14. Hücrelerin ifenprodil ve hidroflumethiazide için 24 saat inkübasyonda IC₅₀ değerleri

Hücre hatları	Ifenprodil (µM)	Hydroflumethiazide (µM)
RWPE 1	905.8	904.7
PC 3	275.1	66.71
LNCaP	370.2	244.7
22RV1	76.9	275.3

Tablo 15. Kaspaz ölçümlerinde kullanılmak üzere RWPE-1 için revize edilen doz değerleri

Ifenprodil	80 µ M	300 µ M
Hydroflumethiazide	80 µ M	280 µ M

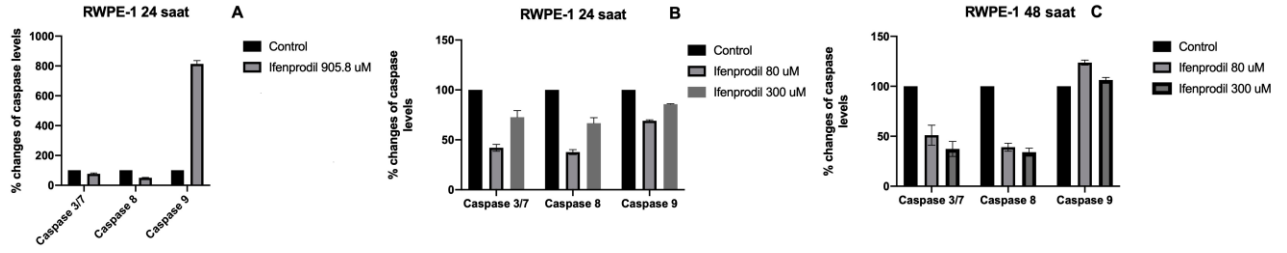
Tablo 16. Kaspaz 3/7, 8 ve 9 için spektral dalga boyları

Kaspaz	Floresans	Eksitasyon	Emisyon
Kaspaz 3 (Kaspaz 3/7)	Kırmızı	535 nm	620 nm
Kaspaz 8	Yeşil	490 nm	525 nm
Kaspaz 9	Mavi	370 nm	450 nm

4.5.1 Ifenprodil'in Kaspaz 3/7, 8 ve 9 Aktivasyonu ile Apoptotik etkisinin araştırılması

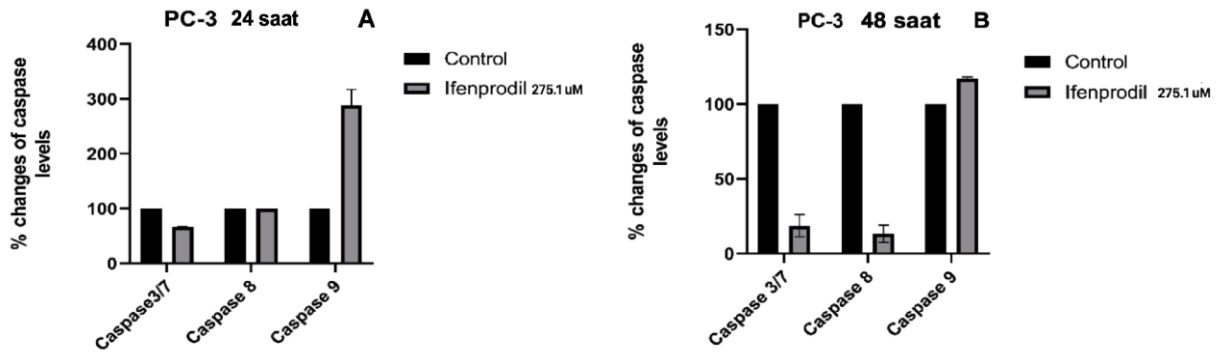
RWPE-1 kontrol hücre hattında 24 saatlik IC₅₀ (905.8 µM) değerinde ifenprodil uygulamasının ardından kaspaz 9 seviyesinde kontrole göre oldukça yüksek değerlerde artış gözlemlendi (Şekil 12A). Kaspaz 9 seviyesinde gözlemlenen bu artış Ifenprodil'in apoptozu hücre içi yolak vasıtasıyla indüklediğini göstermektedir.

Kemoterapötik dozlarda sağlıklı hücrelerde oluşabilecek etkilerin tahmin edilebilir olmasını sağlamak için çalışmada kullanılan diğer hücre hatlarının (PC3, 22RV1 ve LNCaP) IC₅₀ değerlerine yakın iki doz değeri (80 µM ve 300 µM) belirlendi. Bu doz değerlerinin 24 saatlik uygulamasının ardından RWPE-1 kontrol hücre hattında kaspaz seviyelerinde artış gözlemlenmedi. Bu sonuç, Ifenprodil'in prostat kanserinin tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırılması için yapılacak ileri çalışmalarda önemli bir dayanak noktası oluşturabilir. Aynı doz değerlerinin 48 saatlik uygulamasının ardından kaspaz 9 seviyelerinde kontrole göre 80 µM doz değerinde %20, 300 µM için % 5 lik artış gözlemlendi (Şekil 12).



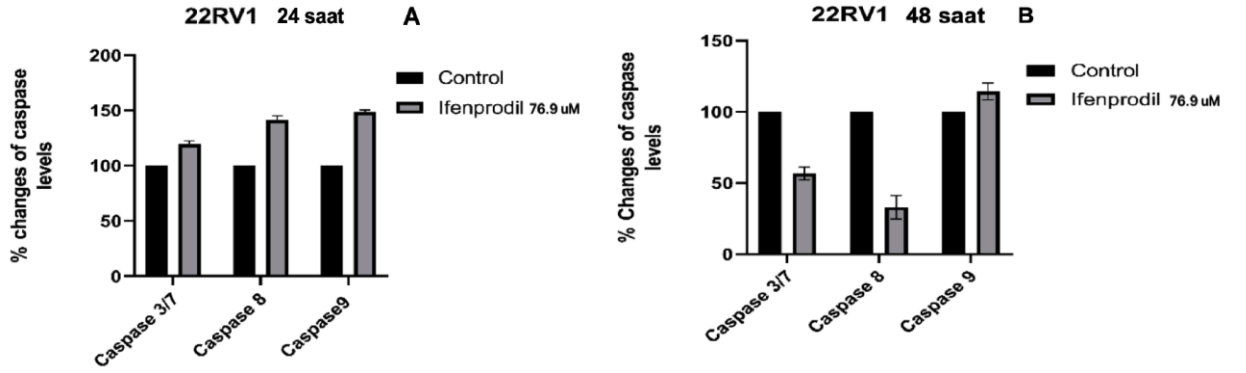
Şekil 12. RWPE-1 hücre hattında 24 saat (A ve B) ve 48 saat (C) ifenprodil inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler. ($p < 0.05$)

PC-3 hücre hattında 24 saatlik IC_{50} dozunun ($275.1 \mu M$) uygulanmasının ardından kaspaz 9 seviyesinde kontrole oranla oldukça yüksek artış gözlemlendi (Şekil 13A). 48 saatlik uygulamanın ardından kaspaz 9 seviyesinin 24 saatlik uygulamadan daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 13B), bu sonuç 24 saat için belirlenen IC_{50} değerinin 48 saatlik uygulamada apoptozu indüklemek için yetersiz kaldığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar ifenprodilin PC-3 hücre hattında da apoptozu hücre içi yoldan başlattığını göstermektedir.

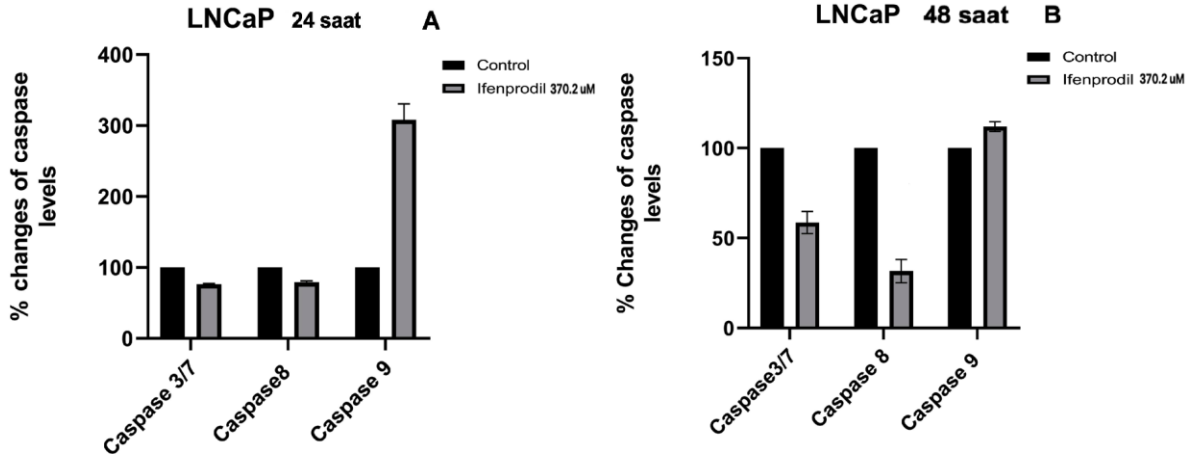


Şekil 13. PC-3 hücre hattında 24 saat (A) ve 48 saat (B) ifenprodil inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler ($p < 0.05$)

22RV1 hücre hattında 24 saatlik IC_{50} dozunun ($76.9 \mu M$) uygulanmasının ardından bütün kaspaz seviyelerinde artış gözlemlenirken (Şekil 14A), 48 saatlik uygulamasında yalnızca kaspaz 9 seviyesinde artış gözlemlendi (Şekil 14B). Daha önce elde edilen sonuçlara istinaden bu hücre hattı içinde apoptozun hücre içi yolak vasıtasıyla başlatıldığı düşünülmesine ek olarak kaspaz 8 seviyesinde ki artışla beraber apoptozun ilerletildiği ve böylece kaspaz 3 seviyelerinde artış gözlemlendiği düşünülmektedir. Diğer hücre hatlarından farklı olarak bu hücre hattında her kaspaz seviyesinin artması ifenprodile yanıtın hücreye özgü olduğunu düşündürmektedir. 48 saatlik sonuç ile beraber bu hücre hattı içinde apoptozun hücre içi yoldan başlatıldığı söylenebilir.



Şekil 14. 22RV1 hücre hattında 24 saat (A) ve 48 saat (B) Ifenprodil inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler. ($p < 0.05$)



Şekil 15. LNCaP hücre hattında 24 saat (A) ve 48 saat (B) Ifenprodil inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler. ($p < 0.05$)

LNCaP hücre hattında 24 saatlik IC_{50} dozunun ($370.2 \mu M$) uygulanmasının ardından kaspaz 9 seviyesinde kontrole oranla oldukça yüksek artış gözlemlendi (Şekil 15A), 48 saatlik uygulamanın ardından kaspaz 9 seviyesinin 24 saatlik uygulamadan daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 15B). Bu sonuç 24 saat için belirlenen IC_{50} değerinin 48 saatlik uygulamalarda apoptozu indüklemek için yetersiz kaldığını düşündürmektedir. Bu sonuçlar ifenprodilin LNCaP hücre hattında da apoptozu hücre içi yoldan başlattığını göstermektedir.

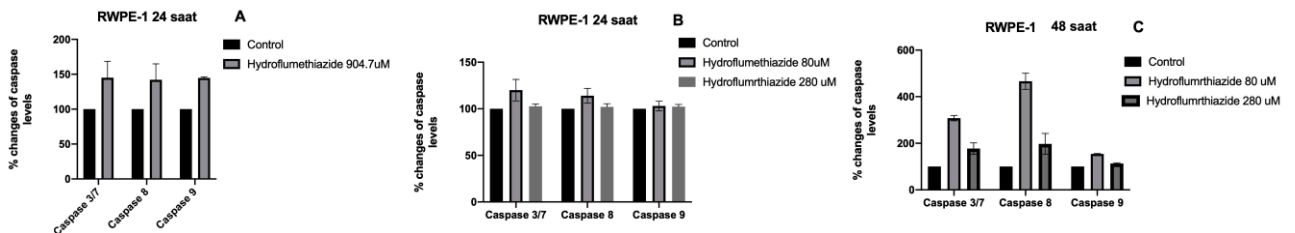
4.5.2 Hydroflumethiazide'in Kaspaz 3/7, 8 ve 9 Aktivasyonu ile Apoptotik etkisinin araştırılması

Apoptoz hücre içi ve dışı olmak üzere başlıca iki kaspaz bağımlı hücre ölümü yolağı vasıtasıyla tetiklenir ve kaspaz 8 ve kaspaz 9 bu yollar için merkezi rol oynarlar. Fas ligand (FasL) ve tümör nekroz faktör (TNF) apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ile ilişkilendirilmektedir ve kanser hücrelerinde hücre dışı apoptoz yolağından ölüm sinyalinin

sağlanması için kaspaz 8 aktive edilir. Buna ek olarak kaspaz 8'in aktivasyonu Bid molekülünü tBid'e dönüştürür ve kaspaz 9 bağımlı mitokondri aracılı apoptozu başlatır (Tamaki ve ark. 2014).

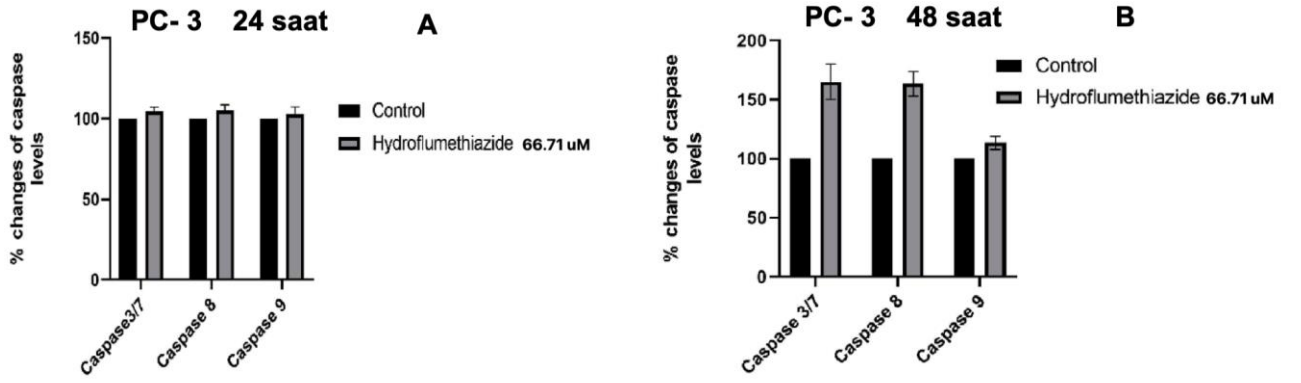
Kanser hücreleri anti kanser ilaçlarına maruz kaldığında, mitokondri membranında bulunan pro-apoptotik veya anti-apoptotik moleküllerde değişim meydana getirir ve bu değişimler kaspaz 9 aktivasyonuna neden olur (Konopleva ve ark. 1999). 24 saat hidroflumethiazide uygulaması ardından yapılan kaspaz seviyeleri ölçümlerinde kaspaz 8 seviyelerinde her hücre hattı için yaygın olarak artış gözlenmesi ile birlikte kaspaz 3 ve kaspaz 9 seviyelerinde de artış gözlemlenmiştir. Kaspaz 8 seviyelerinde yaygın olarak görülen artış, Hydroflumethiazide'in apoptozu hücre dışı yoldan başlattığını düşündürmektedir. Kaspaz 8 artışına eşlik eden kaspaz 9 artışının apoptotik sinyali güçlendirdiği ve böylece kaspaz 3 seviyelerinde artışa neden olduğunu düşündürmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada Jurkat hücre hattında dış yoldan gelen apoptoz sinyalinin mitokondri yolağı tarafından amplifiye edildiği gösterilmiştir (Heimlich ve Cidlowski, 2005).

RWPE-1 hücre hattında IC_{50} ve IC_{50} 'den düşük iki doz (80 μ M ve 280 μ M) değerlerinde yapılan 24 saatlik ilaç uygulamasının ardında 80 μ M da kontrole göre kaspaz 3 ve kaspaz 8 seviyelerinde artış gözlemlendi (Şekil 16B). 280 μ M doz değerinde kontrole göre değişim saptanmazken (Şekil 16B), IC_{50} değerinde bütün kaspaz seviyelerinde artış saptandı (Şekil 16A). IC_{50} 'den düşük iki doz (80 μ M ve 280 μ M) değerlerinde yapılan 48 saatlik ilaç uygulamasının ardından 80 μ M doz değerinde tüm kaspaz seviyelerinde büyük ölçüde artış saptanırken, 280 μ M da 24 saatlik uygulamaya göre daha belirgin bir artış saptandı (Şekil 16C).

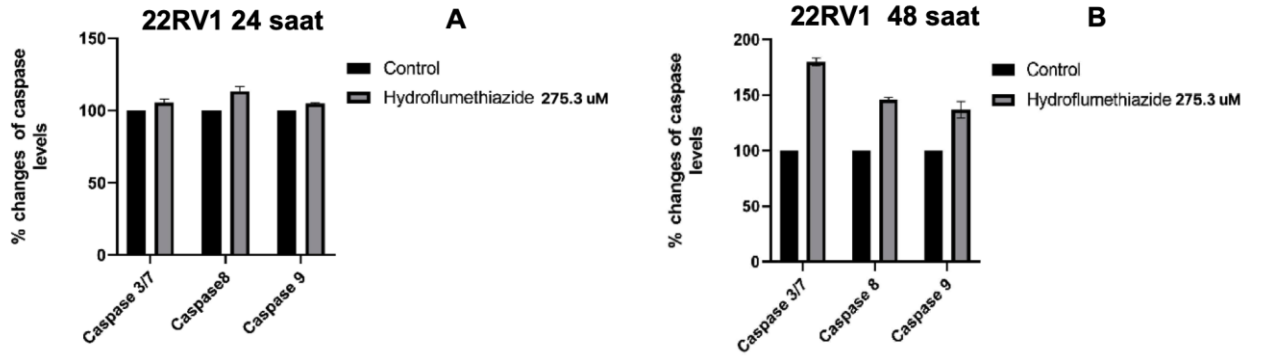


Şekil 16. RWPE-1 hücre hattında 24 saat (A ve B) ve 48 saat (C) Hydroflumethiazide inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler. ($p < 0.05$)

PC-3 hücre hattında IC_{50} dozu ile 24 saatlik uygulamada kaspaz seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmezken (Şekil 17A), 48 saatlik uygulamanın ardından kontrole göre bütün kaspaz seviyelerinde artış gözlemlendi (Şekil 17B). Kaspaz 8 seviyesinde meydana gelen artışın kaspaz 9 seviyesinde meydana gelen artıştan yüksek olması, PC-3 hücre hattında apoptozun hücre dışı yolk aracılığıyla başladığını düşündürmektedir.



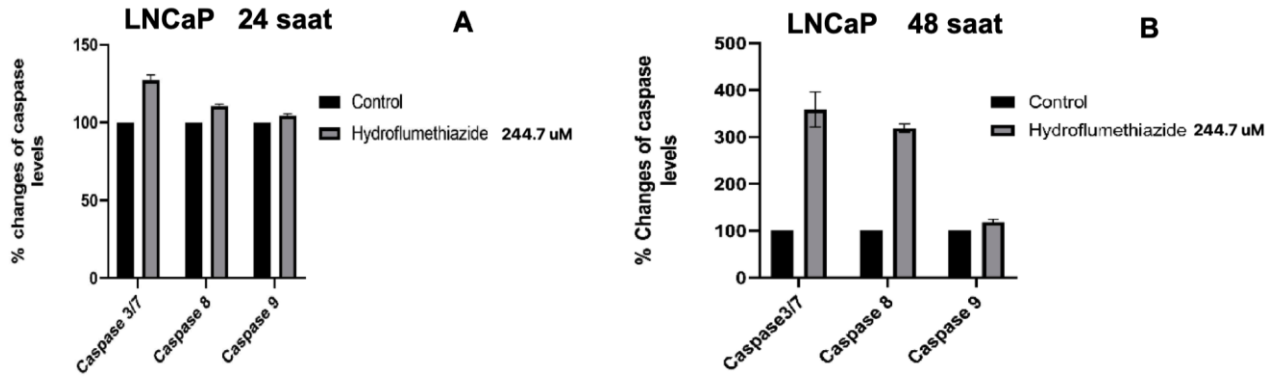
Şekil 17. PC-3 hücre hattında 24 saat (A) ve 48 saat (B) Hydroflumethiazide inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler. ($p < 0.05$)



Şekil 18. 22RV1 hücre hattında 24 saat (A) ve 48 saat (B) Hydroflumethiazide inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler. ($p < 0.05$)

22Rv1 hücre hattında PC-3 hücre hattıyla benzer sonuçlar gözlemlendi. 24 saatlik ilaç uygulamasında kaspaz seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmezken (Şekil 18A), 48 saatlik uygulamanın ardından bütün kaspaz seviyelerinde artış gözlemlendi (Şekil 18B).

LNCaP hücre hattında 24 saatlik IC_{50} dozunun uygulandığı grupta kaspaz 3 ve 8 seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenirken (Şekil 19A), 48 saatlik uygulamanın ardından bütün kaspaz değerlerinde artış gözlemlendi (Şekil 19B). Bütün bu sonuçlar göz önüne alındığında hydroflumethiazide'in 48. saatte apoptoz için daha etkili olduğu görülmektedir.



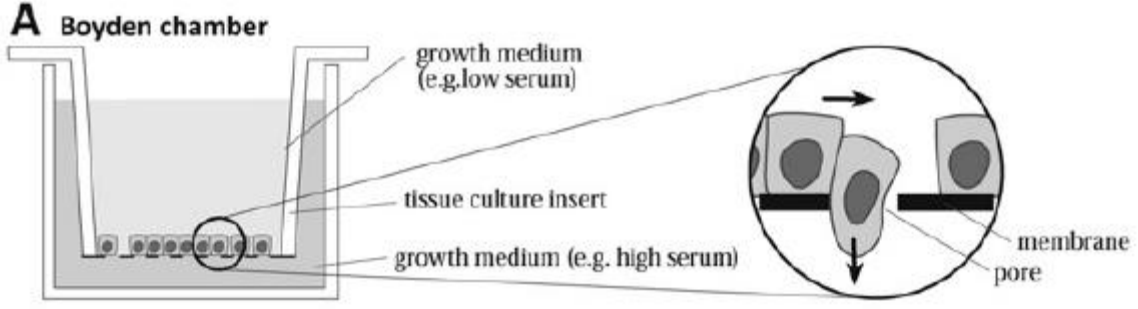
Şekil 19. LNCaP hücre hattında 24 saat (A) ve 48 saat (B) Hydroflumethiazide inkübasyonu ardından kaspaz seviyelerinde meydana gelen değişimler ($p < 0.05$).

4.6 Aday ilaçların prostat kanseri hücre hatlarında migrasyon ve invazyon davranışlarına etkisinin araştırılması

Hücre hareketi yaşayan hücrelerin önemli bir özelliğidir. Migrasyon canlılık kavramını, embriyonik gelişimi, immün yanıtı ve kanser metastazı gibi birçok patolojik süreci kapsar. Hücrelerin migrasyon davranışının çalışılması biyomühendislik ve biyoloji ile ilişkili alanlar için oldukça kullanışlı bir yöntemdir.

Çok hücreli canlılarda hücre hareketi gastrulasyon, embriyonik morfogenez, sinir sisteminin gelişimi, doku homeostazı ve immün hücrelerinin yönlendirilmesinde önemli bir role sahiptir. Ancak hareket eden hücrelerin kontrol mekanizması bozulabilir ve hücrede inflamasyon ve kanser metastazı gibi patolojik sonuçlar görülebilir. Migrasyon, biyolojide hücrenin vücut içerisinde yönlendirilmiş herhangi bir hareketini tanımlamak için kullanılan kapsayıcı bir tanımdır. Patolojide, invazyon malignant tümör hücrelerinin doku bariyerini aşarak ve dokular arasına geçmesini ifade eder.

Kanser araştırmalarında hücre migrasyon çalışmaları, kanser hastalarının sağkalımı ve hastalığın metastatik süreci ile doğrudan ilişkilidir. Vücutta kanser yayılımı ve dağılımı için kanser hücrelerinin göçü ve hücre dışı matriksi aşarak invazyon yapması zorunluluktur. Bu nedenle, hücre kültüründe transwell (boyden chamber) migrasyon ve invazyon yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 20. Transwell migrasyon analizi (Boyden chamber analizi). Hücrenin membrandaki pordan geçişi gösterilmektedir. (Kramer vd., 2013'ten uyarlanmıştır.)

Yeni terapötik ilaçların metastatik gelişimdeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için hücre migrasyonu, invazyonu ve adezyonuna yönelik *in vitro* metodlar sıklıkla kullanılmaktadır (Kramer ve ark., 2013). Bunlardan bir tanesi transwell (boyden chamber) migrasyon/invazyon analizidir (Şekil 20). Transwell analizi, içinde ve dışında farklı iki medium içeren çemberlerin porlu bir membran ile ayrılması ve bu porlardan hücrelerin migrasyonu temeline dayanmaktadır. Analiz edilen hücrelerin boyutuna uygun olarak porların çapları seçilir. Uygun olmayan por çaplarından dolayı hücreler düşebilir. Genellikle, hücreler üstteki besiyerine ekilir ve dikey doğrultuda alttaki yüksek oranda serum içeren besiyerine doğru porlardan hareket etmeleri beklenir. Hücrelerin bir pora ulaşıncaya kadar olan yatay hareketleri porlardan geçmeleri için önemli bir parametredir. Migrasyona uğrayan hücrelerin tespiti ve miktarının belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda da kullandığımız gibi, membranı geçmiş hücreler fikse edilerek, boyanabilir ve sayıları belirlenebilir. Membranın diğer yüzeyinde hücrelerin gözlenme süresi hücre tipine bağlıdır. Bu nedenle uygun inkübasyon süresi belirlenmelidir. Migrasyona uğramamış hücreler koton kulak çubuğu ile membranın üst yüzeyinden temizlenir. Migrasyona uğrayan hücreler ise fiksasyon sonrasında hematoksilin, tolüen blue ya da kristal violet gibi boyalarla boyanır. İnvazyonun migrasyondan temel farkı üstteki besiyerine ekim yapmadan önce membranın üstünü hücre dışı matriksi taklit edecek matrijel ile kaplamaktır.

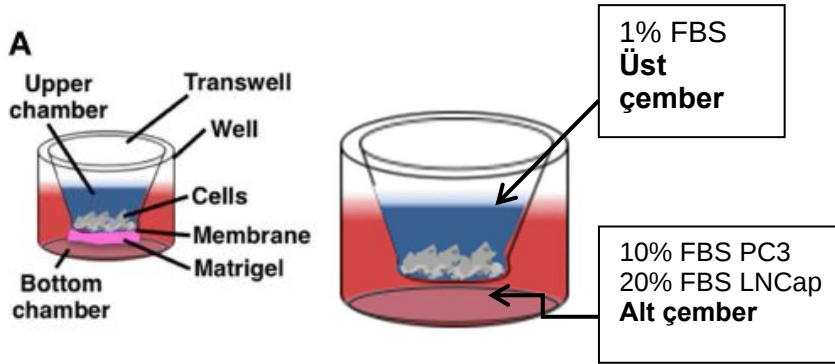
Çalışmamızda, Hydroflumethiazide ve ifenprodil ile 24 saat inkübe edilen prostat kanseri hücre hatlarında migrasyon ve invazyon davranışında meydana gelebilecek değişimlerin saptanması için transwell metodu kullanıldı. Kontrol hücresi RWPE-1 hücreleri bu çalışmada kullanılmadı.

Araştırmamızda, her hücre hattı için hydroflumethiazide ve ifenprodil'in IC₅₀ (Tablo 17) değerleri kullanıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 1.8x 10⁵ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi.

Hücrelerin yapışmaları için bir gece boyunca 37° C' de % 5 CO₂ içeren etüvde bekletildi. Yapışmalarının ardından her hücre için kendi IC₅₀ değerlerinde ilaç uygulaması yapıldı ve 24 saat 37° C' de % 5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve tripan mavisi kullanılarak toma camında sayıldı.

Tablo 17. Kullanılan ilaçların IC₅₀ değerleri

Hücre hatları	Hydroflumethiazide (uM)	İfenprodil (uM)
RWPE 1	904.7	905.8
PC 3	66.71	275.1
LNCaP	244.7	370.2
22RV1	275.3	76.9



Şekil 21. Transwell sistemin şematik gösterimi ve deney sisteminde besiyeri içerikleri. İnvazyon analizi için membran matrijel ile kaplanırken, migrasyon analizleri için hücreler membrana direkt ekildi. (Pijuan vd., 2019'dan uyarlanmıştır.)

İnvazyon analizi için, hücre sayımının ardından hücreler bir gün önceden matrijel eklenen insertlere ekildi (Şekil 21). İnsertler ekimden bir gece önce matrijel ile kaplandı. Matrijel serumsuz RPMI ile 1:3 oranında seyreltilti. Her bir inserte, insert yüzeyini kaplayacak şekilde 90 ul matrijel eklendi. Matrijel eklenmesinin ardından 24 kuyulu plakaya yerleştirilen insertler bir gece boyunca 37° C' de % 5 CO₂ içeren etüvde bekletildi. Hücre sayısı PC-3 için 40000 hücre/kuyu, 22RV1 ve LNCaP için 75000 hücre/ kuyu olarak belirlendi. Belirlenen sayıda hücre 400 ul %1 FBS içeren RPMI' da insertlere ekildi. İnsertin içinde bulunduğu kuyulara PC-3 için %10 FBS içeren besiyeri eklendi ve invazyon için 48 saat boyunca inkübe edildi.

22RV1 ve LNCaP hücreleri için matrijel ile kaplanmış insertlerde invazyondan sonuç alınamamasının ardından, bu hücre hatları için matrijel içermeyen insertlere ekim yapıldı.

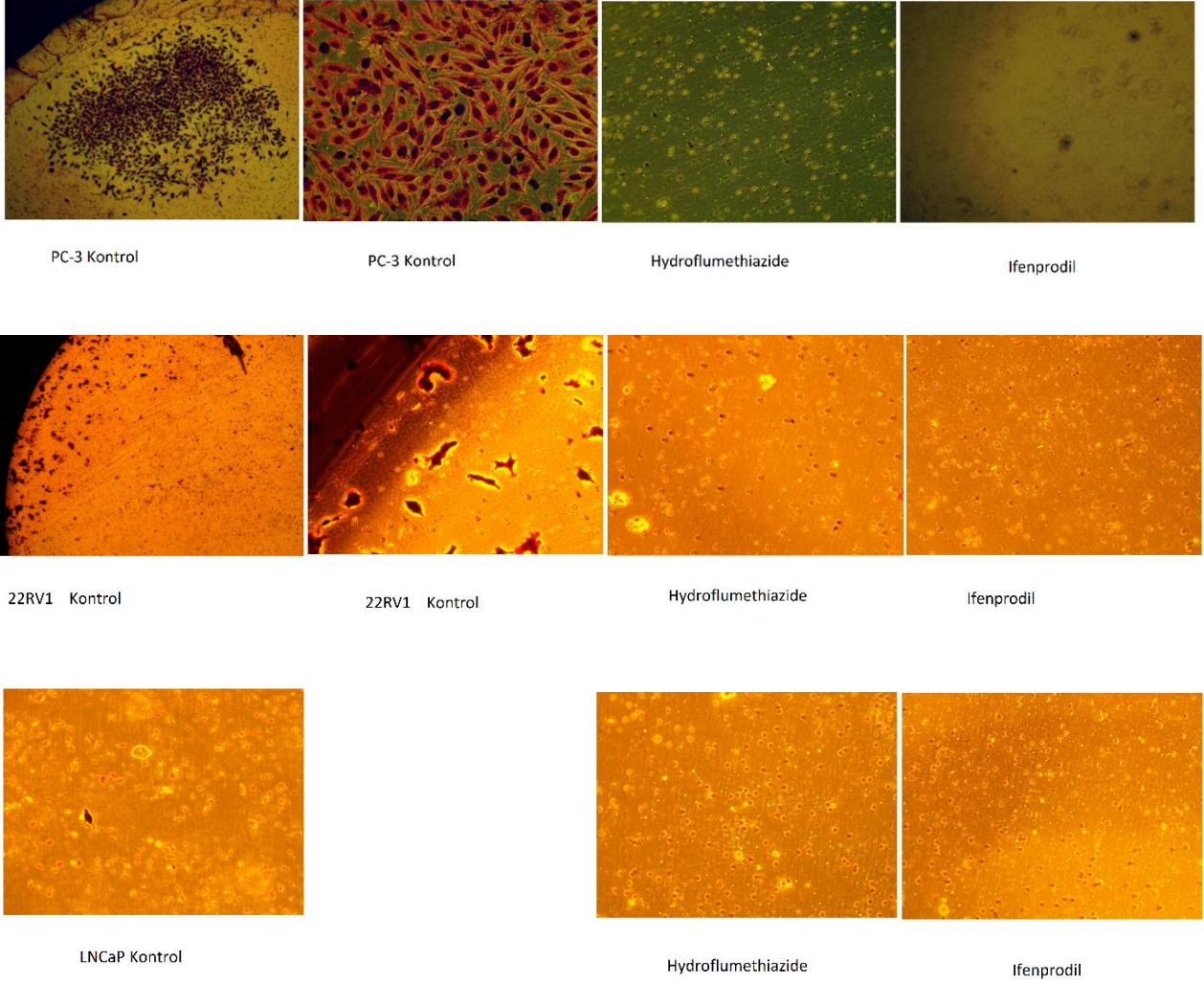
Hücreler insertlere %1 FBS içeren besiyerinde ekildi. İnsertlerin içinde bulunduğu kuyulara %20 FBS içeren besiyeri eklendi ve invazyon için 72 saat inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından hücreler PBS ile yıkandı ve metanol ile fikse edildi. Fiksasyondan sonra tekrar PBS ile yıkanan hücreler 1:10 oranında steril dH₂O ile seyreltilen Gensa boyası ile boyandı. Boyamanın ardından tekrar yıkama yapılarak boyadan arındırılan insertlerin görüntüleri ters ışık mikroskobunda alındı.

İnvazyon durumunda matrijel üzerine ekilen hücrelerin, hem matrijelden hem membran üzerindeki bulunan porlardan; migrasyon durumunda sadece porlardan geçmesi beklenir. İlaçların hücrelerin migrasyon ve invazyona olan etkilerini araştırdığımız transwell analizinin temeli hücrelerin motilite (hareket) yeteneklerine bağlıdır. 24 saatlik ilaç uygulaması yaptığımız hücre hatlarının hareket kabiliyetlerinin değişip değişmediğini anlayabilmek için membranın diğer yüzeyine geçen hücrelerin sayıları gözlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçları, ilaç uygulaması yapmadığımız grupta membranın diğer yüzeyine hareket eden hücre sayıları ile kıyaslayarak invazyon/migrasyon kabiliyetlerinin nasıl etkilendiği yorumlanmıştır.

Resim 1’de gösterildiği üzere; PC-3 hücre hattında kontrolde hem migrasyon hem de invazyon deneylerinde matrijelden hücre geçişi gözlemlendi. Hydroflumethiazide ve ifenprodil uygulamasının yapıldığı deney grubunda matrijelden hücre geçişi gözlenmedi. 22RV1 hücre hattında kontrol grubunda membrandan oldukça az sayıda hücrenin geçtiği saptandı. Hydroflumethiazide ve ifenprodil uygulanan deney grubunda matrijelden hücre geçişi gözlenmedi. LNCaP hücre hattında kontrol grubunda sadece tek bir hücrenin membrandan geçtiği diğer gruplarda hücre geçişi gözlenmedi.

İlaç uygulaması yapılan deney grubu ve yapılmayan kontrol grubu hücrelerinin membrandan geçişleri arasındaki farkı kuantitatif olarak gösterebilmek için yeterli hücre sayımız olmadığı için bunu planlamış olmamıza rağmen gerçekleştiremedik.



Resim 1. İnvazyon ve migrasyon sonrası inserti geçen hücrelerin gemsa ile boyandıktan sonra ters ışık mikroskobunda elde edilen görüntüleri.

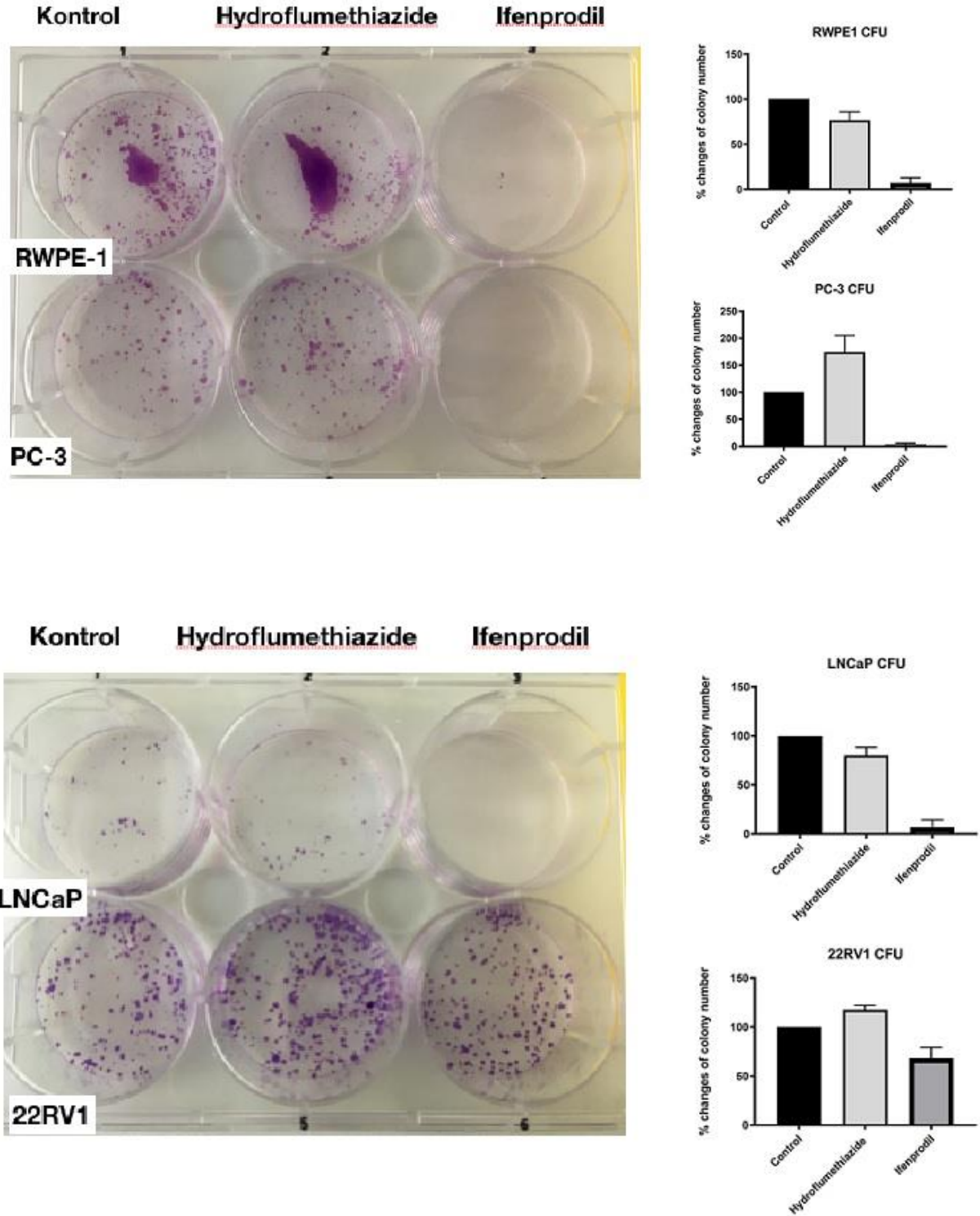
4.7 Aday ilaçların hücre hatlarında monolayer koloni oluşumuna etkisinin araştırılması

Kolonijenik veya koloni oluşumu analizi yöntemi tek bir hücrenin bir koloni oluşturma kabiliyetini temel alan, *in vitro* canlılık analiz yöntemlerindendir. Koloni oluşumu, canlı kolonijenik hücre sayısının ölçülmesi yöntemidir, canlılığını sürdüren hücrelerin bölünme ve küçük koloni oluşturma kapasitesinin anlaşılması için bir belirteçtir.

Seçilen ilaçların koloni oluşumuna olan etkilerini belirlemek için, RWPE1 kontrol hücresi olmak üzere, PC-3, LNCaP ve 22RV1 prostat kanseri hücre soylarında 24 saat ilaç uygulaması sonrasında koloni oluşumunda meydana gelebilecek değişimler saptandı ve koloni oluşumu analizleri yapıldı.

Her hücre hattı için hidroflumethiazide ve ifenprodil'in IC_{50} (Tablo 17) değerleri kullanıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara 1.8×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücreler yapışmaları için bir gece boyunca $37^{\circ}C$ ' de % 5 CO_2 içeren etüvde bekletildi. Yapışmalarının ardından her hücre için kendi IC_{50} değerlerinde ilaç uygulaması yapıldı ve 24 saat $37^{\circ}C$ 'de % 5 CO_2 içeren etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücreler tripsinize edildi ve tripan mavisini kullanılarak toma camında sayıldı. Hücre sayımının ardından hücreler PC-3 için 500 hücre/kuyu, RWPE1, 22RV1 ve LNCaP için 1500 hücre/kuyu hücre olacak şekilde tekrar 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Haftada 2 kez besiyeri değiştirilerek 14-21 gün süre ile $37^{\circ}C$ ' de % 5 CO_2 içeren etüvde, koloni oluşumunun sağlanması için inkübasyona bırakıldı. Koloni oluşumunun gözlenmesinin ardından koloniler metanolde hazırlanan %0.1'lik kristal viyole boyası ile boyanarak sayımı yapıldı. Bu çalışma üç kez tekrarlandı ve koloniler sayıldı. Hücre canlılığını sağlayan ve 50 hücreden fazla hücre içeren her bir koloni sayıma dahil edildi. Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi GraphPad Prism 7.0 programı kullanılarak "unpaired t-test" metoduyla yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

Her bir hücre hattı için ilaçların Resim 2'de gösterilen koloni oluşumuna olan etkisinin değerlendirilmesi, ilaç uygulamasının yapılmadığı kendi kontrol grubu ile kıyaslanarak yapıldı. Buna göre Şekil 19'da grafiklerde gösterildiği gibi sayım sonuçlarında; RWPE1 hücre hattında hidroflumethiazide ile 24 saat inkübasyon sonucunda koloni oluşumunda kontrole göre 23.4 ± 5.3 azalma gözlemlenirken, 24 saat Ifenprodil ile inkübasyon sonucunda koloni oluşumunda 92.9 ± 3.3 azalma saptandı. PC-3 hücre hattında hidroflumethiazide ile 24 saat inkübasyon sonucunda koloni oluşumu kontrole göre 74 ± 17.5 artış gözlemlenirken, 24 saat Ifenprodil ile inkübasyon sonucunda koloni oluşumunda 96.5 ± 1.2 azalma gözlemlendi. LNCaP hücre hattında hidroflumethiazide ile 24 saat inkübasyon sonucunda koloni oluşumu kontrole göre 20 ± 4.6 azalma gözlemlenirken, 24 saat Ifenprodil ile inkübasyon sonucunda koloni oluşumunda 93.4 ± 4.4 azalma saptandı. 22RV1 hücre hattında hidroflumethiazide ile 24 saat inkübasyon sonucunda koloni oluşumu kontrole göre 17 ± 2.6 artış gözlemlenirken, 24 saat Ifenprodil ile inkübasyon sonucunda koloni oluşumunda 32 ± 6.3 azalma saptandı.



Resim 2. Kristal viyole ile boyanmış koloni görüntüleri.

Şekil 22. İstatistiksel olarak analiz edilen koloni sayısı CFU (colony forming unit) değerlerinin grafikte gösterimi. ($p < 0.05$)

4.8 Aday ilaçların soft agarda koloni oluşumuna etkisinin araştırılması

Soft agar koloni analizi, *in vitro*da hücresel transformasyonu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Ankorajdan bağımsız büyüme, transforme hücrelerin katı yüzeyden bağımsız büyüme kabiliyetinin değerlendirmesi için kullanılır. Bu kabiliyetin karakterize edilmesi için soft agar koloni analizi iyi anlaşılmış bir metottur. Hücrelerin malignant transformasyonu için en ikna edici yöntemler arasındadır. Bu metod farklı maruziyet koşullarına hücrelerin verdiği yanıtı yarı nicel olarak değerlendirmeye olanak sağlar.

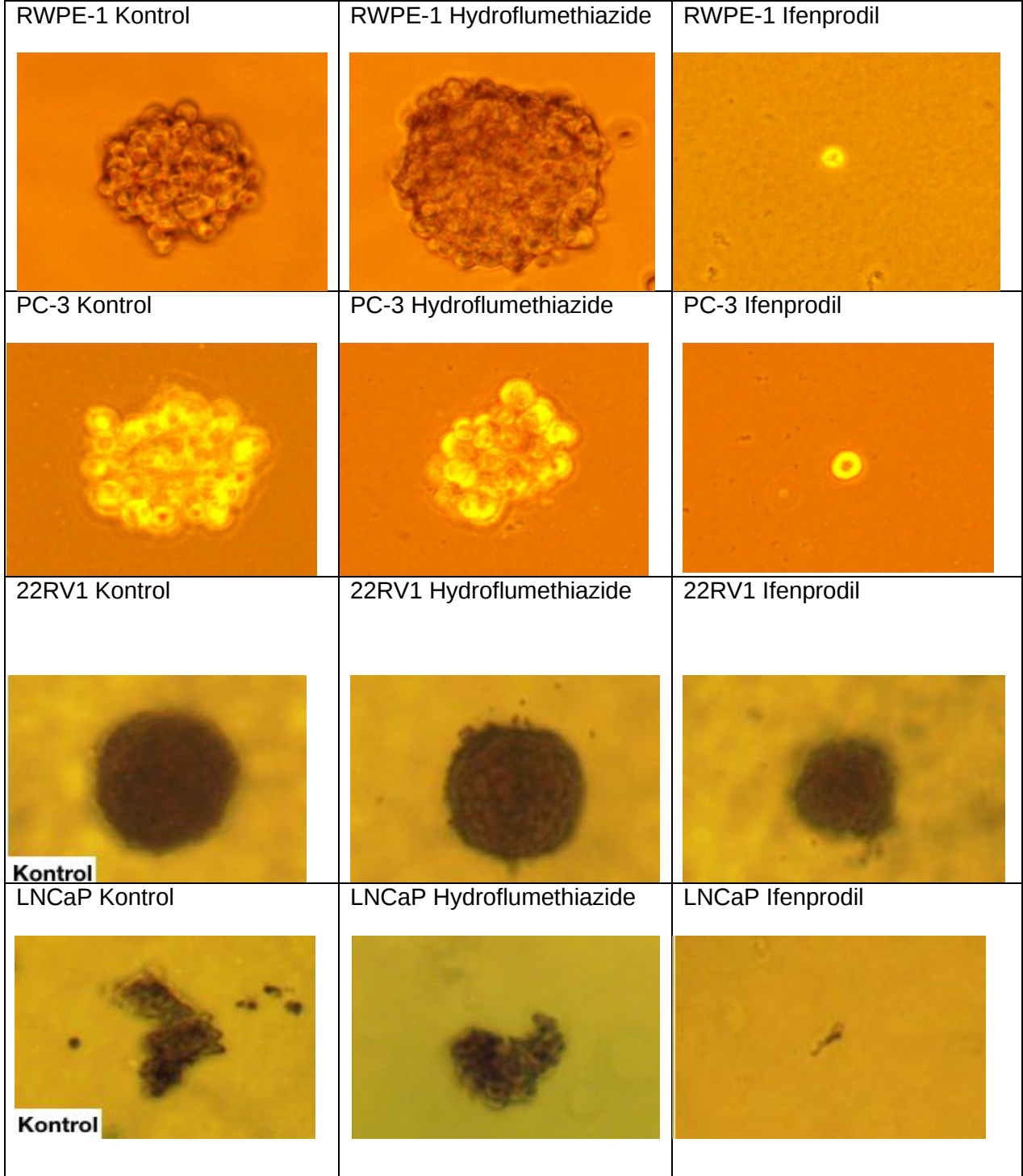
İlaç uygulamalarının, hücrelerin yüzeye yapışmadan koloni oluşturup oluşturmadığına olan etkilerinin belirlenmesi için, RWPE1, PC-3, 22RV1 ve LNCaP hücre hatlarında hidroflumethiazide ve ifenprodil maruziyetinden sonra soft agar koloni analizi yapıldı.

Hücre sayımı aşamasında monolayer koloni oluşumu aşamasındaki yöntem kullanıldı. Hücre sayımının ardından hücre sayıları PC-3 için 2500 hücre/kuyu, RWPE1, 22RV1 Ve LNCaP için 5000 hücre/kuyu olarak belirlendi. Belirlenen sayıdaki hücreler % 0.5'lik agaroz içeren 6 kuyucuklu plakalara, %0.3'lük agaroz ve medium eşliğinde ekildi. Soft agarda koloni oluşumunun gözlenebilmesi için 14-21 gün boyunca % 5 CO₂'lik etüvde bırakıldı, hafta da 2 kez olmak üzere taze besiyeri eklendi. Oluşan kolonilerin görüntüleri ters ışık mikroskobu ile alındı ve ilaç maruz bırakılmayan (kontrol grubu) ve maruz bırakılan (test grubu) hücrelerin koloni boyutları karşılaştırıldı. Deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi Student's t test ve two way ANOVA metodları kullanılarak GraphPad prism 8 programında yapıldı. P değerinin 0.05'ten küçük olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Her deney için en az üç tekrar yapıldı.

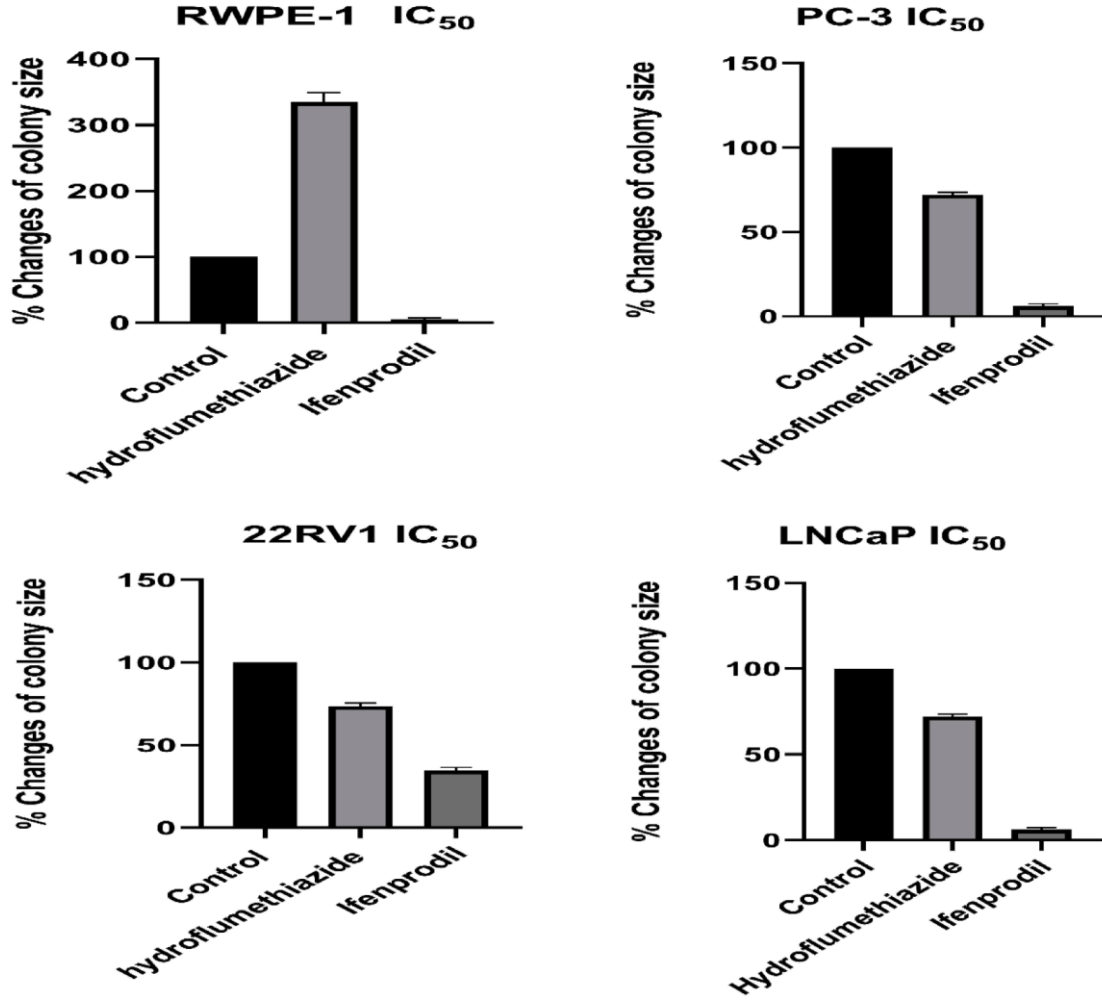
Her bir hücre hattı için Resim 3'te gösterilen koloni görüntülerinin değerlendirilerek aşağıdaki sonuçlar tespit edildi:

RWPE1 hücre hattında hidroflumethiazide'e maruz bırakılan hücrelerin oluşturduğu koloni boyutlarında kontrole göre artış gözlemlenirken, ifenprodil grubunda koloniye rastlanmadı. PC-3 hücre hattında hidroflumethiazide'e maruz bırakılan hücrelerin oluşturduğu koloni boyutlarında hafif azalma gözlemlenirken, ifenprodil uygulaması sonrası koloni oluşumu gözlenmedi. 22RV1 hücre hattında koloni boyutlarının değerlendirmesinde hidroflumethiazide uygulamasının ardından koloni boyutlarında kontrole göre değişim saptanmazken, ifenprodil uygulaması ardından koloni boyutlarında azalma saptandı. LNCaP hücre hattında hidroflumethiazide uygulamasının ardından koloni boyutlarında kontrole göre

hafif bir azalma gözlemlenirken, ifenprodil uygulaması ardından soft agarda koloni oluşumu gözlemlenmedi (Şekil 23).



Resim 3. Soft agarda oluşan kolonilerin ters ışık mikroskobu altında görüntüleri.



Şekil 23. Koloni boyutlarında meydana gelen değişimlerin istatistiksel analizinin grafikte gösterimi. ($p < 0.05$.)

5. TARTIŞMA

Transkriptom verilerinin hastalıklarla ilişkili biyoişaretçilerin tespiti ve mekanizmaların aydınlatılması açılarından önemi ile farklı popülasyonlardan alınan örneklemde ve farklı dizileme platformları altında elde edilmiş verilerin meta-analizin bu süreçte analiz verimliliğini arttırdığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Calimlioglu vd., 2015; Karagoz vd., 2015; Gov vd., 2017; Islam vd., 2018; Kori ve Arga, 2018). Öte yandan, TCGA, NCBI-GEO ve ArrayExpress gibi kamuya açık veri bankalarında sunulan geniş veri setlerine rağmen birçok kanser türü için meta-analize olanak sağlayacak transkriptom veri setlerinin halen kısıtlı olduğu görülmektedir. Bahsi geçen veri bankalarının yanı sıra ilgili literatürde tarandığında, prostat kanseri üzerine yapılan çalışmaların bu açıdan yeterli olduğu görülmüş ve bu çalışmada sağlıklı vs. hastalıklı örnekler içeren, çeşitli mikrodizin (Affymetrix, Illumina) ve RNA dizileme yaklaşımları ile farklı popülasyonlardan örneklerle elde edilmiş 6 veri seti (toplam 793 örnek, Tablo 1) değerlendirilebilmiştir.

Çalışma kapsamında incelenen veri setleri birbirinden bağımsız olarak analiz edildiğinde genomun %1.5 ile %8.4 arasında bir bölümünün prostat kanseri fenotipinde sağlıklı fenotipe oranla yeniden programlandığı görülmüştür (Tablo 2). Meta-analiz neticesinde istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) derecede anlatımı azalan 3803 gen, anlatımı artan 2934 gen olmak üzere toplam 6737 hastalıkta anlatımı farklılaşan gen tespit edilmiştir. Çeşitli kanser türlerinde, mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genler dikkate alındığında, genom yeniden programlama oranının %1 ile %33 arasında değiştiği görülmektedir (Gov ve Arga, 2014; Gulfidan vd., 2020). Çalışmalarda anlatımı farklılık gösteren gen sayıları incelenen popülasyona ve kullanılan platforma göre farklılık gösterdiğinden, mevcut verilerle kanser türlerinde bu oran baz alınarak bir sınıflama yapmak mümkün olamamaktadır. Öte yandan, bu çalışmada elde edilen bulguların (Tablo 2) yanı sıra 12 kanser türü için TCGA veri setleri üzerinden yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlar (Gulfidan vd., 2020) ışığında, prostat kanserinde transkriptom seviyesindeki değişimlerin kanserlerin geneline göre nispeten düşük oranlarda gerçekleştiği söylenebilir.

Genom boyutlu biyolojik ağların (protein-protein etkileşim ağı, transkripsiyon ve post-transkripsiyon düzenleyici ağ ve metabolik ağ) transkriptom verilerinin anlamlandırılmasında ve çeşitli omik verilerinin bütünleştirilerek hastalıklara ait işaretçi molekülerin tespitinde oldukça verimli sonuçlar sağladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Karagoz vd., 2015; Kori vd., 2016; Kori ve Arga, 2018; Sevimoglu ve Arga, 2015; Turanlı vd., 2018; Turanlı vd. 2019). Bu çalışmada da, prostat kanserine ait transkriptom verileri yüksek güvenilirlik değerlerine sahip, genom ölçekli insan protein-protein etkileşim ağı (Karagoz vd., 2016), transkripsiyon

düzenleyici ağ (Bovolenta vd., 2012), post-transkripsiyon düzenleyici ağ (Hsu vd., 2014) ve metabolik ağ (Mardinoglu vd., 2014) ile bütünleştirilmiş ve literatürde etkinliği kanıtlanmış analiz yöntemleri uygulanarak işaretçi biyomoleküller tespit edilmiştir. Literatürdeki çeşitli çalışmalar ve araştırma grubumuzun mevcut verileri ışığında bu işaretçi moleküllerin prostat kanserine özgü olup olmadıkları değerlendirilmiştir.

Farklı biyolojik seviyelerde diğer kanser türleri ile büyük benzerlikler yakalanırken, belirli seviyelerde prostat kanserine özgü moleküllerin tespit edilebilmiş olması projenin başlıca hipotezlerinden birini doğrulamaktadır. Örneğin, yapılan analizlerle prostat kanserinde 253 işaretçi reseptör tespit edilmiştir. Öte yandan, 12 kanser türüne (Akciğer kanseri, Beyin tümörü, Cilt kanseri, Kolorektal kanser, Lösemi, Meme kanseri, Oral kanser, Over kanseri, Özofagus kanseri, Pankreas kanseri, Servikal kanser, Tiroid kanseri) ait sonuçlar (Gov, vd., 2017; Caliskan vd., 2020) dikkate alındığında bu reseptörlerin hiçbirinin prostat kanserine özgü işaretçi molekül olmadığı gözlemlenmiştir. Öte yandan, mevcut çalışmamızda prostat kanseri için tespit edilen 4 TF, 134 miRNA, 127 metabolit ve 51 hub proteinin prostat kanserine özgü işaretçi moleküller olduğu, prostat kanserinde de bulunan 12 TF, 75 miRNA ve 18 hub proteinin ise incelenen 13 kanser türünde de ortak olduğu gözlemlenmiştir.

Kanserler gibi karmaşık hastalıklarda mekanizmaları anlama süreçlerinde tek bir molekül (gen, protein, vb.) üzerinden yorum yapmak yerine molekül kümesi üzerinden analiz gerçekleştirmenin daha güçlü sonuçlar verdiği bilinmektedir. İşlev zenginleştirme analizleri (Subramanian vd., 2005; Kamburov vd., 2009; López-Ibáñez vd., 2016) hangi molekül kümelerinin hangi biyolojik yollarda veya süreçlerde görev aldığını belirlemede kullanılan etkinliği kanıtlanmış, istatistiksel bir yöntemdir. Prostat kanserine ait işaretçi moleküllerin rol aldıkları biyolojik süreç ve yollar incelendiğinde; pürin ve pirimidin gibi nükleik asit metabolizmaları, yağ asidi metabolizmaları, oksidatif fosforilasyon ve pirüvat metabolizması ilgili metabolik yolların yanı sıra başta kanser ve kardiyomiyopati olmak üzere hastalık yolları ile fokal adezyon, ECM-reseptör etkileşimi, aktin sitoskeletonun düzenlenmesi, hücre farklılaşması, hücresel süreçlerin ve sinyal iletim mekanizmalarının düzenlenmesi gibi biyolojik süreçlerin ön plana çıktığı görülmektedir (Tablo 4-6). Elde edilen bulgular kanserler için belirlenen temel özellikler (*cancer hallmarks*) ve bu özelliklerle ilişkilendirilen biyolojik süreçlerle oldukça yüksek bir uyum göstermektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu durum, elde edilen işaretçi molekül bulgularının kanser mekanizmalarında merkezi/kritik görevler üstlenebileceği ve bu nedenle etkin ilaç hedefleri olarak değerlendirilmeleri gerekliliği hipotezini desteklemektedir.

Hedef ilaçların belirlenmesinde prostat kanseri hastalarında mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genler ile tespit edilen işaretçi moleküller dikkate alınarak çeşitli ilaç

repozisyonu algoritmaları kullanılmış; elde edilen ilaç adayları, prostat kanseri veya diğer kanserle ilgili mevcut çalışmalar, ilaç etki mekanizması bilgisi, etkileşimde bulunduğu proteinler ve bu proteinlerin kanser mekanizmaları ile ilişkisi, ilacın temin kolaylığı ve benzeri açılardan ilgili literatür ve veri bankaları (DrugBank, PharmGKB, KEGG Drugs, vb.) çerçevesinde değerlendirilerek *in vitro* çalışmalar için en uygun ilaç adaylarının tespiti amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, kamuya açık web tabanlı araçlar (Tablo 7) yanı sıra grubumuz tarafından geliştirilmiş transkriptom tabanlı bir ilaç repozisyonu algoritması olan geneXpharma (Turanlı vd., 2017) kullanılmış ve prostat kanserine özgü genom ölçekli metabolik model üzerinden özgün bir ilaç repozisyonu çalışması da gerçekleştirilerek aday ilaçlar belirlenmiştir.

Benzetimler sonucunda, birçok ilaç molekülünün olası ilaç adayı olarak değerlendirilebileceği görülmüştür. Örneğin, “entinostat” olarak da bilinen MS-275 molekülü en olası ilaç adayı olarak belirlenmiştir. Klinik araştırmaları süren histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü olan bu ilacın çeşitli *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda prostat kanseri modellerinde denendiği ve etkili olduğu rapor edilmektedir (Qian vd., 2007). Benzetimlerin bir başka ortak sonucu ise FDA onaylı HDAC inhibitörü olan “vorinostat” olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu ilacın da prostat kanseri dahil birçok kanser türünde anti-tümör aktivitesi gösterdiği rapor edilmektedir (Bradley vd., 2009). Ön plana çıkan diğer ilaçlardan “depucein” patojen bir fungus tarafından sentezlenen bir poliketid olup, bir başka HDAC inhibitördür (Perry vd., 2010). “Quinacrine” olarak da bilinen “mepacrine” ise bir antibiyotik olup p53 aktivasyonu ve NF-κB inhibisyonu gösterdiği için kanser çalışmalarında etkili olabileceği değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, prostat tümörü üzerine gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda nükleer proteinler ile sitoplazmadaki sinyal iletim proteinleri üzerinde aktivite gösterdiği ve arakidonik asit yolağı ile çoklu-ilacın direnç mekanizmalarını etkilediği gösterilmiştir (Ehsanian, vd., 2011). “Mycobutin” olarak da bilinen “rifabutin”, geniş spektrumlu bir antibiyotik olup aynı zamanda Hsp90 inhibitörlerine bir örnektir. Bu ilaç, castrate dirençli prostat kanser hücrelerinde NF-κB aktivitesini ve CXC-kemokin sinyal iletim yolağını baskılayarak sitotoksite göstermiştir (Seaton vd., 2009). Diğer Hsp90 inhibitörleri olan “alvespimycin” ve “geldanamycin”, anti-enfeksiyon ajanları “norfloxacin”, “berberine” ve “pyrvinium”, anti-histamin “antazoline”, anti-psikotikler “flupentixol” ve “nortriptyline” ve daha onlarca molekül benzetimlerde ön plana çıkan ilaç adayları arasında yer almıştır.

Benzetimler sonucunda ön plana çıkan ilaç adaylarından “dasatinib” bir tirozin kinaz inhibitörü olup metastatik protein kanser tedavisinde docetaxel ile birlikte kullanımı öngörülmüş; ancak faz 3 aşmasında başarısız olmuştur (Philips, 2014). Bu ve benzeri sebeplerle ilk aşamada ön plana çıkan ilaç adayının klinik uygulamalara aktarılamayabileceği

düşünülmektedir, proje kapsamında farklı seviyelerde veri setleri ile farklı yöntem ve araçlarla ortak olarak tespit edilen aday ilaçların etkinliklerinin denenmesi yoluna gidilmiş ve böylelikle ileri aşamalarındaki başarı olasılığının artırılması hedeflenmiştir.

Bu çalışmanın önemli çıktılarından biri de prostat tümörü olan kişilerden alınan transkriptom verileri ile hastalığa ve dokuya özel protein bilgisinin (Uhlen vd., 2015), insan kanserleri için kalıp model olarak kabul edilen ICancerCore modeli (Uhlen vd., 2017) üzerinde birleştirilmesi sonucu prostat kanserine özgü genom ölçekli bir metabolik modelin literatürde ilk kez oluşturulmuş olmasıdır. Söz konusu model üzerinden gerçekleştirilen benzetimler, steroid biyosentezin önemini işaret etmiştir (Şekil 3). Nitekim, steroid biyosentez yolunun sadece normal prostat gelişimi için değil aynı zamanda prostat kanserinin ilerlemesi için de büyük önem taşıdığı bilinmektedir (Kadhi vd., 2017; Sinnott vd., 2015; Sharifi ve Auchus, 2012).

Prostat kanserine özgü genom ölçekli bir metabolik model üzerinden gerçekleştirilen ilaç repozisyonu benzetimleri sonucunda, 23 ilaç adayının metabolik gen setindeki genlerin anlatımının tersine ilaç etkisi gösterdiği görülmüş ve olası aday ilaçlar olarak değerlendirmeye alınmıştır (Şekil 4, 5). Önerilen ilaç etkileşimlerin ve ilaç hedeflerinin, çözünmüş taşıyıcı (SLC) proteinleri, büyüme faktörleri veya karbonik anhidrazlar ve glutatyon S-transferazlar gibi enzimler gibi bilinen anti-kanser ilaç hedeflerine sahip benzer bir protein ailelerine mensup olduğu görülmektedir. SLC'ler, öncelikle ilacın alımında rol oynayan taşıyıcı proteinlerdir ve dolayısıyla kemoterapinin etkinliğini ve/veya toksisitesini etkileyebilir. SLC protein ailesinin üyeleri, sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerinde büyük ölçüde farklı ekspresyon profilleri göstermiştir ve bu şekilde, kanser terapisinde potansiyel ilaç hedefleri olarak tartışılmışlardır (Li ve Shu, 2014). Örneğin, SLC19A1 başlıca kolaylaştırıcı folat ve tiamin taşıyıcılarından biridir ve norcyclobenzaprine'nin tahmini bir hedefidir (Lin ve ark., 2015). Başka bir tahmin edilen ilaç hedef grubu olan karbonik anhidrazlar (CAs, EC 4.2.1.1), daha önce glokom, obezite, enfeksiyon ve kanser gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmış ve özellikle kemoresistiteyi aşmak için uygulanmıştır (Kopecka vd., 2015). Bildiğimiz kadarıyla, karbonik anhidraz CA1, prostat kanseri tanısında potansiyel bir plazma biyobelirteci olarak belirtilmiştir (Takakura vd., 2012), ancak tedavi için bir ilaç hedefi olarak şimdiye kadar sunulmamıştır. Ayrıca, bu çalışma CA12'nin ifenprodil ile etkileşime girdiğini öngörmektedir.

Hali hazırda çoklu kanser türleri için incelenen ilaç hedeflerinden biri olan Fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR) (Wesche vd., 2011), bu çalışmada azlosilin, sülfametoksipiridazin, kloramfenikol ve dekspropranolol ile ilişkili bulunmuştur. Prostat kanserinde FGF/FGFR yollarının ve anjiyogenez ve hastalık progresyonu ile birlikteliklerinin katılımı, potansiyel

terapötik hedef olarak FGFR proteinini ön plana çıkarmaktadır. Dovitinib ve nintedanib'i hedefleyen FGF / FGFR yolları, ilerlemiş prostat kanseri için klinik geliştirmede iki küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörüdür (Corn vd., 2013).

Glutasyon S-transferazları (GSTler, EC 2.5.1.18) ilaç hedeflerinde GSTM3, GSTM4, GSTZ1 ve MGST3 olarak karşımıza çıkmıştır. Farklı GST'lerin polimorfizmleri ve aşırı ekspresyonu, ölümcül prostat kanseri de dahil olmak üzere farklı kanserlerde potansiyel biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (Agalliu vd., 2006). Son zamanlarda, prostat kanseri hastalarında GSTM3 polimorfizmi gözlenmiş ve oksidatif stresle hormonal tedaviye dirençle ilişkili bulunmuştur (Shiota vd., 2017). GST'lerin genetik polimorfizmleri ve kanser hastalarındaki fonksiyonel yansımaları kemoterapötik etkinlik ile orantılıdır. Bu nedenle, GST'ler ilaç direnci problemini çözmek için spesifik ilaçların tasarımında aday hedefler olarak önem kazanmıştır (Di Pietro vd., 2010; Ramsay ve Dilda, 2014). GST'lerin ve dışarı akış pompalarının aşırı ekspresyonu, anti-neoplastik ilaçların artan deşarjına neden olduğundan, etacraplatin, etakrinik asit ve analogları, auranofin veya piperlongumin gibi GST inhibitörlerinin kullanımı, kanser hücrelerine ilaç direncini ve anti-kanser ilaç duyarlılığını arttırabilir. Kanser tedavisi için başka bir fırsat, kanfosfamid, nitrik oksit ön ilaçları, metformin ve doksorubisin analogları gibi ilaçların, ön ilaç (prodrug) olarak kullanılmasıdır (Allocati vd., 2018).

Gerek mevcut web araçları kullanılarak gerçekleştirilen, gerekse prostat kanserine özgü genom ölçekli metabolik model üzerinden gerçekleştirilen ilaç repozisyonu çalışmaları neticesinde tespit edilen ilaç adaylarının prostat kanseri veya diğer kanserle ilgili mevcut çalışmalar, ilaç etki mekanizması bilgisi, etkileşimde bulunduğu proteinler ve bu proteinlerin kanser mekanizmaları ile ilişkisi, ilacın temin kolaylığı ve benzeri açılardan ilgili literatür ve veri bankaları (DrugBank, PharmGKB, KEGG Drugs, vb.) çerçevesinde değerlendirilmesi sonucunda 11 ilacın daha önce prostat kanseri için anti-kanser ajan olarak tanımlanmadığı ve deneysel çalışmalar için uygun olabileceği değerlendirilmiştir. Prostat kansere özgü metabolik model ile *in silico* hücre canlılığı testleri 11 ilaç için gerçekleştirildiğinde, 5 ilacın (sülfametoksipiridazin, azlosilin, morantel, hidroflumetiyazid ve ifenprodil) tümör büyümesini yüksek (>%80) oranda inhibe ettiği görülmüş ve bu 5 ilaç deneysel çalışmalar için öncelikli adaylar olarak değerlendirilmiştir.

Önerilen ilaçlardan, sülfametoksipiridazin anti-bakteriyel özellikte sülfonamidlerden biridir. Sülfonamidler, anti-bakteriyel özelliklerinin yanı sıra, diüretik, hipoglisemik ve anti-karbonik anhidraz aktivitelerine sahip çeşitli ilaç gruplarının temelidir. Ek olarak, sülfonamid türevlerine ev sahipliği yapan ilaçların *in vitro* ve/veya *in vivo* anti-kanser aktivitesi sergiledikleri bildirilmiştir (Casini vd., 2002). İlaç hedefleri folat sentezinde yer alan bir enzim olan

dihidropteroat sentazı (DHPS) inhibe ederek, bakterilerin çoğalmasını engellediğinden, bu bakteriyostatik ajan anti-folat aktivite de gösterir. Anti-metabolit ilaçların en eski temsilcisi olarak anti-folatların, kemoterapide kullanıldığı rapor edilmiştir. Folat, hücresel sağ kalım için gerekli bir mikro besin olarak tanımlanmıştır ve 5-floroürasil (5-FU) ve metotreksat (Jennings) gibi anti-kanser ilaçları için metabolik olarak çekici bir hedef haline getiren pürinlerin, timidinit ve metilasyon-aramaddelerinin biyosentezinde bulunur (Jennings and Willis, 2015).

Bir diğer ilaç olan Azlosillin ise geniş spektrumlu bakterilere karşı kullanılan yarı sentetik bir antibiyotiktir. β -laktam ailesinin bir üyesi olarak, azlosilinin ana anti-bakteriyel etkisi, peptidoglikan birimlerinin terminal amino asit kalıntılarının çapraz bağlanması yoluyla mikrobiyal hücre duvarı oluşumu için gerekli olan transpeptidaz enzimlerini inhibe etmektir. Anti-bakteriyel ajanların β -laktam sınıfları anti-mikrobiyal tedavi olarak kullanılmış ve bir anti-kanser ajanı olarak potansiyel kullanımları da bildirilmiştir. Antrasiklinler, bleomisin, mitomisin C, daktinomisin ve mithramisin gibi β -laktamların, anti-bakteriyel etkilerine ek olarak, farklı kanser türlerine karşı etkili oldukları kanıtlanmıştır (Balderas-Renteria vd., 2012).

Diğer bir aday ilaç olan İfenprodil, N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonistlerinden biridir. Protein ifadelerine dayanarak, NMDA reseptörleri, esas olarak merkezi sinir sisteminde, testis ve uterusu eksprese edilen kalsiyum kanalları olarak hareket eder. NMDA reseptör antagonistleri, bu kanallar boyunca aşırı kalsiyum akışını geri dönüşümsüz olarak bloke etmek için kullanılır. NMDA reseptörlerinin anormal ekspresyonu veya fonksiyonu, iskemik nöronal hücre ölümü, epilepsi, şizofreni ve diğer bazı nörodejeneratif hastalıklar gibi farklı patolojik durumlara sebep olabilir (North vd., 2015). Seçici olmayan NMDA reseptör antagonistleri ile ilişkili yan etkiler, belirli reseptör alt tiplerinin aşırı aktivasyonu ile ilişkili patolojileri hedeflemek için faydalı olabilir. İfenprodil, en iyi karakterize edilmiş alt tip seçici NMDA antagonistlerinden biridir. Bu bileşik başlangıçta bir damar genişletici ajan olarak, bir adrenerjik antagonist olarak geliştirilmiştir (Williams, 2001). Yaygın olarak ifade edilen NMDA reseptörleri, meme, küçük hücreli akciğer ve yumurtalık dahil olmak üzere farklı kanserlerde kullanımı rapor edilmiştir (North vd., 2015). NMDA reseptörlerinin küçük moleküllü antagonistler ile hedeflenmesi, *in vitro* hücre canlılığında ve *in vivo* ksenograft tümör büyümesinde önemli düşüşler göstermiştir. MK-801'e ek olarak, ifenprodil de son zamanlarda hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak pankreatik kanserin tedavisi için değerlendirilmiştir (North vd., 2017).

Aday ilaçlardan Hidroflumetiazid ise hidroklorotiazid, tiyazid diüretiklerden biridir. Hidroflumetiazid, karbonik anhidraz inhibitörlerinde potansiyel bir çinko-bağlama fonksiyonu olarak işlev gören birincil sülfamoyl kısımları içerir (Supuran, 2008). Özellikle, membran ilişkili

karbonik anhidrazlar, tümör ile ilişkili bir protein grubu olarak bilinir, çünkü bunlar sadece sınırlı sayıda normal dokularda bulunurlar ve çok sayıda katı tümörde aşırı derecede eksprese edilirler. Karbonik anhidrazın kanser progresyonu ve kemoterapiye yanıt ile ilişkisi göz önüne alındığında, karbonik anhidraz inhibitörlerinin kanser tedavisi için büyük bir potansiyeli vardır (Monti vd., 2013).

Son aday ilaç Morantel ise veteriner hekimliğinde parazitik infestasyonların tedavisinde kullanılan tetrahidropirimidinlerin başlıca temsilcilerinden biridir. Bu anti-helmintik ilaçlar, parazitleri, nikotinik reseptörlerin indüksiyonu ile etkiler ve spastik felç ile sonuçlanır ve aynı zamanda, nematodların kas hücreleri üzerindeki asetilkolinesteraz reseptörlerinin güçlü bir agonistidir. Bu ilaçların nörotransmisyon omurgasızlarını bloke ettiği, nikotin benzeri özelliklere sahip olduğu ve otonomik gangliyon, adrenal medulla ve respiratuar dokularda reseptörlerde asetilkolin taklit ettiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu bileşikler, insanlar da dahil olmak üzere bir nörotransmitter olarak asetilkolin kullanan tüm organizmalar için toksiktir (Holden-Dye, 2007). Diğer tetrahidropirimidin aksine, morantel veya sitrat veya tartarat tuzları insan tedavisinde kullanılmamıştır. Ayrıca, günümüzde temininde büyük güçlükler çekilmektedir. Bu nedenle çalışmanın ilerleyen deneysel safhalarında morantel aday bir ilaç olarak değerlendirilmemiştir.

Dört aday ilacın (sülfametoksipiridazin, azlosilin, hidroflumetiyazid ve ifenprodil) hücre hatlarında sitotoksik etkisinin araştırılması, klinik açıdan önemli farklılıklar gösteren (üç prostat kanser hücre hattı (LNCaP, PC3 ve 22Rv1) ile bir kontrol grubu (immortalize edilmiş normal insan prostat epitel hücre hattı, RWPE1) üzerinde gerçekleştirilmiştir. LNCaP (ATCC-CRL-1740) prostat kanserinin metastaz yaptığı lenf nodlarından izole edilmiş androjen reseptörü pozitif (AR+) bir hücre hattıdır. PC-3 (ATCC-CRL-1435) prostat kanserinin metastaz yaptığı kemik dokularından izole edilmiş androjen reseptörü negatif (AR-) bir hücre hattıdır. 22Rv1 (ATCC-CRL-2505) immun yetersizliği olan farede ksenogrefte edilmiş insan primer prostat karsinom hücreleri olan androjen reseptörü pozitif (AR+) bir hücre hattıdır. Ayrıca, androjen reseptörünün overeksprese olduğu, prostat kanserinin metastaz yaptığı omurgadan izole edilen VCaP (ATCC-CRL-2876) hücre hattının deney grubu olarak kullanılması planlanmış ve bu amaçla hücreler kültür ortamına alınmıştır. Ancak, hücreler tüm optimizasyon çalışmalarına rağmen büyütülemedi. Çalışmada, metastatik özellikle AR+ olan hücre hattı LNCaP sağlıklı bir şekilde büyütüldüğü için ATCC'den yeni bir VCaP hücre hattı sipariş edilmemiştir. Bunun yerine, *in silico* çalışmalarda kullanılan veri setlerinin özelliklerini daha iyi yansıtmaları açısından primer prostat kanseri hücre modeli olarak 22Rv1'in kullanılmıştır.

Sitotoksiste deneylerinde ilaçların her hücre hattı üzerinde IC50 değerleri hesaplanmış, her bir ilacın hücrelere sitotoksik etkisi alamar blue kullanılarak belirlenmiştir. Sitotoksiste değerlendirmeleri sonucunda, ifenprodil ve hydroflumethiazide'nin aksine azlocillin ve sulfamethoxypyridazine'nin tüm hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki yapmadığı ve hücre proliferasyonunu azaltmadığı görülmüş ve ileri deneylere ifenprodil ve hydroflumethiazide ile devam edilmiştir.

İfenprodil ve hydroflumethiazide maruziyeti sonrası apoptozun hangi yolak aracılığıyla başladığı ve apoptozun erken veya geç evrede olup olmadığının belirlenmesi için, Kaspaz 3/7, 8 ve 9 aktivasyon seviyeleri (Konopleva vd., 1999; Tamaki vd., 2014) araştırılmıştır. Çalışmalar, ifenprodil'in tüm hücre hatlarında apoptozu hücre içi yolak vasıtasıyla indüklediğini göstermiştir. Öe yandan, bulgular Hydroflumethiazide'nin apoptozu hücre dışı yolağdan başlattığını düşündürmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada Jurkat hücre hattında dış yolağdan gelen apoptoz sinyalinin mitokondri yolağı tarafından amplifiye edildiği gösterilmiştir (Heimlich ve Cidlowski, 2005).

Kanser araştırmalarında hücre migrasyon çalışmaları, kanser hastalarının sağkalımı ve hastalığın metastatik süreci ile doğrudan ilişkilidir. Vücutta kanser yayılımı ve dağılımı için kanser hücrelerinin göçü ve hücre dışı matriksi aşarak invazyon yapması zorunluluktur. Bu nedenle, hücre kültüründe transwell (boyden chamber) migrasyon ve invazyon yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır (Kramer vd., 2013). İfenprodil ve hydroflumethiazide'nin prostat kanseri hücre hatlarında migrasyon ve invazyon davranışları incelendiğinde ise Hydroflumethiazide ve ifenprodil uygulamasının yapıldığı deney gruplarında matrijelden hücre geçişi ya gözlenmemiş ya da oldukça az sayıda hücrenin geçtiği saptanmıştır. Dolayısıyla, hydroflumethiazide ve ifenprodil uygulamasının hücrelerin membrandan geçişini ciddi oranda baskıladıkları değerlendirilmiştir. Ayrıca, İfenprodil'e maruziyetin çalışılan tüm hücre hatlarında koloni oluşturma davranışı üzerinde oldukça yüksek bir engelleyici etkisi olduğu görülmüştür. Hydroflumethiazide'e maruz bırakılan hücrelerin oluşturduğu koloni boyutlarında ise hafif azalmalar gözlemlenmiştir.

Çalışmada elde edilen bulgular, iki ilacın, özellikle de İfenprodil'in, prostat kanserinin tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırılması için yapılacak ileri araştırmalara (qPZR ile ilaç hedef genlerin anlatım seviyelerinin tespiti, western blot ile ilaç hedeflerinin protein ifadelerinin tayini, vb.) ve prelinik çalışmalara (*in vivo* hayvan deneyleri) önemli bir dayanak oluşturmaktadır. Proje kapsamında geliştirilen yöntemler prostat kanseri dışında diğer hastalıklar için de uygulanabilir nitelikte olup diğer kanser türleri olmak üzere başka kompleks hastalıklar için de benzer uygulamaların öncüsü olması beklenmektedir. Örneğin, proje

çalışmaları kapsamında literatürde ilk kez geliştirilen prostat kanserine özgü genom ölçekli bir metabolik model (Turanlı vd., 2019), bireysel metabolik varyasyonları yansıtması açısından ileri kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları için gelecek vadedmektedir. Ayrıca, projede kullanılan yöntem ve bulgular (işaretçi moleküller), tedaviye yönelik çıktıların yanı sıra, yeni ve doğru tanı ve teşhis yöntem ve araçlarının geliştirilmesi doğrultusunda da yön sunmakta ve gelecekte karmaşık insan hastalıklarına yönelik kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımları tasarlanmasında yardım potansiyeli taşımaktadır.

6. SONUÇ

Prostat kanserinde farklı biyolojik seviyelerden moleküller üzerinden ilaç repozisyonu yapmayı amaçlayan proje çalışmaları üç aşamada gerçekleştirilmiş ve çalışmalar neticesinde prostat kanserine özgü çok sayıda işaretçi molekül ile aday ilaç molekülleri belirlenmiştir.

Birinci aşamada, olası ilaç hedeflerini belirlemek üzere gerçekleştirilen biyoinformatik analizler farklı biyolojik seviyelerden çok sayıda molekülü işaret etmiştir. Prostat kanserine ait veri setlerinin meta-analizi sonucunda, sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında gen anlatımı (mRNA düzeyi) istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.01$) derecede azalan 3803 gen, artan 2934 gen olmak üzere toplam 6737 hastalıkta anlatımı farklılaşan gen tespit edilmiştir. Bu genlerden kodlanan proteinlerin fokal adezyon, ECM-reseptör etkileşimi, hücre farklılaşması, kanser yolakları gibi kanser mekanizmaları ile ilişkili yolak ve biyolojik süreçlerle ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen bu bilginin, genom seviyeli biyolojik ağlar (protein-protein etkileşim, transkripsiyon kontrol ve metabolik ağlar) ile bütünleştirilerek işaretçi moleküllerin tespiti ve bulguların diğer kanserlere (Akciğer kanseri, Beyin tümörü, Cilt kanseri, Kolorektal kanser, Lösemi, Meme kanseri, Oral kanser, Over kanseri, Özofagus kanseri, Pankreas kanseri, Servikal kanser ve Tiroid kanseri) ait mevcut bulgular ile karşılaştırılması sonucunda 4 transkripsiyon faktörü, 134 miRNA, 127 metabolit ve 51 hub proteinin prostat kanserine özgü işaretçi moleküller olduğu belirlenmiştir. Söz konusu işaretçi moleküllerin görev aldıkları yolaklar incelendiğinde, pürin ve pirimidin gibi nükleik asit metabolizmaları ve yağ asidi metabolizmalarıyla ilgili yolların prostat kanserinde ön plana çıktığı görülmüştür.

İkinci aşamada, olası ilaç hedefi olarak tespit edilen işaretçi molekül bilgisi ilaç repozisyonu araçlarına girdi olarak kullanılarak, prostat kanseri tedavisinde aday olarak değerlendirilmek üzere olası ilaç adayları tespit edilmiştir. Bu aşamada benzetimler, mevcut web tabanlı ilaç repozisyonu araçlarının yanı sıra proje kapsamında oluşturduğumuz, prostat kanser dokusuna özgü transkriptom ve proteom verilerini içeren prostat kansere özgü bir genom-seviyeli metabolik model arayıcılığıyla literatürde etkinliği kanıtlanmış çeşitli algortimalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerek mevcut web araçları kullanılarak gerçekleştirilen, gerekse prostat kanserine özgü genom ölçekli metabolik model üzerinden gerçekleştirilen ilaç repozisyonu çalışmaları neticesinde çok sayıda ilaç adayı tespit edilmiştir. Bu aday ilaçların, prostat kanseri için yenilikçilik düzeyini belirlemek adına kapsamlı bir literatür taraması yapılmış ve prostat kanseri tedavisi için bu çalışmada önerilen ilaçlardan 12'sinin zaten prostat kanseri tedavisinde önerildiği veya test edildiği görülmüştür. Bu sonuçları gelecek analizler için pozitif kontrol olarak kabul ederek kalan ilaçlara yoğunlaşıldığında, diğer kanserle ilgili mevcut çalışmalar, ilaç etki mekanizması bilgisi, etkileşimde bulunduğu

proteinler ve bu proteinlerin kanserleşme mekanizmaları ile ilişkisi, ilacın temin kolaylığı ve benzeri açılardan ilgili literatür ve veri bankaları (DrugBank, PharmGKB, KEGG Drugs, vb.) çerçevesinde değerlendirilerek 11 ilacın daha önce prostat kanseri için anti-kanser ajan olarak tanımlanmadığı ve deneysel çalışmalar için uygun olabileceği değerlendirilmiştir. Prostat kansere özgü metabolik model ile *in silico* hücre canlılığı testleri 11 ilaç için incelendiğinde de, 5 ilacın (sülfametoksipiridazin, azlosilin, morantel, hidroflumetiyazid ve ifenprodil) tümör büyümesini % 80-90 oranda inhibe ettiği görülmüş ve bu 5 ilaç deneysel çalışmalar için öncelikli adaylar olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmanın üçüncü ve son aşamasında ise prostat kanserinde klinik açıdan önemli farklı özellikler gösteren üç kanser hücre hattı (LNCaP, PC3 ve 22Rv1) ile bir kontrol grubu hücre hattı (RWPE1) üzerinde ilaçların 24, 48 ve 72. saatlerdeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Azlocillin, Sulfamethoxypyridazine ve Zenarestat maruziyetinin çalışılan hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak sitotoksik etki yapmadığı ve hücre proliferasyonunu azaltmadığı tespit edilmiş; öte yandan İfenprodil ve Hydroflumethiazide uygulamalarında kanser hücre hatlarında yüksek sitotoksikite gözlemlenirken, kontrol grubu olarak kullanılan sağlıklı hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı bir etki gözlemlenmediğinden, IC₅₀ değerleri ve sitotoksikite analizleri dikkate alınarak proje kapsamında yapılması planlanan ileri deneylere İfenprodil ve Hydroflumethiazide ile devam edilmiştir. İlaçların kaspaz 3/7, 8 ve 9 aktivasyonu ile apoptotik etkisinin incelenmesi sonucu, İfenprodil'in kaspaz seviyelerinde artışlar gözlemlenmiş ve tüm hücre hatlarında apoptozu hücre içi yolak vasıtasıyla indüklediği değerlendirilmiştir. Öte yandan, Hydroflumethiazide'in kaspaz aktivasyonu ile apoptotik etkisinin araştırılması neticesinde, tüm hücre hatlarında bütün kaspaz seviyelerinde artış gözlenmiş ve bulgular apoptozun hücre dışı yolak aracılığıyla başladığını düşündürmüştür. Ayrıca, gerçekleştirilen migrasyon ve invazyon testlerinde, hidroflumethiazide ve ifenprodil uygulamasının hücrelerin membrandan geçişini ciddi oranda baskıladıkları tespit edilmiştir. İfenprodil'e maruziyetin çalışılan tüm hücre hatlarında koloni oluşturma davranışı üzerinde oldukça yüksek bir engelleyici etkisi olduğu görülmüştür. Hydroflumethiazide'e maruz bırakılan hücrelerin oluşturduğu koloni boyutlarında ise hafif azalmalar gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, iki ilacın, özellikle de İfenprodil'in, prostat kanserinin tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırılması için yapılacak ileri araştırmalara ve prelinik çalışmalara (*in vivo* hayvan deneyleri) önemli bir dayanak oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR LİSTESİ

- Agalliu, I., Lin, D. W., Salinas, C. A., Feng, Z., Stanford, J. L. 2006. "Polymorphisms in the glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genes and prostate cancer prognosis.", *The Prostate*, 66(14), 1535–1541.
- Agren, R., Liu, L., Shoaie, S., Vongsangnak, W., Nookaew, I., Nielsen, J. 2013. "The RAVEN Toolbox and Its Use for Generating a Genome-scale Metabolic Model for *Penicillium chrysogenum*.", *PLoS Computational Biology*, 9(3), e1002980.
- Agren, R., Mardinoglu, A., Asplund, A., Kampf, C., Uhlen, M., Nielsen, J. 2014. "Identification of anticancer drugs for hepatocellular carcinoma through personalized genome-scale metabolic modeling.", *Molecular systems biology*, 10(3), 721.
- Al Kadhi, O., Traka, M. H., Melchini, A., Troncso-Rey, P., Jurkowski, W., Defernez, M., Pachori, P., Mills, R. D., Ball, R. Y., Mithen, R. F. 2017. "Increased transcriptional and metabolic capacity for lipid metabolism in the peripheral zone of the prostate may underpin its increased susceptibility to cancer.", *Oncotarget*, 8(49), 84902–84916.
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., Federici, L. 2018. "Glutathione transferases: Substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases.", *Oncogenesis*, 7(1), 1-15.
- Balderas-Renteria, I., Gonzalez-Barranco, P., Garcia, A., K Banik, B., Rivera, G. 2012. "Anticancer drug design using scaffolds of β -lactams, sulfonamides, quinoline, quinoxaline and natural products. Drugs advances in clinical trials.", *Current medicinal chemistry*, 19(26), 4377-4398.
- Banno, K., Iida, M., Yanokura, M., Irie, H., Masuda, K., Kobayashi, Y., Aoki, D. 2015. "Drug repositioning for gynecologic tumors: A new therapeutic strategy for cancer.", *Scientific World Journal*, 2015.
- Barrett, T., Edgar, R. 2006. "Mining microarray data at NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO).", *Gene Mapping, Discovery, and Expression: Methods and Protocols*, 338, 175-190.
- Becker, K. G., Barnes, K.C., Bright, T. J., Wang, S. A. 2004. "The genetic association database.", *Nature genetics*, 36(5), 431-432.

Bidkhorı, G., Benfeitas, R., Elmas, E., Kararoudi, M. N., Arif, M., Uhlen, M., Nielsen, J., Mardinoglu, A. 2018. "Metabolic network-based identification and prioritization of anticancer targets based on expression data in hepatocellular carcinoma." *Frontiers in physiology*, 9, 916.

Bovolenta, L. A., Acencio, M. L., Lemke, N. 2012. "HTRIdb: an open-access database for experimentally verified human transcriptional regulation interactions.", *BMC genomics*, 13(1), 405.

Bradley, D., Rathkopf, D., Dunn, R., Stadler, W. M., Liu, G., Smith, D. C., Pili, R., Zwiebel, J., Scher, H., Hussain, M. 2009. "Vorinostat in advanced prostate cancer patients progressing on prior chemotherapy (National Cancer Institute Trial 6862): trial results and interleukin-6 analysis: a study by the Department of Defense Prostate Cancer Clinical Trial Consortium and University of Chicago Phase 2 Consortium.", *Cancer*, 115(23), 5541–5549.

Bradlow, L., Carruba, G. 2011. "cancer OMICS". *Omics: a journal of integrative biology*, 15(3), 91-92.

Brazma, A., Parkinson, H., Sarkans, U., Shojatalab, M., Vilo, J., Abeygunawardena, N., Oezcimen, A. 2003. "ArrayExpress—a public repository for microarray gene expression data at the EBI.", *Nucleic acids research*, 31(1), 68-71.

Calimlioglu, B., Karagoz, K., Sevimoglu, T., Kilic, E., Gov, E., Arga, K. Y. 2015. "Tissue-specific molecular biomarker signatures of type 2 diabetes: an integrative analysis of transcriptomics and protein–protein interaction data.", *Omics: a journal of integrative biology*, 19(9), 563-573.

Caliskan, A., Andac, A. C., Arga, K. Y. 2020. "Novel molecular signatures and potential therapeutics in renal cell carcinomas: Insights from a comparative analysis of subtypes.", *Genomics*.

Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T. 2002. "Sulfonamide derivatives with protease inhibitory action as anticancer, anti-inflammatory and antiviral agents.", *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 12(9), 1307-1327.

Chagoyen, M., & Pazos, F. 2011. "MBRole: enrichment analysis of metabolomic data.", *Bioinformatics*, 275, 730-731.

Chou, C. H., Chang, N. W., Shrestha, S., Hsu, S. D., Lin, Y. L., Lee, W. H., Tsai, T. R. 2016. "miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database.", *Nucleic acids research*, 44(D1), D239-D247.

Civelek, M., Lusis, A. J. 2014. "Systems genetics approaches to understand complex traits.", *Nature Reviews Genetics*, 15(1), 34-48.

Colaprico, A., Silva, T. C., Olsen, C., Garofano, L., Cava, C., Garolini, D., Sabedot, T. S., Malta, T. M., Pagnotta, S. M., Castiglioni, I., Ceccarelli, M., Bontempi, G., Noushmehr, H. 2016. "TCGAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data.", *Nucleic Acids Research*, 44(8), e71.

Corn, P., Wang, F., McKeehan, W., Navone, N. 2013. "Targeting Fibroblast Growth Factor Pathways in Prostate Cancer.", *Clinical cancer research*, 19(21), 5856-5866.

Di Pietro, G., Magno, L. A. V., Rios-Santos, F. 2010. "Glutathione S-transferases: an overview in cancer research.", *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 6(2), 153-170.

Eddy, J. A., Hood, L., Price, N. D., Geman, D. 2010. "Identifying tightly regulated and variably expressed networks by Differential Rank Conservation (DIRAC).", *PLoS Computational Biology*, 6(5), 1-17.

Ehsanian, R., Van Waes, C., Feller, S. M. 2011. "Beyond DNA binding - A review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers.", *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 13.

Garcia-Albornoz, M., Thankaswamy-Kosalai, S., Nilsson, A., Väre, L., Nookaew, I., Nielsen, J. 2014. "BioMet Toolbox 2.0: genome-wide analysis of metabolism and omics data", *Nucleic acids research*, 42(W1), W175-W181.

Gov, E., Arga, K. Y. 2014. "Genetic mutations are characterized by increase in entropy at the transcriptional level.", *Journal of Biological Systems*, 22(03), 377-391.

Gov, E., Arga, K. Y. 2016. "Integrative cooperation and hierarchical operation of microRNA and transcription factor crosstalk in human transcriptional regulatory network." *IET Systems Biology*, 10(6), 219-228.

Gov, E., Arga K. Y. 2017. "Differential co-expression analysis reveals a novel prognostic gene module in ovarian cancer.", *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.

Gulfidan, G., Turanli, B., Beklen, H., Sinha, R., Arga, K. Y. 2020. "Pan-cancer mapping of differential protein-protein interactions.", *Scientific reports*, 10(1), 1-12.

Green, T., Chen, X., Ryan, S., Asch, A. S., Ruiz-Echevarría, M. J. 2013. "TMEFF2 and SARDH cooperate to modulate one-carbon metabolism and invasion of prostate cancer cells.", *The Prostate*, 73(14), 1561–1575.

Grossman, R. L., Heath, A., Murphy, M., Patterson, M., Wells, W. 2016. "A case for data commons: Toward data science as a service.", *Computing in science & engineering*, 18(5), 10–20.

Hamosh, A., Scott, A. F., Amberger, J. S., Bocchini, C. A., & McKusick, V. A. 2005. "Online Mendelian Inheritance in Man OMIM, a knowledgebase of human genes and genetic disorders.", *Nucleic acids research*, 33(suppl 1), D514-D517.

Hanahan, D., Weinberg, R. A. 2011. "Hallmarks of cancer: the next generation.", *cell*, 144(5), 646-674.

Heimlich, G., Cidlowski, J. A. 2006. "Selective role of intracellular chloride in the regulation of the intrinsic but not extrinsic pathway of apoptosis in Jurkat T-cells.", *Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 2232-2241.

Hewett, M., Oliver, D. E., Rubin, D.L., Easton, K.L., Stuart, J.M., Altman, R.B., Klein, T.E. 2002. "PharmGKB: the pharmacogenetics knowledge base.", *Nucleic acids research*, 30(1), 163-165.

Hirschhorn, J. N., Daly, M. J. 2005. "Genome-wide association studies for common diseases and complex traits.", *Nature Reviews Genetics*, 6(2), 95-108.

Holden-Dye, L., Walker, R. J. 2007. "Anthelmintic drugs.", *WormBook: the online review of C. elegans biology*, 1–13.

Hsu, S. D., Tseng, Y. T., Shrestha, S., Lin, Y. L., Khaleel, A., Chou, C. H., Chu, C. F., Huang, H., Lin, C. M., Ho, S. Y., Jian, T. Y., Lin, F. M., Chang, T. H., Weng, S. L., Liao, K. W., Liao, I. E., Liu, C. C., Huang, H. D. 2014. "miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions.", *Nucleic acids research*, 42(D1), D78-D85.

Hu, G., Agarwal, P. 2009. "Human disease-drug network based on genomic expression profiles.", *PloS one*, 4(8), e6536.

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. 2009. "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists.", *Nucleic acids research*, 37(1), 1-13.

Iglesias-Gato, D., Wikström, P., Tyanova, S., Lavalley, C., Thysell, E., Carlsson, J., Hägglöf, C., Cox, J., Andrén, O., Stattin, P., Egevad, L., Widmark, A., Bjartell, A., Collins, C. C., Bergh, A., Geiger, T., Mann, M., Flores-Morales, A. 2016. "The Proteome of Primary Prostate Cancer.", *European urology*, 69(5), 942–952.

Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., Speed, T. P. 2003. "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data.", *Biostatistics*, 4(2), 249-264.

Iskar, M., Campillos, M., Kuhn, M., Jensen, L. J., van Noort, V., Bork, P. 2010. "Drug-induced regulation of target expression.", *PLoS Computational Biology*, 6(9), e1000925.

Islam, T., Rahman, R., Gov, E., Turanli, B., Gulfidan, G., Haque, A., Arga, K. Y., Haque Mollah, N. 2018. "Drug targeting and biomarkers in head and neck cancers: insights from systems biology analyses.", *Omics: a journal of integrative biology*, 22(6), 422-436.

Jain, S., Chakraborty, G., Raja, R., Kale, S., Kundu, G. C. 2008. "Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer.", *Cancer Research*, 68(19), 7750–7759.

Jennings, B. A., Willis, G. 2015. "How folate metabolism affects colorectal cancer development and treatment; a story of heterogeneity and pleiotropy.", *Cancer letters*, 356(2), 224-230.

Kamburov, A., Wierling, C., Lehrach, H., Herwig, R. 2009. "ConsensusPathDB--a database for integrating human functional interaction networks", *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D623-D628.

Karagoz, K., Sevimoglu, T., Arga, K. Y. 2016. "Integration of multiple biological features yields high confidence human protein interactome", *Journal of Theoretical Biology*, 403, 85-96.

Karagoz, K., Sinha R., Arga K. Y. 2015. "Triple negative breast cancer: A multi-Omics network discovery strategy for candidate targets and driving pathways", *Omics: a journal of integrative biology*, 19(2), 115–130.

Keiser, M. J., Setola, V., Irwin, J. J., Laggner, C., Abbas, A. I., Hufeisen, S. J., Jensen, N. H., Kuijter, M. B., Matos, R. C., Tran, T. B., Whaley, R., Glennon, R. A., Hert, J., Thomas, K. L., Edwards, D. D., Shoichet, B. K., Roth, B. L. 2009. "Predicting new molecular targets for known drugs.", *Nature*, 462(7270), 175–181.

Konopleva, M., Zhao, S., Xie, Z., Segall, H., Younes, A., Claxton, D. F., Estrov, Z., Kornblau, S. M., Andreeff, M. 1999. "Apoptosis. In Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma III.", Springer, Boston, MA, pp, 217-236.

Kopecka, J., Campia, I., Jacobs, A., Frei, A. P., Ghigo, D., Wollscheid, B., Riganti, C., 2015. "Carbonic anhydrase XII is a new therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer cells.", *Oncotarget* 6(9), 6776–93.

Kori, M., Gov, E., Arga, K. Y. 2016. "Molecular Signatures of Ovarian Diseases: Insights from Network Medicine Perspective.", *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 62(4), 266-282.

Kori, M., Arga, K. Y. 2018. "Potential biomarkers and therapeutic targets in cervical cancer: Insights from the meta-analysis of transcriptomics data within network biomedicine perspective.", *PloS one*, 13(7), e0200717.

Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., Dolznig, H. 2013. "In vitro cell migration and invasion assays.", *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 752(1), 10-24.

Lamb, J., Crawford, E. D., Peck, D., Modell, J. W., Blat, I. C., Wrobel, M. J., Lerner, J., Brunet, J., Subramanian, A., Ross, K. N., Reich, M., Hieronymus, H., Wei, G., Armstrong, S. a, Haggarty, S. J., Clemons, P., Wei, R., Carr, S. 2006. "The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease.", *Science*, 313(5795), 1929–1935.

Law, V., Knox, C., Djoumbou, Y., Jewison, T., Guo, A. C., Liu, Y., Tang, A. 2014. "DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism.", *Nucleic acids research*, 42(D1), D1091-D1097.

Li, J., Zheng, S., Chen, B., Butte, A. J., Swamidass, S. J., Lu, Z. 2016. "A survey of current trends in computational drug repositioning.", *Briefings in Bioinformatics*, 17(1), 2–12.

Li, Q., Shu, Y. 2014. "Role of solute carriers in response to anticancer drugs.", *Molecular and cellular therapies*, 2(1), 1-14.

Liang, C., Li, Y., Luo, J., Zhang, Z. 2015. "A novel motif-discovery algorithm to identify co-regulatory motifs in large transcription factor and microRNA co-regulatory networks in human", *Bioinformatics*, 31(14), 2348-55.

Lin, C. Y., Chin, C. H., Wu, H. H., Chen, S. H., Ho, C. W., Ko, M. T. 2008. "Hubba: hub objects analyzer—a framework of interactome hubs identification for network biology", *Nucleic acids research*, 36(suppl_2), 438-443.

Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., Giacomini, K. M. 2015. "SLC transporters as therapeutic targets: Emerging opportunities.", *Nature reviews Drug discovery*, 14(8), 543-560.

López-Ibáñez, J., Pazos, F., Chagoyen, M. 2016. "MBROLE 2.0-functional enrichment of chemical compounds", *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W201–W204.

Mardinoglu, A., Agren, R., Kampf, C., Asplund, A., Uhlen, M., and Nielsen, J. 2014. "Genome-scale metabolic modelling of hepatocytes reveals serine deficiency in patients with nonalcoholic fatty liver disease.", *Nature communications*, 5(1), 1-11.

Mayer, M. J., Klotz, L. H., Venkateswaran, V. 2015. "Metformin and prostate cancer stem cells: a novel therapeutic target.", *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 18(4), 303-309.

Menezes, R.X, Boetzer, M., Sieswerda, M., van Ommen, G.J, Boer J.M. 2009. "Integrated analysis of DNA copy number and geneexpression microarray data using gene sets", *BMC Bioinformatics*, 10(1), 1-15.

Monti, S. M., Supuran, C. T., De Simone, G. 2013. "Anticancer carbonic anhydrase inhibitors: a patent review (2008–2013).", *Expert opinion on therapeutic patents*, 23(6), 737-749.

Mudunuri, U., Che, A., Yi, M., Stephens, R. M. 2009. "BioDBnet: the biological database network.", *Bioinformatics*, 25(4), 555-556.

North, W. G., Liu, F., Lin, L. Z., Tian, R. 2017. "NMDA receptors are important regulators of pancreatic cancer and are potential targets for treatment.", *Clinical pharmacology: advances and applications*, 9, 79–86.

North, W. G., Liu, F., Tian, R., Abbasi, H., Akerman, B. 2015. "NMDA receptors are expressed in human ovarian cancer tissues and human ovarian cancer cell lines.", *Clinical pharmacology: advances and applications*, 7, 111.

Patil, K. R., Nielsen, J. 2005. "Uncovering transcriptional regulation of metabolism by using metabolic network topology.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8), 2685-2689.

Perry, A. S., Watson, R. W. G., Lawler, M., Hollywood, D. 2010. "The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer.", *Nature Reviews Urology*, 7(12), 668.

Petersen, L. F., Brockton, N. T., Bakkar, A., Liu, S., Wen, J., Weljie, A. M., Bismar, T. A. 2012. "Elevated physiological levels of folic acid can increase in vitro growth and invasiveness of prostate cancer cells.", *BJU International*, 109(5), 788–795.

Phillips, R. 2014. "Prostate cancer: Dasatinib fails to improve on docetaxel for metastatic CRPC.", *Nature Reviews Urology*, 11(1), 5-5.

Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Marti, R. M., Macià, A., Panosa, A. 2019. "In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis.", *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 107.

Piñero, J., Queralt-Rosinach, N., Bravo, À., Deu-Pons, J., Bauer-Mehren, A., Baron, M., & Furlong, L. I. 2015. "DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes." *Database*. 2015, bav028.

Platz, E. A., Yegnasubramanian, S., Liu, J. O., Chong, C. R., Shim, J. S., Kenfield, S. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Giovannucci, E., Nelson, W. G. 2011. "A novel two-stage, transdisciplinary study identifies digoxin as a possible drug for prostate cancer treatment.", *Cancer discovery*, 1(1), 68–77.

Portales-Casamar, E., Arenillas, D., Lim, J., Swanson, M. I., Jiang, S., McCallum, A., Kirov, S., Wasserman, W. W. 2009. "The PAZAR database of gene regulatory information coupled to the ORCA toolkit for the study of regulatory sequences.", *Nucleic acids research*, 37(suppl_1), D54-D60.

Qian, D., Wei, Y. F., Wang, X., Kato, Y., Cheng, L., Pili, R. 2007. "Antitumor Activity of the Histone Deacetylase Inhibitor MS-275 in Prostate Cancer Models.", *The Prostate*. 67(11), 1182-1193

Ramsay, E. E., Dilda, P. J. 2014. "Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors.", *Frontiers in pharmacology*, 5, 181.

Seaton, A., Maxwell, P. J., Hill, A., Gallagher, R., Pettigrew, J., Wilson, R. H., Waugh, D. J. J. 2009. "Inhibition of constitutive and cxc-chemokine-induced NF- κ B activity potentiates ansamycin-based HSP90-inhibitor cytotoxicity in castrate-resistant prostate cancer cells.", *British Journal of Cancer*, 101(9), 1620–1629.

Sevimoglu, T., Arga, K. Y. 2015. "Computational systems biology of psoriasis: Are we ready for the age of omics and systems biomarkers?.", *Omics: a journal of integrative biology*, 19(11), 669-687.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Ideker, T. 2003. "Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.", *Genome research*, 13(11), 2498-2504.

Sharifi, N., Auchus, R.J. 2012. "Steroid biosynthesis and prostate cancer.", *Steroids*, 77(7), 719-726.

Shim, J.S., Liu, J.O. 2014. "Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs.", *International journal of biological sciences*, 10(7), 654.

Shiota, M., Fujimoto, N., Itsumi, M., Takeuchi, A., Inokuchi, J., Tatsugami, K., Yokomizo, A., Kajioka, S., Uchiumi, T., Eto, M. 2017. "Gene polymorphisms in antioxidant enzymes correlate with the efficacy of androgen-deprivation therapy for prostate cancer with implications of oxidative stress.", *Annals of oncology*, 28(3), 569–575.

Sinnott, J. A., Rider, J. R., Carlsson, J., Gerke, T., Tyekucheva, S., Penney, K. L., Sesso, H. D., Loda, M., Fall, K., Stampfer, M. J., Mucci, L. A., Pawitan, Y., Andersson, S. O., Andrén, O. 2015. "Molecular differences in transition zone and peripheral zone prostate tumors.", *Carcinogenesis*, 36(6), 632–638.

Smyth, G. K. 2005. "Limma: linear models for microarray data. In *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*.", Springer New York, pp. 397-420.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., Mesirov, J. P. 2005. "Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), 15545–15550.

Supuran, C. T. 2008. "Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators.", *Nature reviews Drug discovery*, 7(2), 168.

Tamaki, H., Harashima, N., Hiraki, M., Arichi, N., Nishimura, N., Shiina, H., Naora, K., Harada, M. 2014. "Bcl-2 family inhibition sensitizes human prostate cancer cells to docetaxel and promotes unexpected apoptosis under caspase-9 inhibition.", *Oncotarget*, 5(22), 11399–11412.

Takakura, M., Yokomizo, A., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Banno, M., Sakuma, T., Imada, K., Oda, Y., Kamita, M., Honda, K., Yamada, T., Naito, S., Ono, M. 2012. "Carbonic Anhydrase I as a New Plasma Biomarker for Prostate Cancer.", *International Scholarly Research Notices*, 2012.

Tomczak, K., Czerwińska, P., Wiznerowicz, M. 2015. "The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge.", *Contemporary Oncology*, 19(1A), A68-77.

Turanli, B., Grøtli, M., Boren, J., Nielsen, J., Uhlen, M., Arga, K.Y., Mardinoglu, A. 2018. "Drug Repositioning for Effective Prostate Cancer Treatment.", *Frontiers in physiology*, 9, 500

Turanli, B., Gulfidan, G., Arga, K. Y. 2017. "Transcriptomic-Guided Drug Repositioning Supported by a New Bioinformatics Search Tool: geneXpharma.", *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 21(10), 584–591.

Turanli, B., Zhang, C., Kim, W., Benfeitas, R., Uhlen, M., Arga, K. Y., Mardinoglu, A. 2019. "Discovery of therapeutic agents for prostate cancer using genome-scale metabolic modeling and drug repositioning.", *EBioMedicine*, 42, 386-396.

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigyharto, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., Feilitzén, K. Von, Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., Heijne, G. Von, Nielsen, J., Pontén, F., 2015. "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome.", *Science*, 347(6220), 1260419.

Uhlen, M., Zhang, C., Lee, S., Sjöstedt, E., Fagerberg, L., Bidkhori, G., Benfeitas, R., Arif, M., Liu, Z., Edfors, F., Sanli, K., Von Feilitzén, K., Oksvold, P., Lundberg, E., Hober, S., Nilsson, P., Mattsson, J., Schwenk, J. M., Brunnström, H., Glimelius, B., Sjöblom, T., Edqvist, P. H., Djureinovic, D., Micke, P., Lindskog, C., Mardinoglu, A., Pontén, F., 2017. "A pathology atlas of the human cancer transcriptome.", *Science*, 357(6352), eaan2507.

Wagner, A. H., Coffman, A. C., Ainscough, B. J., Spies, N. C., Skidmore, Z. L., Campbell, K. M., & Walker, J. R. 2016. "DGIdb 2.0: mining clinically relevant drug–gene interactions.", *Nucleic acids research*, 44(D1), D1036-D1044.

Wesche, J., Haglund, K., Haugsten, E.M. 2011. "Fibroblast growth factors and their receptors in cancer.", *Biochemical Journal*, 437(2), 199–213.

Williams, K. 2001. "Ifenprodil, a novel NMDA receptor antagonist: site and mechanism of action.", *Current drug targets*, 2(3), 285-298.

Yang, L., Agarwal, P. 2009. "Systematic drug repositioning based on clinical side-effects.", *PLoS one*, 6(12), e28025.

Zhang, C., Ji, B., Mardinoglu, A., Nielsen, J., Hua, Q. 2015. "Logical transformation of genome-scale metabolic models for gene level applications and analysis.", *Bioinformatics*, 31(14), 2324–2331.

Zhang, H., Qian, D. Z., Tan, Y. S., Lee, K., Gao, P., Ren, Y. R., Rey, S., Hammers, H., Chang, D., Pili, R., Dang, C. V., Liu, J. O., Semenza, G. L. 2008. "Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(50), 19579–19586.