



**UYARI: Proje örnekleri; bütünlük arzeden ideal bir proje anlamına gelmemekle birlikte, araştırmacılara proje yazımında yardımcı olmak ve fikir vermek amacı ile daha önce TÜBİTAK'a sunulan çeşitli projelerin Özet/Abstract, Amaç ve Hedefler, Konu, Kapsam ve Literatür Özeti, Özgün Değer, Yöntem, Proje Yönetimi, Ekip ve Araştırma Olanakları ile Yaygın Etki bölümlerinden alıntılar yapılarak oluşturulmuştur.**

## 1001 – BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA PROJELERİNİ DESTEKLEME PROGRAMI

**Başvurunun bilimsel değerlendirmeye alınabilmesi için, Arial 9 yazı tipinde hazırlanması ve toplamda 20 sayfayı geçmemesi gerekmektedir. (EK-1 ve EK-2 hariç) (\*)**

**Araştırma proje önerisi değerlendirme formuna**

[http://www.tubitak.gov.tr/tubitak\\_content\\_files/ARDEB/destek\\_prog/danisman\\_panelist/DA\\_Panelist\\_Proje\\_Onerisi\\_Degerlendirme\\_Formu.doc](http://www.tubitak.gov.tr/tubitak_content_files/ARDEB/destek_prog/danisman_panelist/DA_Panelist_Proje_Onerisi_Degerlendirme_Formu.doc)  
adresinden ulaşabilirsiniz.

### 1. PROJE ÖZETİ

Proje başlığı, özeti ve anahtar kelimeler Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır. **Proje özetleri birer sayfayı geçmemelidir.** Özet (summary) projenin soyut bir tanıtımı değil, ana hatları ile önerilen projenin:

- Amacı,
- Konunun kısa bir tanıtımı, neden bu konunun seçildiği ve özgün değeri,
- Kuramsal yaklaşım ve kullanılacak yöntemin ana hatları,
- Ulaşılmak istenen hedefler ve beklenen çıktılarının bilimsel, teknolojik ve sosyo-ekonomik ne tür katkılarda bulunabileceği

hususlarında ayrı paragraflar halinde kısa ve net cümlelerle bilgi verici nitelikte olmalıdır.

Anahtar Kelimeler ve İngilizce karşılıkları (keywords) uluslararası literatüre uygun bir şekilde seçilerek özet sayfasının sonundaki ilgili bölümde ayrıca belirtilmelidir.

**Proje Başlığı :** xxx

#### Proje Özeti

5-Lipoksijenaz (5-LO), araşidonik asitten (AA) lökötrien (LT) biyosentezinde ilk basamağı katalizleyen enzimdir. Bu basamak AA'nin 5-LO enzimi tarafından kullanılabilmesine yardımcı bir protein, "5-LO aktive edici protein (FLAP)" varlığında gerçekleşir. LT'ler enflamatuvar ve alerjik hastalıkların patofizyolojisinde önemli rol oynayan mediyatörler olup, 5-LO yolağı ile sentezlenen LT'lerin ateroskleroz, kanser ve osteoporozda da önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu sebeple, 5-LO enzimi ve/veya FLAP yardımcı proteinin inhibisyonu sonucu erken basamakta LT biyosentezinin engellenmesi gerçekleştirilerek özellikle astım gibi antilökötrien tedavi gerektiren hastalıklar için bu proteinler önemli birer ilaç hedefi haline gelmiştir. FLAP ve 5-LO proteinin kristal yapılarının 2011 ve 2007 yıllarında açıklanmış olması nedeniyle her iki protein için çok kısıtlı sayıda yapı aktivite çalışması mevcuttur.

Bu bilgiler ışığında 5-LO ve FLAP proteinlerinin aktif bölgelerinin yapısal özelliklerinin anlaşılması ve etkin inhibitörlerin geliştirilmesi üzerine çalışmalarımız sırasında bu proje önerisi için temel araştırma safhasının tamamlandığı ön sonuçlara ulaşılmıştır. Ön çalışmalarımızda benzimidazol ana yapısını taşıyan bir seri bileşik sentezi gerçekleştirilmiş ve FLAP inhibitör aktivite gösteren BRP-7 kodlu bileşik bu projedeki ileri çalışmaların temelini oluşturmak üzere öncü bileşik olarak seçilmiştir. BRP-7 bileşiğı ile yapılan farmakolojik çalışmalarımız sonucunda bu bileşiğın saflaştırılmış 5-LO enzimini inhibe etmediğı ancak bu enzimi barındıran insan lökositlerinde LT biyosentezini 0.31 µM IC50 degeri ile inhibe ettiği tespit edilmiştir (bu test sisteminde ticari olarak mevcut tek LT biyosentez inhibitörü olan Zileuton için IC50 degeri 0.8 µM olarak bulunmuştur). FLAP inhibitörlerinin karakteristik özelliklerinden birisi 5-LO enziminin sitozolden nötrofilin perinükleer bölgesine translokasyonunu bloke etmesidir. Çalışmalarımız sonucu BRP-7'nin artan konsantrasyonlarda 5-LO enziminin nükleer membrana translokasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir ve translokasyonun inhibisyonu 1 µM konsantrasyonda başlamıştır.

Bunun yanında FLAP inhibitörleri için bir diğer karakteristik özellik artan AA konsantrasyonlarında inhibitor aktivitenin bozulmasıdır ki ortama ilave edilen 40 µM AA BRP-7'nin inhibitor aktivitesini engellemiştir. BRP-7 bileşiğının AA metabolik yolağında ki diğer enzimler üzerinde inhibitor etkileri de araştırılmış, COX-1, COX-2 ve mPGES-1 enzimleri üzerinde 10-50 µM konsantrasyonlarda inhibitor etkisi gözlenmemiştir. BRP-7'nin in vivo olarak sıçanlarda akciğer zarı iltahabını önleyici etkisi "karragenan-ile-indüklenmiş pleurisy yöntemi" ile test edilmiş ve pleural kavitedeki eksuda volümünü % 33 oranında azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca pelural kavitedeki enflamatuvar hücre sayısını % 20 ve LTB4 miktarını ise % 29 inhibe ettiği belirlenmiştir. Her ne kadar BRP-7'nin in vivo aktivitesi yüksek bulunmadıysa da, LTB4 oluşumu için spesifik etkisi dikkat çekicidir. Ayrıca BRP-7 için kardiyak toksisite biyomarker'ı olan hERG inhibisyonu test edilmiş ve 10 µM konsantrasyonda hERG inhibisyonu % 1'den az bulunmuştur. Bunun yanında ilaç etkileşimleri ve toksisite açısından önemli bir enzim olan CYP3A4 üzerindeki inhibitor etkisi 1-25 µM konsantrasyon aralığında test edilmiş ve BRP-7'nin bu enzimi inhibe etmediğı gösterilmiştir. Böylece çalışmalarımız sonucu, selektif FLAP inhibitörü olarak temel araştırma aşaması ve keşif fazını tamamlanmış olan BRP-7 öncü bileşiğı ön klinik çalışmalar için daha potent ilaç adayı geliştirmek amacıyla bu projenin başlangıç noktasını oluşturmak üzere seçilmiştir.

Bu proje kapsamında BRP-7 bileşiminin daha potent türevlerinin geliştirilmesi amacıyla kimyasal sentez, moleküler modelleme ve biyolojik aktivite test çalışmaları yürütülecek olup kurulacak yapı-etki ilişkileri sonucu FLAP inhibitor aktivitesi geliştirilmiş ilaç adayı olabilecek yeni türevlere ulaşılması planlanmaktadır. Ayrıca BRP-7'nin moleküler seviyede etki mekanizmasının



aydınlatılması için farmakolojik çalışmalar yürütülecektir. En aktif seçilen moleküllerde karragenan ile indüklenmiş pleürisy test ile sıçanlarda bileşiklerin in vivo aktiviteleri de test edilerek in vitro aktif bileşiklerin in vivo aktiviteleri de belirlenecektir. Bir molekülün ilaç adayı olarak değerlendirilmesi için sadece hedeflenen aktivitesinin artması yeterli olmayıp, ayrıca yan etki profilinin iyileştirilmesi çalışmaları da gerekmektedir. Bu bakımdan günümüzde aktif bir molekülün ilaç adayı olarak ön klinik çalışmalara alınmadan önce özellikle kardiyak toksisite için hERG (human *Ether-à-go-go* Related Gene) ve ilaç etkileşimleri için CYP450 enzim inhibisyonu çalışmalarının da yapılması öngörülmektedir. Bu sebeplerle öncü bileşiğin daha ileri geliştirilmesi ve daha potent türevlerin elde edilmesi için gerekli sentez çalışmaları ile yapı ile aktivite arasındaki ilişkinin anlaşılması, aktif türevlerin ilaç etkileşimleri açısından önemli sitokrom P450 (CYP3A4, 2C9, 2D6, 2C19, 1A2) izoformları üzerindeki inhibitör etkileri çalışmalarının tamamlanarak ön klinik çalışmalar öncesi gerekli verilerin belirlenerek ön klinik çalışmalara alınmak üzere ilaç adayı olabilecek bileşiklerin saptanması bu proje kapsamında planlanan faaliyetlerle gerçekleştirilecektir. Proje sonunda ulaşılabilecek aktif ve optimize edilmiş moleküller ileri ön klinik çalışmalar için değerlendirilebilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Astım, Antienflamatuvar, Lökotrien, FLAP, 5-Lipoksijenaz

**Project Title :** xxx

### Project Summary

5-Lipoxygenase (5-LO) catalyzes the early step in the biosynthesis of leukotrienes (LT) from arachidonic acid (AA). The efficient utilization of AA by 5-LO for LT synthesis also requires a helper protein termed "5-LO activating protein (FLAP)". LTs are the mediators of various pathological conditions including inflammation and allergic reactions, and it has recently been demonstrated that 5-LO pathway also associates with atherosclerosis, cancer and osteoporosis. Hence, 5-LO and FLAP have become an important drug target where its inhibition may lead to development of new therapeutic treatments for pathologies that require anti-LT therapy.

With the aim of understanding the structural properties and differences of 5-LO and FLAP active sites, and to develop potent inhibitors for both enzymes, we previously initiated a project and obtained preliminary results which constitutes the basis of this project proposal. In our preliminary work, a series of compounds bearing benzimidazole structure were synthesized and one of the compounds (BRP-7) which showed FLAP inhibitory activity was chosen for further development. Pharmacological studies indicated that BRP-7 resulted in inhibition of LT biosynthesis in human leukocytes with an IC<sub>50</sub> value of 0.31 µM without interfering with purified 5-LO (zileuton, the only commercially available 5-LO inhibitor has the IC<sub>50</sub> of 0.8 µM in the same assay system). One of the characteristics of FLAP inhibitors is that they inhibit the translocation of 5-LO from cytosol to pronuclear region of nuclear membrane and BRP-7 inhibited this translocation starting at 1 µM concentration.

In addition, increasing concentrations of AA impairs the inhibitory potential of FLAP inhibitors and addition of 40 µM AA prevented the inhibitory potential of BRP-7 in human leukocytes. The selectivity of BRP-7 on other enzymes in the AA pathway was also investigated and found that BRP-7 did not result any inhibition on COX-1, COX-2 and mPGES-1 at 10-50 µM. The in vivo activity of BRP-7 was also tested in rats using carrageenan-induced pleürisy test resulting a 33% inhibition of exudate volume, 20% inhibition of inflammatory cells and also 29% inhibition of LTB<sub>4</sub> amount in the pleural exudate. These results indicate that we successfully completed the discovery phase in our studies and chose the BRP-7 as a candidate for further development for preclinical studies.

In this project, we aim to develop more potent derivatives of BRP-7 with improved metabolic and pharmacokinetic properties. Therefore, we plan to carry out synthetic, molecular modelling and pharmacological studies to develop structureactivity relationships for compounds with improved FLAP inhibitory potential. Additional pharmacological studies will also be carried out to elucidate the mechanism of action at the molecular level. The selected active compounds will also be tested in rats using carrageenan-induced pleürisy test. We will also test the selected active compounds for hERG inhibition (human *Ether-à-go-go* Related Gene) as well as for inhibition of certain CYP isoforms (CYP3A4, 2C9, 2D6, 2C19, 1A2) which are important in drug metabolism. Based on the SAR data relating the pharmacological, metabolic and pharmacokinetic studies, the optimized molecules will be evaluated for further preclinical studies.

**Keywords:** Asthma, Anti-inflammatory, Leukotriene, FLAP, 5-Lipoxygenase

## 2. AMAÇ VE HEDEFLER

Projenin amacı ve hedefleri ayrı bölümler halinde kısa ve net cümlelerle ortaya konulmalıdır. Amaç ve hedeflerin belirgin, ölçülebilir, gerçekçi ve proje süresinde ulaşılabilir nitelikte olmasına dikkat edilmelidir.

Bu projede 'self-etching' adezivlerin raf ömürlerini ve böylece diş bağlanma güvenliğini iyileştirmek amacıyla, sözkonusu adezivlerden istenilen özellikleri [ i) mine ve dentini aşındırma; ii) diş dokusu ile bağ yapabilme; iii) su, etanol ve adeziv bileşiminde çözünbilme; iv) yüksek homo- ve kopolimerleşme hızı; v) düşük hacimce büzüşme (amid monomerleri için); vi) yüksek mekanik özellikler (amid monomerleri için); vii) ağız ve hücrede düşük toksisite] sağlayan, ancak hidroliz olabilecek ester grupları içermeyen yeni monomerlerin sentezi ve özelliklerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Dolayısıyla, bu monomerlerin



ticari adezivlerden daha üstün kabul edilmesi beklenmektedir. Yeni monomerlerin sentez yöntemleri ve çeşiti özellikleri bulunmuş olacaktır. Bu sonuçlar bilimsel dergilerde makale olarak yayınlanacaktır.

### 3. KONU, KAPSAM ve LİTERATÜR ÖZETİ

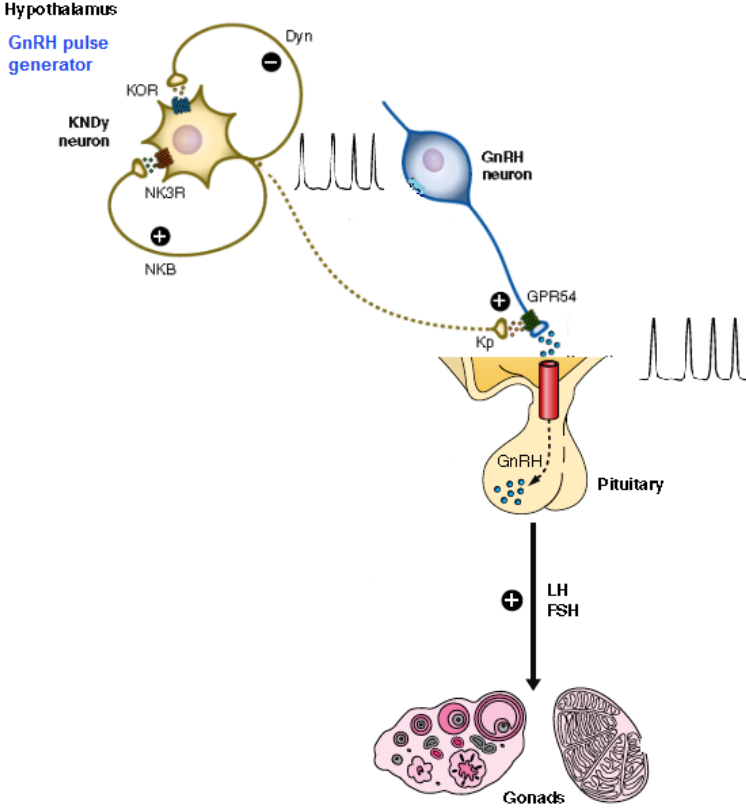
Proje önerisinde ele alınan konunun kapsamı ve sınırları, projenin araştırma sorusu veya problemi açık bir şekilde ortaya konulmalı ve ilgili bilim/teknoloji alan(lar)ındaki literatür taraması ve değerlendirilmesi yapılarak proje konusunun literatürdeki önemi, arka planı, bugün gelinen durum, yaşanan sorunlar, eksiklikler, doldurulması gereken boşluklar vb. hususlar açık ve net bir şekilde ortaya konulmalıdır.

Literatür değerlendirmesi yapılırken ham bir literatür listesi değil, ilgili literatürün özet halinde bir analizi sunulmalıdır. Referanslar <http://www.tubitak.gov.tr/ardeb-kaynakca> sayfasındaki açıklamalara uygun olarak EK-1'de verilmelidir.

İnsanlarda çocukluktan erişkinliğe geçişi sağlayan püberte sürecinin nasıl başladığı bilinmemektedir. Pübertenin başlangıcını belirleyen temel olay hipotalamustaki GNRH nöronlarının pulsatil olarak GNRH salgılamaya başlamasıdır. Günümüzdeki anlayışa göre çocukluk çağı boyunca "GNRH pulse generator" frenlenmiştir. Pübertenin başlamasını belirleyen bu inhibisyonun kalkmasıdır ancak bunun nasıl olduğu bilinmemektedir (Plant et al. 2008, Ojeda et al. 2010).

Hipogonadotropik hipogonadizm (HH) çeşitli nedenlerle gonadotropinlerin salgılanmasındaki bir yetersizlik sonucu, adolesan dönemde ikincil cinsiyet karakterleri ve üreme işlevlerinin gelişmemesini tanımlar (Crowley 2008, Topaloglu ve Kotan 2010). HH sıklıkla hipotalamohipofizer bölgeyi etkileyen yapısal bir lezyon (tümör, infiltrasyon vb.) ya da işlevsel bir bozukluk (aşırı zayıflık, kronik hastalık vb.) sonucu oluşur. IHH tanımı böyle bir yapısal ya da işlevsel bozukluğun olmadığı heterojen bir grubu kapsar. Bu gruptaki olguların yaklaşık yarısında neden Kallmann sendromudur. Bu sendromda olfaktor aksonlar boyunca GnRH nöronlarının embriyonik migrasyonunda da bir bozukluk olduğu için, Kallmann sendromlu olgularda, IHH yanında koku alma işlevi de yoktur (anosmi).

IHH'li olgularda eğer koku alma işlevi normale bu durum normosmik IHH (nIHH) olarak adlandırılır. Mutasyona uğradıklarında insanda nIHH hastalık fenotipine yol açan genlerin püberte mekanizmasında esansiyel rollere sahip oldukları defalarca gösterilmiştir. Bu genler ilk tanımlanışlarına dayalı kronolojik sıraya göre; GNRHR (De Roux et al. 1997), GPR54 [KISS1R] (de Roux et al. 2003, Seminara et al. 2003), GNRH1 (Bouligand et al. 2009)'dir. Kisspeptin reseptörünü kodlayan GPR54 (KISS1R) genindeki inaktive edici mutasyonlara bağlı nIHH az sayıda nIHH olgusunda rapor edilmiştir (De Roux et al. 2003, Seminara et al. 2003). İki önceki projemiz çerçevesinde yaptığımız çalışmalar sonucu Neurokinin B sinyal yolağının insan pübertesindeki rolünü tanımladık. Neurokinin B sinyal yolağında yer alan genler TAC3 ve TACR3 sırasıyla **neurokinin B (NKB)** adlı bir nöropeptidi ve onun reseptörünü (NK3R) kodlamaktadırlar. Bu iki genden biri mutasyona uğradığında hipotalamustaki GnRH salgılayan nöronlardan bu hormonun salgısı yapılamamakta ve nIHH fenotipi oluşmaktadır. Bu bulguların tetiklediği çeşitli hayvan modellerindeki çalışmalar ritmik GNRH sinyal üreticisinin (GnRH pulse generator) intrinsik yapı ve işleyişini açıklamak üzere **KNDy (Kisspeptin, Nörokinin B, Dynorphin)** olarak adlandırılan bir modelin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Lehman et al. 2010). Buna göre hipotalamustaki arcuate (insanda infundibular) nükleustaki KNDy nöronlarında 3 nöropeptit (**Kisspeptin, NKB ve Dynorphin**) birlikte eksprese olmaktadır. Bunlardan NKB stimülatör, Dynorphin (Dyn) ise inhibitör olarak çok kısa zaman aralıklı olarak reseptörleri (sırasıyla NK3R ve KOR) aracılığıyla karşılıklı etkileşmektedir. Bu etkileşimin sonucunda intermittent aksiyon potansiyelleri oluşmaktadır. Her bir aksiyon potansiyeli KNDy nöronlarından bir kisspeptin (Kp) molekülünün intermittent olarak aksonları vasıtası ile median eminense doğru salınması sonucunu doğurmaktadır. Kisspeptin median eminesteki GnRH nöron aksonlarında bulunan reseptörleri [GPR54 (KISS1R)] üzerinden hipotalamo-hipofizer portal dolaşıma doğru intermittent GnRH salgılanmasına yol açmaktadır. Bu da ön hipofizdeki gonadotropilerden pulsatil olarak FSH ve LH salgılanması sonucunu doğurmaktadır (Lehman et al. 2010). Bu mekanizmanın öteden beri soyut bir kavram olarak bilinen "GnRH pulse generator" olduğu düşünülmektedir. KNDy modeline göre "GnRH pulse generator" Fig.1 de hipotalamo-hipofizer-gonadal eksen içinde gösterilmektedir (Pinilla et al. 2012'den modifiye edildi).



Son projemiz çerçevesinde yaptığımız çalışmalar sonucunda, insanda KISS1 genindeki bir mutasyon sonucunda nIHH fenotipinin geliştiği ilk kez ortaya koyuldu.. Böylelikle yeni karakterize edilen “GnRH pulse generator” yapısında görev alan toplam altı genden (TAC3, TACR3, KISS1, KISS1R [GPR54], DYN ve KOR) üçünün (TAC3, TACR3 ve KISS1) insandaki mutasyonları ve bunun klinik sonuçları yüksek etki değerlerine sahip dergilerde (Türkiye adresli olarak) ilk kez yayınlanmış oldu. Yukarıda ayrıntılandırıldığı gibi püberte fizyolojisinde merkezi bir öneme sahip olan “GnRH pulse generator” yapısı somutlaştırılarak karakterize edilmiş oldu.

Ancak “GnRH pulse generator”ın çalışmasının ekstrinsik faktörler tarafından nasıl tetiklendiği şimdi daha önemli bir soru olarak karşımızda durmaktadır. Yaygın görüşe göre püberte aktivitesi çok sayıda genin ortaklaşa bir faaliyetiyle yönetilmektedir. Bu sistemin ortaya çıkarılmayı bekleyen daha çok sayıda ögesi bulunmaktadır. Dolayısıyla bu yeni projemiz çerçevesinde yapacağımız çalışmalar sonucunda “GnRH pulse generator”ın çalışmasını tetikleyen ekstrinsik mekanizmayı da karakterize etmiş olmayı umuyoruz. Halihazırda tanımlanmış mutasyonlar tüm nIHH olgularının ancak bir bölümünü açıklamaktadır (Crowley et al. 2008, Gurbuz et al. 2012). Dolayısıyla bozukluğunda IHH'e yol açan henüz tanımlanmamış gen veya genlerin varlığı güçlü bir olasılık olarak kabul edilmektedir (Topaloglu ve Kotan 2010). Şu anda püberteyle ilgili bilinen iki sinyal sisteminin de (Kisspeptin ve Neurokinin B) keşfinde otozigosite haritalaması (autozygosity mapping) yaklaşımının kullanılmış olması önerdiğimiz yöntemin verimliliğinin güçlü bir kanıtıdır.

Püberte sürecinin başlamaması sonucunu doğuran monogenik bir hastalığın arandığı bu çalışmada bulunacak hastalığın kalıtım şeklinin büyük bir olasılıkla otozomal resesif olacağı varsayılmaktadır. Bilindiği gibi, ender görülen ve otozomal resesif olarak kalıtılan hastalıklar, akraba evliliklerinden doğan bireylerde genel toplum ortalamasına göre çok daha yüksek bir sıklıkla görülmektedir. Batı toplumlarında %1'den az olan akraba evlilikleri oranı ülkemizde %20-25 gibi çok yüksek oranlardadır (Tuncbilek ve Koc 1994). Doğu Akdeniz bölgesindeki bir çalışmada bu oran %30.6 olarak bulunmuştur (Donbak 2004). Bu da %0.0153 ortalama inbreeding katsayısına denk düşmektedir. SNP genotipleme ve yüksek dansiteli genomik haritalardaki gelişmelerin olanaklı kıldığı etkili gen haritalama stratejilerinden en önemlisi Otozigosite Haritalaması'dır (Lander ve Botstein 1987). Bu kavrama göre, akraba evliliklerinden doğan kişilerde görülen otozomal resesif hastalıklarda, anne ve babadan kalıtılan her iki mutant allelin de kökeni tek bir ortak atadır (otozigosite). Bu kavrama göre; hasta kişi yalnızca hastalık geni için değil onun birkaç centimorgan komşuluğundaki SNP'ler gibi polimorfik belirleyiciler açısından da homozigottur (otozigot bölge).

Son yıllarda genomik tekniklerde çok önemli gelişmeler olmuştur. Bunlardan en önde geleni bu projede kullanımı önerilen sekans analizi tekniğidir. “Gelecek nesil sekans analizi” adı verilen bu teknikte çok büyük miktardaki DNA aynı anda paralel olarak sekanslanabilmekte, çok kısa zamanda yüksek güvenilirlikte DNA sekans sonuçları elde edilebilmektedir. Bu projede özel bir “gelecek nesil sekans analizi” tekniği olan “eksom sekanslaması” (exome sequencing) kullanılacaktır (Okou et al. 2007). Hizmet alımı şeklinde yaptırmayı düşündüğümüz bu yöntem bir bireyin genomundaki bütün kodlayan bölgelerin sekansını ortaya koymaktadır. (<http://www.nimblegen.com/products/seqcap/ez/v3/index.html>) Böylelikle olası bölgedeki genleri işlev ve ekspresyon karakterlerine göre öncelleyerek incelemeye dayalı geleneksel yöntemlere göre bu yeni yaklaşım objektif ve önkabulsuz sekans verisi elde etmeyi sağlamaktadır. Bu çok önemlidir, zira, örneğin 2003 yılında pübertedeki rolü keşfedilen Kisspeptin o döneme kadar yalnızca bir kanser metastaz inhibitörü olarak biliniyordu ve GnRH ile ilişkisine dair hiçbir bilgi yoktu. Bu çalışmayla bulunacak olan yeni genlerin de püberte süreciyle ilişkisiz görünmeleri tümüyle mümkündür. Bu yöntem ile bizim projemizde



olduğu gibi otozomal resesif kalıtılan hastalık genlerinin kolay bir şekilde bulunabileceği ifade edilmiştir (Ng et al 2009, Bamshad et al. 2011). Bununla uyumlu olarak insan nIHH olgularında ilk kez KISS1 mutasyonunu gösteren çalışmamızda eksom sekanslaması, sorumlu mutasyonu bağımsız olarak ortaya çıkarmıştır (Topaloglu et al. 2012). Eksom sekanslaması kullanılarak son 2-3 yılda otozomal resesif kalıtıma sahip onlarca hastalığın genetik temeli ortaya konmuştur (Ng et al. 2009, Reversade et al. 2009, Bamshad et al. 2011). Eksom sekanslamasının maliyetinde ucuzlamayla birlikte aynı ailede iki veya daha fazla kişinin (hasta-hasta veya hasta-anne gibi) test edilmesiyle sorumlu genin bulunması daha da kolaylaştırabilir (Bamshad et al. 2011).

Eksom sekanslaması sonucu bir insanda ortalama olarak 20-24 bin varyantın saptandığı gözlenmiştir. Bunların %95'inden fazlası bilinen zararsız SNP'lerdir. Otozigosite haritalaması modeline göre hastalıktan sorumlu alel homozigot olarak bulunmalıdır. Yeni geliştirilen bir yöntemle bilinen SNP'ler ve heterozigot mutasyonlar online olarak süzulebilmektedir (Chang et al. 2012). Yine otozigosite haritalaması modeline göre mutasyon otozigot bölgede bulunmalıdır. Buna yönelik olarak Carr et al. tarafından geliştirilen bir biyoinformatik yöntemle (Agile Variant Mapper) genom boyu SNP mikroarray genotiplemesine gereksinim kalmaksızın otozigot bölgeler saptanabilmektedir (Carr et al. 2012). Zira, yukarıda belirtildiği gibi eksom sekanslaması SNP'ler dahil genomdaki bütün varyantları ortaya koymaktadır. Bu sürecin sonunda bulunan mutasyonlar PCR ile amplifikasyonu takiben direkt otomatik DNA sekans analizi yöntemi ile teyit edilecektir. Bulunan mutasyonun otozomal resesif kalıtım ilkelerine göre aile içerisinde fenotiple birlikte doğru ayrışma göstermesi ve kontrol popülasyonunda bulunmaması başarılı sonucu doğrulayacaktır.

Bu çerçevede yeni saptanmış olan mutant genlerin puberteyi başlatan mekanizmadaki yerlerini ve rollerini aydınlatılabilir en önemli meydan okuma olarak öngörülmektedir. Buna yönelik olarak yeni belirlenen mutant genler laboratuvarımızda LbetaT2 (hipofizer) ve GT1-7 (hipotalamik) hücre dizilerinde çeşitli moleküler hücre biyolojisi teknikleri kullanılarak incelenecektir. Bilimsel çalışmalarda en yoğun şekilde kullanılan bu iki hücre dizisi pubertenin merkezi kontrolünde en yüksek öneme sahip iki dokuyu temsil etmekte fare hipotalamik hücreleri (GT1-7) ve fare hipofizer gonodotroplarından (LbetaT2) geliştirilmiştir (Liposits et al. 1991, Thomas et al. 1996). Bu hücre dizilerinin sahibi Kaliforniya Üniversitesi'nden Prof. Dr. Pamela Mellon, bu hücre dizilerini projemiz için ücretsiz olarak sağlama sözü vermiştir. Bu hücre dizilerinde ilk olarak yeni saptanmış genin ekspresyonu real-time PCR yöntemiyle mRNA düzeyinde, western blot yöntemi ile de protein düzeyinde değerlendirilecektir. Ayrıca yeni gen immünohistokimya yöntemi ile organel/subselüler düzeyde incelenecektir. Yeni saptanmış genin ekspresyonunun veya fiziksel konumunun bilinen sitimülatör (örneğin; LbetaT2 hücre dizisinde GnRH ile GnRH reseptörünün uyarılması LHB geninin ekspresyonunu artırır) veya inhibitörlerle (örneğin; GT1-7 hücre dizisinde estrojen reseptörünün östrojen ile uyarılması KISS1 geninin ekspresyonunu baskılar) değişip değişmediği, bu genin siRNA yöntemi ile yaklaşık olarak %80 oranında susturulmasının (mRNA ve protein düzeyinin azaltılmasının) puberte ile ilgili bilinen proteinleri (GnRH, LHBeta, kisspeptin, Neurokinin B vb.) ne yönde etkilediği izlenecektir. Bu gözlemlerden yola çıkarak yeni saptanmış genin puberte sürecindeki yeri ve işlevi konusunda fikir edinilecek gerekirse daha ileri araştırmalar (örneğin; knock-out fare modeli oluşturma) için bir sonraki proje planlanabilecektir.

Bu projedeki çalışmalar sonucunda bulduğumuz mutasyonların fonksiyonel analizleri ve mutant genlerin puberte mekanizmasındaki yer ve işlevlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar kendi laboratuvarımızda yapılacaktır. Önemli derecede kendi laboratuvarımızda, Fakültemizdeki diğer laboratuvarlarda ve Üniversitemizin ortak kullanımlı Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde mevcut olan altyapı kullanılarak bunun mümkün olabileceğini düşünmekteyiz. Proje yürütücüsü bir yıla yakın bir süreyle ABD Oregon National Primate Research Centre'da Profesör Ojeda'nın laboratuvarında konuk bilim insanı sıfatıyla bilimsel araştırmalarda bulunmuştur. Bu projede sözü edilen deneylerin tamamı konusunda deneyim kazanmıştır. Ek olarak, bu projede yürütülmesi öngörülen deneyler konusunda aşağıdaki uygulamalı eğitimleri almıştır: EMBO Kursu: "Advanced techniques in Molecular Medicine" Uppsala University, İsveç ve TÜBİTAK MAM Kursu: "İleri moleküler hücre biyolojisi teknikleri". Ayrıca çalışma ekibimizin önemli bir elemanı olan doktora öğrencisi, Cambridge Üniversitesi, Metabolik Bilimler Enstitüsü'nde çeşitli moleküler hücre biyolojisi teknikleri (site-directed mutagenesis, RT-PCR, Western blotting, hücre dizileri yönetimi) ve Sanger Enstitüsü'nde eksom verisinin analizi konularında 3 ay süreyle uygulamalı eğitim almıştır. Fonksiyonel analizler ve moleküler hücre biyolojisi çalışmaları konusunda gerektiğinde yurtiçi ve yurtdışı işbirliği aranacak, zorunlu durumlarda yurtiçi veya yurtdışı hizmet alınmasına gidilecektir.

Sonuç olarak, bu yeni yaklaşım ve olanaklarla insanda puberte sürecini başlamasını tetikleyen faktörleri aydınlatma konusunda bu proje sayesinde başarılı olacağımızı umut ediyoruz.

#### 4. ÖZGÜN DEĞER

Proje önerisinin, özgün değeri (bilimsel kalitesi, farklılığı ve yeniliği, hangi eksikliği nasıl gidereceği veya hangi soruna nasıl bir çözüm geliştireceği ve/veya ilgili bilim/teknoloji alan(lar)ına metodolojik/kavramsal/kuramsal olarak ne gibi özgün katkılarda bulunacağı vb.) ayrıntılı olarak açıklanmalıdır.

DNA aptamerleri, kokain gibi küçük moleküllerden (Liu J. ve ark., 2006) trombin (Pavlov V. ve ark. 2005) gibi proteinlere ve bakteri (Qin L. ve ark. 2009 ve Chen F. ve ark. 2007) gibi canlı organizmalara kadar geniş bir yelpazedeki hedefleri tanımadaki kullanılmaktadırlar (Li T. ve ark., 2007). Hatta, kuramsal olarak, aptamer kütüphaneleri kullanılarak, hemen her molekülü tanımlayabilecek aptamerlerin seçilmesi olasılık dahilindedir (Feigon J. ve ark., 1996, Uphoff K.W., ve ark., 1996, Tombelli S. ve ark., 2007). Bu özellikleri nedeniyle, günümüzde, belirli hedeflere özgü aptamer seçimi ve seçilmiş bu aptamerlerle oluşturulmuş biyosensörlerin geliştirilmesi bir ilgi uyandırmaktadır. Sadece özgün, duyarlı tanıma özellikleri değil aynı zamanda dayanıklı yapıları, kolayca üretilibilmeleri-özellikle de antikorlar gibi üretilmeleri için canlıya gereksinim duyulmaması- ve rahatlıkla değiştirilebilmeleri (biyotin veya tiyol gruplarının eklenmesi veya farklı floresan özellikli kimyasalların takılması gibi) aptamerleri, biyosensörler için vazgeçilmez hale getirmektedir (Chen F. ve ark. 2007). Aptamerler yeni bir alandır ve *M.tuberculosis*' i tanıyabilecek şekilde bazı aptamer molekülleri seçilmiştir (Qin L. ve ark. 2009, Chen F. ve ark. 2007). Yapılan bu çalışmaların birinde (Chen F. ve ark. 2007) *M.tuberculosis* bakterisinin kendisi kullanılarak aptamer seçimi yapılmış ve bu aptamerlerin



bakterinin etkinliğini azalttığı ve böylece denenen hayvanların ömürlerini uzattığı görülmüştür. Geliştirilen bu strateji, karmaşık protein kompozisyonuna sahip *M.tuberculosis* için yeni ve farklı aptamerlerin de seçilebileceğini göstermesi bakımından öncü olmuştur. Bu çalışmada geliştirilen aptamerin dizilimi gizli tutulduğundan bir sonraki basamakta üretilmesi planlanan tanı kitine kullanılması mümkün olmayacaktır.

Bu projede, tanı amaçlı olarak kullanılmak üzere, bütün bir bakteri hücrelerini ve farklı tasarımı özgün bir aptamer kütüphanesini kullanarak seçilecek algılayıcı moleküller, ülkemize kazandırılacak yeni bir buluş hakkı anlamına gelmekte ve bu da çalışmanın özgünlüğü olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca, ileride, tasarlanacak bir biyosensörde, seçilmiş bu aptamerlerin –başka bir ülkeye buluş hakkı bedeli ödemek zorunda kalmadan- kullanılabilme olanağının elde edilebilecek olması da son derece önem taşımaktadır.

*M.tuberculosis* ile ilgili gerçekleştirilen bir diğer çalışmada (Qin L. ve ark. 2009) *M.tuberculosis*' e özgü olan MPT64 proteinine karşı aptamerler seçilmiş ve bununla ilgili buluş hakkı alınmıştır. Bu protein, bakteri tarafından, dışarıya salgılanmakta ve dolayısıyla çalışmada da kültür ortamına salınan protein molekülü hedef olarak seçilmektedir. Yayında da vurgulandığı gibi, *M.tuberculosis* dışındaki bazı mikobakteri türlerinden de (*M.aurum*, *M.neoaurum*, *M.gilvum*) MPT64 proteinin görevdeşi (analog) salgılanmakta ve bunun sonucu olarak da yanlış (+) sonuçlar alınabilmektedir. Bu nedenle, *M.tuberculosis*' e özgü ve fakat salgılanmayıp bakteri yüzeyinde sergilenen özgün proteinlere karşı (ESAT6, CFP-10 gibi) yapılacak aptamer seçiminin, yanlış (+) oranını azaltabileceği yönündeki düşüncemizin de yayınlanan bu çalışmadan farklı olduğunu ve bu haliyle özgün olduğunu söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, aptamerlere dayalı biyosensörlerde ilk ve en önemli aşamayı, belirli bir hedefe özgü ve yüksek duyarlılığa sahip aptamerlerin seçilmesi oluşturduğundan ve kullanılacak aptamer kütüphanesi tarafımızca tasarlanacağından bu aptamerler özgün olacaktır. Dolayısıyla seçilecek bu aptamer için buluş hakkı (patent) alınması da olanaklı olabilecektir.

## 5. YÖNTEM

Projede uygulanacak yöntem ve araştırma teknikleri (veri toplama araçları ve analiz yöntemleri dahil) ilgili literatüre atıf yapılarak (gerekirse ön çalışma yapılarak) belirgin ve tutarlı bir şekilde ayrıntılı olarak açıklanmalı ve bu yöntem ve tekniklerin projede öngörülen amaç ve hedeflere ulaşmaya elverişli olduğu ortaya konulmalıdır.

Projede uygulanacak yöntem(ler)le ilerleme kaydedilememesi durumunda devreye sokulacak alternatif yöntem(ler) de belirlenerek açık bir şekilde ifade edilmelidir.

### 1) Temel Yöntemler

#### 1.1) Hücre Kültürü ve Transfekte Klon Seçimi

Çalışmada, kalıcı olarak sıçan P2X7 reseptörü transfekte edilen HEK hücreleri (HEK-rP2X7), fare P2X7 reseptörü transfekte edilen HEK hücreleri (HEK-mP2X7) ve endojen olarak fare P2X7 reseptörü taşıyan RAW 264.7 hücreleri kullanılacaktır. Daha önceki yayınımda gösterdiğimiz gibi RAW 264.7 hücreleri fare P2X7 reseptörü taşımakta ve pozitif ve negatif yüklü moleküllere geçirgenken, sıçan P2X7 reseptörü taşıyan HEK hücreleri (HEK-rP2X7) sadece pozitif yüklü moleküllere geçirgendir. Bu noktada akla, geçirgenliğin seçiciliğinde reseptör veya hücre tipi farkından hangisinin etkili olduğu sorusu gelmektedir. Fare P2X7 reseptörünün HEK hücrelerinde transfekte edilmesiyle elde edilecek hücrelerde (HEK-mP2X7) RAW 264.7 'nin benzeri bir davranış görülmesi geçirgenliğin seçiciliğinde reseptör tipinin belirleyici olduğunu düşündürürken, sıçan P2X7 reseptörü taşıyan HEK hücrelerine (HEK-rP2X7) benzer seçicilik göstermesi hücre tipinin belirleyici olduğunu, reseptörün geçirgenlik aktive etmek için yeterli olmadığını, bulunduğu hücrede yardımcı protein veya proteinlere (taşıyıcı vb) ihtiyaç duyduğunu düşündüreceklerdir. Grubumuz önceki çalışmalarında RAW 264.7 hücrelerinde sadece pozitif yüklü moleküllere geçirgen bir alt popülasyon gözlemlemiştik. Dolayısıyla P2X7 reseptörünün geçirgenlik aktivasyonunda yardımcı bazı proteinler kullanıyor olabileceği, bu proteinin olmadığı hücrelerde reseptörün bir tip geçirgenliği aktive edemediği düşüncesi temelsiz değildir. Hatırlanacağı üzere taşıyıcı bazı proteinlerin bu geçirgenlik aktivasyonundaki rolünün araştırılması projenin amaçları arasındadır. Sözkonusu iki hücre tipi de literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır. HEK hücreleri endojen olarak P2X7 reseptörü bulundurmaması, yüksek transfeksiyon verimi ve kullanım kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılmakta olduğundan grubumuz tarafından tercih edilmektedir. RAW 264.7 hücreleri ise makrofaj (fare) kökenli bir hücre serisi olması nedeniyle P2X7 reseptörünü ifade etmesiyle bilinmektedir.

Sıçan P2X7 reseptörü önceki çalışmalarımız için HEK hücrelerine genetin direnç geni taşıyan plazmid içinde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) kullanılarak, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda transfekte edilmiş ve genetin (G418, ROCHE) içeren DMEM'de büyütülmek suretiyle klonlar elde edilmiştir. P2X7 reseptörünün kendisi seçici olmayan bir katyon kanalı olması ve desensitize olmaması dolayısıyla, hücre içi Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunun kalıcı artışı bu reseptörün ifade miktarını yansıtmaktadır. Ca<sup>2+</sup> bağlayan ve floresan bir boya olan Fura 2 AM (Invitrogen) ile oda sıcaklığında 45-50 dakika bekletilerek Fura 2 yüklü hücrelerin dış ortamı Fura-2'den yıkandıktan sonra 1 mM ATP (Sigma) uygulanmıştır. Spektroflorimetre veya foton çoğaltıcı (PMT) kullanılarak Fura-2'nin Ca<sup>2+</sup> bağlı formu 340 nm, serbest formu 380 nm ışıkla uyarılıp, 510 nm'de emisyon alınmıştır. 340 nm uyarılmaya karşı alınan emisyon ışık şiddetinin, 380 nm uyarılmaya karşılık ışık şiddetine oranı hücre içi Ca<sup>2+</sup> konsantrasyon artışını ifade etmektedir. Uzun ve kalıcı hücre içi Ca<sup>2+</sup> artışı gösteren klon deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir. Açıklanan yöntemle elde edilen klonların hücre içi Ca<sup>2+</sup> artışı ölçümleri, bu reseptörü taşımayan HEK-293 hücreleriyle aynı gün ve aynı deney ortamında yapılmıştır. Sıçan P2X7 reseptörü taşımayan HEK-293 hücreleri ATP (1 mM) uygulamasına geçici bir hücre içi

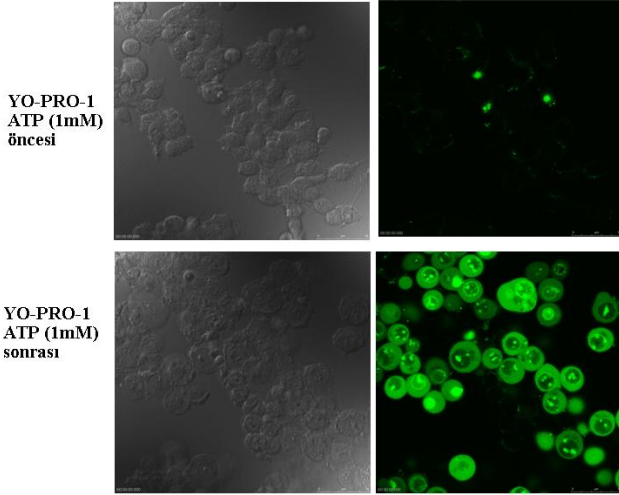
Ca<sup>2+</sup> artışı şeklinde yanıt vermektedir. Bu bakımdan negatif kontrol olarak kullanılmışlardır. Yukarıda ayrıntıları açıklanan yöntem fare P2X7 reseptörü transfeksiyonu, klon elde edilmesi ve reseptörü en yüksek miktarda ifade eden klonun seçilmesinde kullanılacaktır. Ca<sup>2+</sup> artışına dayalı bu seçim hızlı bir ön tarama olarak rol oynamaktadır. Deneylerde kullandığımız klonun P2X7 taşıdığı, ATP uygulanmasından sonra normalde hücre membranından geçemeyen Yopro-1'in hücre içine girişinin floresan mikroskopisiyle gözlenmesiyle doğrulanacaktır. P2X7 reseptörü taşımayan HEK-293 hücreleri ATP varlığında büyük moleküllere geçirgen hale gelmediğinden negatif kontrol olarak kullanılacaktır. HEK-293 hücrelerinde ATP uygulamasına bağlı olarak görülmeyen kalıcı hücre içi Ca<sup>2+</sup> artışı ve floresan boya girişinin, transfekte klonda açıkça gözlemlenmesi pozitif kontrole ihtiyaç duymamaktadır.

HEK-rP2X7 ve HEK-mP2X7 hücreleri %10 fetal calf serum (FCS, GIBCO) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO) solüsyonu içinde 37°C'de, pH dengesinin korunması için %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür flakları içinde büyütülecektir. RAW 264.7 hücreleri ise aynı fiziksel koşullar altında %10 fetal calf serum (FCS, GIBCO) içeren RPMI 1640 (Biological Industries) solüsyonu içinde büyütülecektir. HEK ve RAW 264.7 hücreleri %70-80 konfluense ulaştıklarında PBS (phosphate buffered saline)-EDTA (1 mM) ile 5 dakika 37° C' de bekletilmek suretiyle (HEK) veya kürek ile flask tabanından kazınarak (RAW 264.7) kaldırılacak, 2,4 cm çaplı cam lamellere veya 96 kuyuluk plastik plakalara ekilip, 2-4 gün sonra deney alınacaktır.

## 1.2) Floresan Boya Girişi Ölçümleri

Çalışmanın geçirgenlik ölçümü kısmında pozitif yüklü floresan boya (YO-PRO-1) ve negatif yüklü floresan boya (Lucifer Yellow) girişi ölçülecektir. Bu amaçla spektrofotometre ve konfokal mikroskop kullanılacaktır.

YOPRO-1 kendiliğinden floresan olmayan, DNA'ya bağlandığında floresans veren bir boyadır. 96 kuyuluk plakalara ekilmiş olan HEK-rP2X7, HEK-mP2X7 ve RAW 264.7 hücreleri deneyden önce banyo solüsyonu (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM Ca<sup>2+</sup>, pH:7,4 ) ile iki defa yıkandıktan sonra YO-PRO-1(5 veya 2,5 µM) içeren KCl solüsyonuna (5 mM NaCl, 150 mM KCl, 10 mM HEPES pH:7,8 ) alınacaktır. Amaca yönelik olarak ajan uygulaması yapıldıktan sonra (inhibitör varlığında agonist uygulanması vb) spektrofotometrede (EnVision) uygun dalgaboyunda aydınlatılıp yine uygun dalgaboyunda emisyon ölçülecektir. Zaman boyunca bu işlemin tekrarlanacak ve boyanın hücre içine girişi zamansal olarak incelenecektir. YO-PRO-1 hücre içinde DNA'ya bağlandığında floresans veren bir boya olduğu için ölçülen emisyon şiddeti boya girişini dolayısıyla da hücrenin bu boyaya geçirgenliğini yansıtmaktadır. Hem hücrelerin cam lamel tabanından kalkmaları ve ölçümde zorluk çıkarmaları hem de konfokal mikroskopunun şart olmaması dolayısıyla YO-PRO-1 girişi ölçümleri spektrofotometrede yapılmakla beraber, önceki çalışmalarımızda bu ölçümler konfokal mikroskopunda da tekrarlanmış ve bu iki farklı yöntemle aynı gözlemler elde edilmiştir. Bu projede YO-PRO-1 girişi spektrofotometrenin yanında imkanlar dahilinde konfokal mikroskopunda da tekrarlanacaktır. YO-PRO-1 varlığında RAW 264.7 hücrelerinin ATP uygulamasından önceki ve sonraki durumlarının konfokal mikroskopuyla elde edilmiş örnek görüntüleri, yöntemle ilgili fikir vermesi açısından şekil-1'de görülmektedir. Deneyler 37°C'de yapılacaktır.

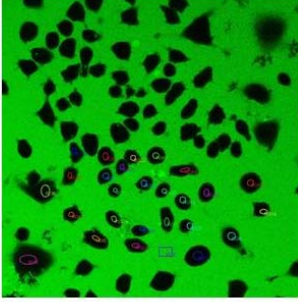


Şekil-1:RAW 264.7 hücrelerinde ATP uygulamasıyla oluşan YO-PRO-1 girişinin konfokal mikroskopunda görüntülenmesi. YO-PRO-1 hücre içinde DNA'ya bağlandığında floresans veren bir boya olduğundan hücre dışından, boya hücre içine girip DNA'ya bağlanmadığı zaman floresans gelmemektedir. Sol üst köşe: ATP uygulamasından önce hücrelerin ışık görüntüsü, sağ üst köşe ise aynı durumda floresan görüntüsüdür. Sol alt köşe: ATP uygulamasından sonra hücrelerin ışık görüntüsü, sağ alt köşe: ATP uygulamasından sonra hücrelerin floresan görüntüsüdür. Basit floresan mikroskopunun aksine, konfokal mikroskopuyla örnekten optik kesitler alınabilmekte ve hücre içi ile dışı bu şekilde ayrı görüntülenebilmektedir. Sağ alt köşede hücrelerden kesit görülmekte ve YO-PRO-1'in hücre içine girdiği gözlemlenebilmektedir.

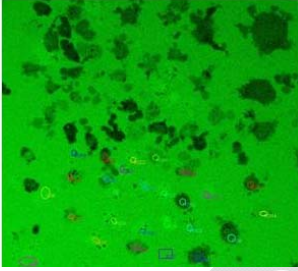
Lucifer Yellow negatif yüküdür ve hücre içinde de dışında da floresan bir boyadır. Bu özelliği nedeniyle hücre içine girişi, sıradan floresan mikroskoplar veya spektrofotometrelerle gözlenememektedir. Hücre içi ile dışını ayıran bir görüntü sistemine bu kısımda ihtiyaç duyulmaktadır. Konfokal mikroskopu bu nedenle uygun bir gözlem ve ölçüm sistemidir. Konfokal mikroskopunun çalışma

prensibi kısaca şöyledir: lazerle elde edilen tek bir dalgaboyundaki ışık hücrede belli derinliklere odaklanarak floresan boyayı uyarmaktadır. Emisyon ışığı bir "pinhole"dan geçirilmek suretiyle süzülüşünden hücrede belli bir kesitten ışık toplanmaktadır. Hücrenin farklı derinliklerine ışığın odaklanabilmesi ve odak dışından gelen ışığın "pinhole" dan geçerek süzülmesi, hücreden optik kesitler alınabilmesi anlamına gelmektedir ve hücre içi ile dışını ayırabilme imkanı sunmaktadır. Bu işlemin zaman boyunca yapılması, hücre dışından hücre içine girişlerin zaman boyunca değişimini gözlemlenmesi anlamına gelmektedir. Çalışmanın bu kısmında, cam lamellerde büyütülmüş hücelere yukarıda ayrıntıları anlatılan protokol uygulandıktan sonra bu hücreler konfokal mikroskoba (Leica) alınacak ve Lucifer Yellow'un uyarılabildiği dalgaboyundaki lazer ile (458 nm) aydınlatılan hücrelerde belirlenen bir derinlikte, x-y düzleminde tarama yapılacaktır. Emitte edilen ışık bir "pinhole"dan geçirilerek yalnız taramanın yapıldığı odak düzleminde ışık toplanması sağlanacaktır. Bu yolla dar bir konfokal kesite ait bir görüntü oluşturulacaktır. Zaman içinde sabit aralıklarla bu işlem tekrar edilecek ve bu şekilde zamanla hücreye giren Lucifer Yellow'un oluşturduğu floresans artışı gerçek zamanlı olarak izlenecek ve ölçülecektir. Elde edilen bu optik kesit görüntüleri değerlendirilirken, hücrelerin sitoplazmalarını içine alacak şekilde ROI (Region Of Interest) 'ler çizilecek ve bu ROI'lerin içinden gelen ortalama floresans, hücre dışına çizilmiş ROI'lerin içinden gelen ortalama floresansa oranlanacaktır. Konfokal mikroskop kullanılarak elde edilen hücre görüntüleri ve bunlardan yapılan değerlendirme işlemine bir örnek şekil-2 ve şekil-3' te görülmektedir.

Lucifer Yellow  
ATP (1mM)  
öncesi

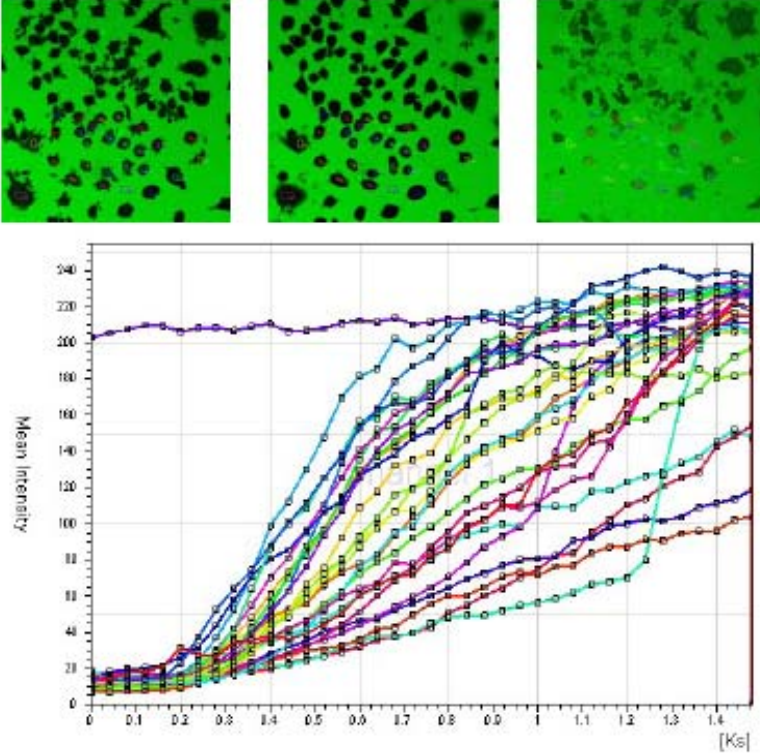


Lucifer Yellow  
ATP (1mM)  
sonrası



Şekil-2: RAW 264.7 hücrelerinde ATP uygulamasıyla oluşan Lucifer girişinin konfokal mikroskobunda görüntülenmesi. üst : ATP uygulamasından önce hücrelerin floresan görüntüsüdür. alt: ATP uygulamasından sonra hücrelerin floresan görüntüsüdür. Konfokal mikroskobunun bir avantajı olarak hücre içi ve dışı ortam ayrılabilir. Üst köşede hücelere henüz Lucifer Yellow girişi olmamıştır, bu nedenle hücre dışından floresans gelirken hücre içi boş görünmektedir. Alt köşede ise hücelere Lucifer Yellow girişi olduğu için hücre içinden gelen floresans hücre dışına yaklaşmaktadır.





Şekil-3: üst sol: ATP (1mM) uygulaması öncesi, üst orta: ATP (1mM) uygulamasından 6 dakika sonra ve üst sağ: ATP (1mM) uygulamasından 20 dakika sonra hücrelerin görünüşleri. Alt: Konfokal mikroskopuyla elde edilen ve ATP uygulamasına bağlı olarak görülen Lucifer Yellow giriş ölçümü örneği. Konfokal mikroskopuyla negatif yüklü boyaların hücre içine girişleri ölçülürken her bir hücreyi içine alacak şekilde ROI'ler ve hücre dışı ortamda "background" ROI'si çizilmiş ve bu ROI'lerden gelen sinyal zamanla izlenmiştir. Hücre dışına çizilen ROI'den gelen sinyal şekilde yatay ve stabil olarak görülürken, farklı hücrelere çizilen ROI'lerden gelen sinyal zamanla artmakta yani Lucifer Yellow ATP uygulamasına bağlı olarak hücre içine zamanla girmektedir. Şekilde her bir nokta bir ölçüm zamanını göstermektedir ve ATP (1 mM) 5. zaman noktasında uygulanmıştır.

## 2) Özel Amaçlı Deneyler

### 2.1) Agonist Potens Sıralaması Deneyleri

Çalışmanın bu kısmında ATP, ADP ve BzATP agonistleri uygulanarak floresan boya girişi incelenecektir. Bu agonistler P2X7 reseptörünü farklı potenslerle uyarmaktadırlar. P2X7 için potens sıralaması BzATP – ATP – ADP şeklindedir. Birden fazla geçirgenliğin gözlemlenmesi akla, agonist potensinin geçirgenlikler arasında da farklılık gösterip göstermeyeceği sorusu gelmektedir. Eğer P2X7 reseptörü birbirinden farklı geçirgenlik yollarına kenetli ise bu yolları aktive etmek için gerekli olan agonist konsantrasyonları arasında fark bulunma olasılığı vardır. Böyle bir durumun ortaya konabilmesi için agonist konsantrasyon yanıt eğrilerinin elde edilmesi gerekmektedir. Agonist potens sıralaması deneyleri bu amaca yönelik olarak farklı yükte floresan moleküllerle (YO-PRO-1 ve Lucifer Yellow) ve farklı agonistlerle yapılacaktır.

### 2.1) Fare ve Sıçan P2X7 Reseptörü Karşılaştırılması

Fare P2X7 geni taşıyan plazmid ile transfekte edilmiş HEK hücreleri uygun antibiyotikte 1 hafta kadar bekletilecektir. Elde edilen klonlardan en yüksek ve kalıcı hücre içi Ca<sup>2+</sup> artışı göstereni reseptörün ekspresyonunun bir ölçüsü kabul edilip devam edecek deneylerde kullanılacaktır. Fare P2X7 reseptörü taşıyan HEK hücreleri ve RAW 264.7 hücreleri lamellere ekildikten 2-4 gün sonra, mediumları çekilecek, pozitif yüklü floresan molekül olan YOPRO-1 veya negatif yüklü molekül olan Lucifer Yellow içeren solüsyona alınacaktır. Konfokal mikroskobu altında birkaç dakika bazal giriş tespit edildikten sonra aynı solüsyona ATP uygulanacak ve oluşan floresans artışı ölçülecektir. Her iki tip hücrede gözlenen geçirgenliğin karakteri karşılaştırılarak yorumlanacaktır. Fare ve sıçan P2X7 reseptörü literatürde yaygın olarak kullanılmakta ve bütün yanıt özelliklerinin aynı olduğu düşünülmekte ve birbirleri yerine kullanılmaktadır. Biz de sıçan P2X7 reseptörü transfekte edilen HEK hücreleri (HEK-rP2X7) ve endojen olarak fare P2X7 reseptörü taşıyan RAW 264.7 hücrelerini birbiriyle karşılaştırarak elde ettiğimiz sonuçları "Molecular Pharmacology" dergisinde yayınlamayı başardık. Ancak düşük de olsa bir artefakt olasılığını ortadan kaldırmak için bu projede RAW 264.7 hücreleri ile birlikte fare P2X7'si transfekte edilmiş HEK hücrelerini kullanacağız. Daha önce sıçan P2X7'si ile elde ettiğimiz verilerin bu sistemde de geçerli olduğu karşılaştırma deneyler ile test edilecektir.

### 2.2) Gedik-Kavşak ve Taşıyıcıların Rolünün İncelenmesi

Lamellerde büyütülen HEK-rP2X7 ve RAW 264.7 hücrelerinin mediumları çekilerek YOPRO-1 veya Lucifer Yellow içeren



solüsyona alınacaktır. YOPRO-1 ve Lucifer Yellow içeren solüsyona alınan hücreler de iki gruba ayrılarak, inhibitörlü veya inhibitörsüz olarak inkübe edilecektir. Konfokal mikroskobu altında birkaç dakika bazal giriş tespit edildikten sonra aynı solüsyona ATP uygulanacak ve oluşan floresans artışı ölçülecektir. Her tip hücre ve floresan boya için inhibitörlü ve inhibitörsüz durumda elde edilecek floresans artışları karşılaştırılacaktır. Bu şekilde farklı büyük molekül giriş yolları birbirinden ayrılmaya çalışılacaktır.

Kullanılacak inhibitörler ve konsantrasyonları literatürden seçilecektir. Büyük moleküllerin geçmesi mümkün olan kanal ve taşıyıcıların inhibitörleri büyük bir seçicilik göstermemektedir. Bu nedenle ancak bir inhibitör paneli kullanılarak elde edilen sonuçlardan proteinin doğası hakkında bir çıkarsama yapılabilmektedir. Kullanmayı planladığımız inhibitörler şunlardır: Karbenoksolon; Probenesid; NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid); DIDS (disodium 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate); IAA-94 (indanyloxyacetic acid 94); FFA (flufenamic acid); NFA (niflumic acid); 9-AC (anthracene-9-carboxylic acid); MFQ (mefloquine); DPC (diphenylamine-2-carboxylate); SITS, disodium 4-acetamido-4'-isothiocyanato-stilben-2,2'-disulfonate; glycerrhetic acid; oktanol; heptanol.

Bunlardan elde edilen sonuçlara göre gerekirse panelin genişletilmesine gidilecektir.

Bu ajanları seçmekte kullandığımız literatürler şunlardır:

Andrew L. Harris. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. Progress in Biophysics and Molecular Biology 94 (2007) 120–143

Weihong Ma, Hui Hui, Pablo Pelegrin, and Annmarie Surprenant. Pharmacological Characterization of Pannexin-1 Currents Expressed in Mammalian Cells. T JPET 328:409–418, 2009.

## 6. PROJE YÖNETİMİ, EKİP VE ARAŞTIRMA OLANAKLARI

### 6.1 PROJE YÖNETİMİ

#### 6.1.1. YÖNETİM DÜZENİ (İş Paketleri (İP), Görev Dağılımı ve Süreleri)

Projede yer alacak başlıca iş paketleri, her bir iş paketinin kim/kimler tarafından ne kadarlık bir zaman diliminde gerçekleştirileceği hakkındaki bilgiler aşağıda yer alan **İş-Zaman Çizelgesi** doldurularak verilmelidir. Her bir iş paketinde görev alacak personelin niteliği (yürütücü, araştırmacı, danışman, bursiyer, yardımcı personel) belirtilmelidir. Gelişme ve sonuç raporu hazırlama aşamaları proje çalışmalarına paralel olarak yürütülmeli ve ayrı bir iş paketi olarak gösterilmemelidir.



TÜBİTAK  
İŞ-ZAMAN ÇİZELGESİ (\*)

İP No	İP Adı/Tanımı	Kim(ler) Tarafından Yapılacağı	AYLAR																																							
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36				
1	Hasta ve kontrol örneklerinin toplanması ve arşivlenmesi	Araştırmacı Dr. XXX ve Araştırmacı Dr. XXX tarafından	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																												
2	Pre-analitik analizlerin yapılması	Araştırmacı Dr. XXX gözetiminde Bursiyer tarafından		X	X	X	X																																			
3	Plazmada nükleozom ve histon metillenmelerinin ölçümü	Araştırmacı Dr. XXX gözetiminde Bursiyer tarafından					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																										
4	Sonuçların değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler	Yürütücü tarafından																X	X	X																						

(\*) Çizelgedeki satırlar ve sütunlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

## 6.1.2. BAŞARI ÖLÇÜTLERİ VE RİSK YÖNETİMİ

Projenin tam anlamıyla başarıya ulaşmış sayılabilmesi için **İş-Zaman Çizelgesinde** yer alan her bir ana iş paketinin hedefi, başarı ölçütü (ne ölçüde gerçekleşmesi gerektiği) ve projenin başarısındaki önem derecesi aşağıdaki **Başarı Ölçütleri Tablosu**'nda belirtilmelidir.

**BAŞARI ÖLÇÜTLERİ TABLOSU (\*)**

İP No	İş Paketi Hedefi	Başarı Ölçütü (% , sayı, ifade, vb.)	Projenin Başarısındaki Önemi (%)**
4,5	Bortezomib ile nöropati tetiklenmesi en temel başarı ölçütümüzdür.	%100	%40
2,4,5	Deney hayvanlarının analjezi ölçüm sistemine adapte edilmesi ve standart hatası büyük olmayan kontrol verilerinin elde edilebilmesi bir başka başarı ölçütüdür.	%100	%20
2-15,16	Spontan ağrı değerlendirme sisteminden de ısıyla tetiklenen ağrıya benzer bazal ve test ajanı verileri elde edebilme başarı ölçütleri arasında yer almaktadır.	%70	%15
2,4-15	Deney protokolü boyunca istatistik analizleri riske etmemek üzere, modele ait deney hayvanı ölümlerinin en az olarak gerçekleşmesi ve protokol sonunda verilerin elde edilmesi daha ileri bir aşama başarı ölçütümüzdür.	%80	%15
2-15	<i>In vivo</i> protokoller sonunda gruptan temsili hayvanlardan (yetişkin ratlar) primer hücre kültürü gerçekleştirilmesi ve bu hücrelerden uyarılmış kalsiyum cevaplarının elde edilebilmesi (kapsaisin ve KCl ile) ardından hedeflenen bir başarı ölçütüdür. Proje ekibi, yeni doğan farelerden gerçekleştirebildiğimiz primer DKG hücre kültürü hazırlanma işlemlerini, literatürde benzeyen protokole göre yetişkin farelerden de izole edebilme kapasitesindedir.	%70	%10

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

(\*\*) Sütun toplamı 100 olmalıdır.

Projenin başarısını olumsuz yönde etkileyebilecek riskler ve bu risklerle karşılaşıldığında projenin başarıyla yürütülmesini sağlamak için alınacak tedbirler (**B Planı**) ilgili iş paketleri belirtilerek ana hatlarıyla aşağıdaki **Risk Yönetimi Tablosu**'nda ifade edilmelidir.

**RİSK YÖNETİMİ TABLOSU (\*)**

İP No	En Önemli Risk(ler)	B Planı
2	Projemiz çerçevesinde hücre kültürü temelli çalışmalar yürütülecektir; güvenilir ve kaliteli sonuçlar elde edebilmek için kontaminasyonsuz, orijinal hücre hattında çalışmak gerekmektedir. Dolayısıyla kontaminasyon en önemli sorun olarak karşımıza çıkabilir.	Bu durumun engellenebilmesi için ilk ay hücrelerin yetiştirilmesi ve temiz bir şekilde stoklanması, laboratuvara giriş çıkışların kontrollü bir şekilde olması sağlanacaktır. Hücre stokları -86°C ve sıvı azot gibi farklı saklama koşullarında tutulacaktır. Denemeler süresince en az ayda bir olmak üzere kontaminasyon kontrolleri (bakteri ve mikoplazma kontrolü gibi) yapılacaktır. Herhangi bir kontaminasyon durumunda ortamın ve kabinin temizlenmesi sağlanacak, temiz olan hücre stokları ile çalışmaya devam edilecektir. Bütün gayretlere rağmen kontaminasyon probleminin aşamadığı durumda proje danışmanımızın bölümündeki hücre kültürü laboratuvarı olanaklarından da çok acil durumlarda faydalanılması konusunda mutabık kalınmıştır.
8-9	Westernlerde ve immünoflöresanda kullanılacak olan antikörlerin son derece iyi çalışıyor olmaları gerekmektedir.	Projemizin ilk altı ayında ticari olarak satın alınan antikörlerin bu metodolojilerde çalışıyor olduğunun gösterilmesi için optimizasyonlar gerçekleştirilecek, kullanacağımız antikörlerde sorun çıkması durumunda farklı markadaki antikörlerin kullanımı sağlanacaktır.
6-7-9	Projemizde çalışılması öngörülen sinyal yolağında rol oynayan moleküllerin seviyelerinde ve aktivitelerinde beklenen değişiklikler gözlenemeyebilir.	Bu durumda mikroarray analizleri sonucu ekspresyonu değişen hedef genler ile çalışmaya devam edilecektir.
10	İmmünopresipitasyon denemelerinde, bor ve türevleri varlığında ve/veya yokluğunda protein komplekslerindeki değişikliklerin gösterilmesi aşamasında doğal protein miktarları yetersiz kalabilir.	Bu durumda ekspresyon plazmidleri aracılığıyla geçici transfeksiyonlar yapılarak ilgilenilen proteinin miktarı artırılacak ve bu şekilde daha yüksek miktarda proteinlerin çökmesi sağlanacaktır

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.



## 6.2. PROJE EKİBİ

### 6.2.1. PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN DİĞER PROJELERİ VE GÜNCEL YAYINLARI

Proje yürütücüsünün TÜBİTAK, üniversite ya da diğer kurum/kuruluşların desteği ile tamamlamış olduğu projeler ile şu sırada yürütmekte olduğu veya destek almak için başvurduğu projeler hakkında aşağıdaki tablolarda yer alan bilgiler verilmelidir. Proje değerlendirme süreci sırasında destek kararı çıkması ve/veya yeni bir başvuru daha yapılması durumunda derhal TÜBİTAK'a yazılı olarak bildirilmelidir.

#### PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN TÜBİTAK DESTEKLİ PROJELERİ (\*)

Proje No	Projedeki Görevi	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi	Destek Miktarı (TL)

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

#### PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN DİĞER PROJELERİ (DPT, BAP, FP6-7 vb.) (\*)

Proje No	Projedeki Görevi	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi	Destek Miktarı (TL)

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

#### PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN SON 5 YILDA YAPTIĞI YAYINLAR (\*)

Yazar(lar)	Makale Başlığı	Dergi	Cilt/Sayı/Sayfa	Tarih

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

### 6.2.2. PROJE EKİBİNİN ÖNERİLEN PROJE KONUSU İLE İLGİLİ PROJELERİ

Proje ekibinin (proje yürütücüsü, araştırmacı, danışman) TÜBİTAK'a, herhangi bir kamu kurum ve kuruluşuna veya Türkiye'nin taraf olduğu uluslararası anlaşmalara dayalı olarak sağlanan fonlara sunulmuş olup öneri durumunda olan, yürüyen veya sonuçlanmış benzer konudaki projeleri varsa bu projeler hakkındaki bilgiler ve önerilen projeden ne gibi farkları olduğu aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

#### PROJE EKİBİNİN ÖNERİLEN PROJE KONUSU İLE İLGİLİ PROJELERİ (\*)

Adı ve Soyadı	Projedeki Görevi	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi	Önerilen Projeden Farkı

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

### 6.3. ARAŞTIRMA OLANAKLARI

Bu bölümde projenin yürütüleceği kurum/kuruluş(lar)da var olup da projede kullanılacak olan altyapı/ekipman (laboratuvar, araç, makine-teçhizat vb.) olanaklar aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

**MEVCUT ARAŞTIRMA OLANAKLARI TABLOSU (\*)**

Mevcut Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat vb.)	Mevcut Olduğu Kurum/Kuruluş	Projede Kullanım Amacı
AFM (Nanomagnetics)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Karakterizasyon çalışmaları
Çalkalayıcı (Firlabo V3000F)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	İn vitro çalışmalar
Bidistile su cihazı (Barnstead D11901)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	HPLC analizi
Çözünme hızı test cihazı (Pharmatest PTW S3C)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Çözünme hızı çalışmaları
Çözünme hızı test cihazı (Varian VK-7000)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Çözünme hızı çalışmaları
Derin Dondurucu	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Kan örneklerinin saklanması
DSC (Shimadzu DSC 60)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Karakterizasyon çalışmaları
Distile su cihazı (Nüve NS112)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	İn vitro çalışmalar
Etüv (Heraeus KT-500)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Malzeme kurutma işlemleri
HPLC (Thermo Finnigan Surveyor)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Miktar tayini
HPLC (Hawlett Packard 1050 Series)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Miktar tayini
İklimlendirme dolabı (Sanyo)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Stabilite çalışmaları
Karıştırıcı (Heidolph R7R1)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	İn vitro çalışmalar
Partikül büyüklüğü cihazı (Sympatec HELOS)	XXX Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Ritonavir kaba toz partikül büyüklüğü tayini

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

## 7. YAYGIN ETKİ

### 7.1. PROJEDEN BEKLENEN YAYGIN ETKİ

Proje başarıyla gerçekleştirildiği takdirde projeden elde edilmesi öngörülen/beklenen yaygın etkilerin (bilimsel/akademik, ekonomik/ticari/sosyal, araştırmacı yetiştirilmesi ve yeni projeler oluşturulması) neler olabileceği diğer bir ifadeyle projeden ne gibi çıktı, sonuç ve etkilerin elde edileceği kısa ve net cümlelerle aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

**PROJEDEN BEKLENEN YAYGIN ETKİ TABLOSU**

Yaygın Etki Türleri	Projede Öngörülen/Beklenen Çıktı, Sonuç ve Etkiler
<b>Bilimsel/Akademik</b> (Makale, Bildiri, Kitap)	1. İnsan biyolojik materyallerine erişimdeki zorluk ve etik kısıtlamalardan dolayı bu araştırmadaki gibi biyolojik örneklerin yüksek çıktı verebilecek kapasitedeki araştırmalarda verimli kullanımı önem arz etmektedir. Omiks teknolojilerinin kullanılacağı bu çalışma ile insan biyolojik örneklerinin verimli kullanımı mümkün olacaktır. Özellikle metabolomiks minimum örneklerle maksimum veri elde edilen bir analiz yöntemidir. Bilhassa sağlıklı donörlerden elde edilen insan kemik iliği materyallerinin etik kurul izni çerçevesinde kullanım imkanı olması, eşsiz öneme sahiptir.



TUBITAK

	<p>Son derece değerli insan biyolojik materyalinden bu teknolojiler kullanılarak elde edilen veriler tüm araştırmacıların kullanımı için referans teşkil edecektir.</p> <p>2. Kemik iliği- MKH transkriptom ve metabolom analizi için ilk olma özelliğini taşıyan bir çalışmadır.</p> <p>3. Sağlıklı niş özelliklerinin detaylı tanımlanması hastalık patofizyolojisinin anlaşılmasında da karşılaştırmalı analizler için temel teşkil edecektir.</p>
<b>Ekonomik/Ticari/Sosyal</b> (Ürün, Prototip Ürün, Patent, Faydalı Model, Üretim İzni, Çeşit Tescilli, Spin-off/Start- up Şirket, Görsel/İşitsel Arşiv, Envanter/Veri Tabanı/Belgeleme Üretimi, Telif Konu Olan Eser, medyada Yer Alma, Fuar, Proje Pazarı, Çalıştay, Eğitim vb. Bilimsel Etkinlik, Proje Sonuçlarını Kullanacak Kurum/Kuruluş, vb. diğer yaygın etkiler)	<p>1. İnsan kemik iliği nakli donörlerinden kemik iliği toplaması sırasında hangi anatomik bölge/nişin hematopoez potansiyeli açısından daha verimli sonuçlar verebileceğine dair ilk verilerin elde edilmesi sağlanacaktır.</p> <p>2. Farklı nişlerin detaylı karakterizasyonu sayesinde kemik iliği toplama tekniklerinde yeni uygulamalara gidilerek kemik iliği transplantasyonunda engrafmanın artırılmasına katkı sağlanabilir. Böylelikle, hastalarda daha az biyolojik örnekten yola çıkarak çok daha iyi sonuçlar elde edilmesine yol açabilir.</p> <p>3. Bu çalışmada literatürdeki diğer niş çalışmalarından farklı olarak insan örnekleri araştırılacaktır. Bu da klinik uygulamalar için hayvan modellerinde yapılan çalışmalara nispeten çok daha doğru ve güvenilir bilgiler elde edilmesine katkı sağlar.</p> <p>4. Rejeneratif tıp açısından KI-MKH'lerin ayrıntılı karakterizasyonları tamamlanmış olacak ve ihtiyaca yönelik hücre popülasyonlarından zengin kemik iliği bölgelerinin seçilmesinde yol gösterici olabilecektir.</p> <p>5. Metabolit belirlenmesi biyomarker belirlenmesinde en önemli araçtır. O nedenle tespit edilecek yeni biyomarkerların ileride ticarileşme potansiyeli mevcuttur.</p> <p>6. Bu hipotezimiz halen klinikte rutin olarak kullanılan, rastgele, yüksek hacimde kemik iliği toplamayı amaçlayan ticari aspirasyon iğnelerini de değiştirir niteliktedir. Bu da hem donör/hasta refahı hem de klinik açıdan oldukça önemlidir.</p>
<b>Araştırmacı Yetiştirilmesi ve Yeni Proje(ler) Oluşturma</b> (Yüksek Lisans/Doktora Tezi, Ulusal/Uluslararası Yeni Proje)	<p>1. Proje sonunda elde edilecek verilerden sağlanacak yeni bilgiler yeni projeler için domino etkisi yaratacak niteliktedir.</p> <p>2. Doktora ve doktora sonrası araştırmacıların projedeki istihdamı ile toplumda yetişmiş insan gücüne katkıda bulunulacaktır.</p>

## 7.2. PROJE ÇIKTILARININ PAYLAŞIMI VE YAYILIMI

Proje faaliyetleri boyunca elde edilecek çıktıların ve ulaşılabilecek sonuçların ilgili paydaşlar ve potansiyel kullanıcılara ulaştırılması ve yayılmasına yönelik yapılacak toplantı, çalıştay, eğitim, web sitesi, vb. ne tür faaliyetler yapılacağı aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

PROJE ÇIKTILARININ PAYLAŞIMI VE YAYILIMI TABLOSU (\*)

Faaliyet Türü (Toplantı, Çalıştay, Eğitim, Web sayfası vb.)	Paydaş / Potansiyel Kullanıcılar	Faaliyetin Zamanı ve Süresi
Çalıştay	Araştırma sonuçları özellikle sinir bilimleri (neuroscience) alanındaki bilim insanları ile paylaşılacaktır.	Projenin 20-24. Aylarına tekabül eden en uygun tarihte, en az 1 günlük çalıştay
Web sayfası	Sinir bilimleri ve diğer alandaki araştırmacılar	Projenin 6. Ayı itibarıyla proje sonuna kadar
Eğitim	İlgi duyan araştırmacılar	18. ayı takiben, 1 gün.

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

## BAŞVURU FORMU EKLERİ

EK-1: KAYNAKLAR

EK-2: BÜTÇE VE GEREKÇESİ

(\*) EK-1 ve EK-2 hariç toplam 20 sayfa geçiren proje önerileri değerlendirmeye alınmadan iade edilir.  
(Sayfa kontrolü sistem tarafından yapılmayıp, proje yürütücüsünün sorumluluğundadır.)