



1002 Hızlı Destek Programı

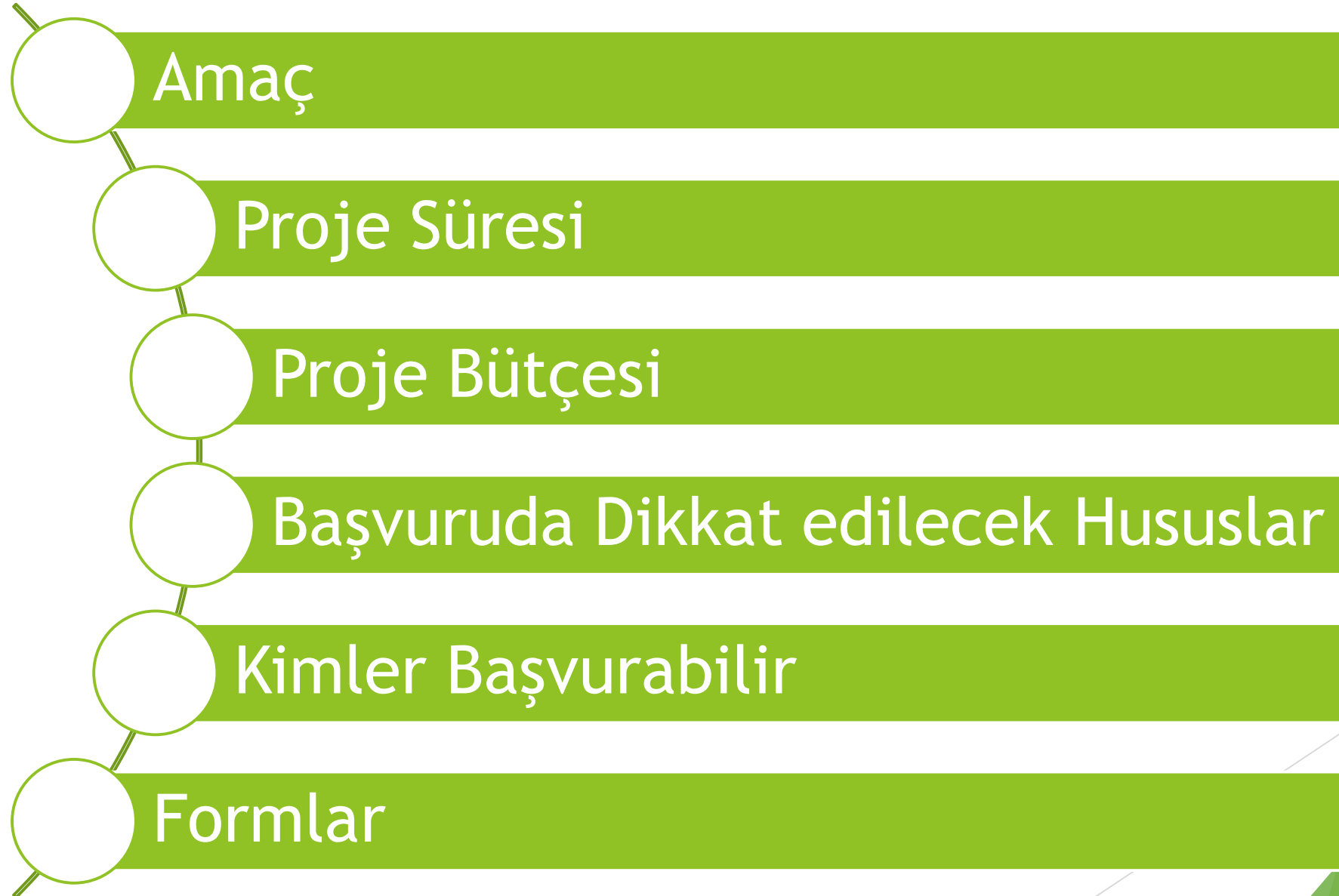
Hazırlayan: Dr. Esra TOKAY

Proje Koordinasyon Birimi

Proje Koordinasyon Ofisi Birim Sorumlusu

Dr. Öğr. Üy. Sabri BİÇAKCI

I. Oturum İÇERİK



II. Oturum İÇERİK



Başvuru Formu

Öneri Değerlendirme
Kriterleri

Programın AMACI

- Üniversitelerde, araştırma hastanelerinde ve araştırma enstitülerinde/istasyonlarında yürütülecek acil, kısa süreli, küçük bütçeli araştırma ve geliştirme projelerine destek sağlamaktır

Proje Süresi

► 12 ay

Proje Bütçesi

- Hızlı Destek projeleri destek üst limiti (Burs dahil) yıllık 45.000 TL'dir. Bu program kapsamında yürütücü ve araştırmacılara PTİ ödemesi yapılmamaktadır. Burslar ile ilgili üst sınırlar aşağıda verilmiştir

Burs Miktarı Üst Sınırları

Niteliği	Ücret Karşılığı Çalışmıyor İse	Ücretli Çalışıyor İse
Lisans Öğrencisi	750.-TL/ay	-----
Yüksek Lisans Öğrencisi	3.000.-TL/ay (BİDEB bursiyeri olması halinde 500 TL ilave edilir)	550.-TL/ay
Doktora Öğrencisi	3.500.-TL/ay (BİDEB bursiyeri olması halinde 1.000 TL ilave edilir)	650.-TL/ay
Doktora Sonrası Araştırmacı	4.500.-TL/ay (BİDEB bursiyeri olması halinde 1.500 TL ilave edilir)	-----

Başvuruda Dikkat edilecek hususlar

- ▶ Elektronik Başvuru Sistemine yüklenmesi gereken başvuru formunun istenilen formatta hazırlanması,
- ▶ Türkçe doldurulmuş olması (İngilizce özet ve referans olarak verilen uluslararası yayınlar hariç) ve
- ▶ formun EK-1 Kaynaklar ve
- ▶ EK-2 Bütçe ve Gerekçesi hariç 12 sayfayı aşmaması
- ▶ Aynı proje önerisi ile daha önce TÜBİTAK’a başvuru yapıldı ve panel değerlendirmesi sonucunda projenin desteklenmesi uygun bulunmadı ise, Elektronik Başvuru Sistemine girilen bilgiler doğrultusunda sistem tarafından otomatik olarak oluşturulan “Proje Önerisi Değişiklik Bildirim Formu” panel raporunda belirtilen değişiklik ve düzeltmeler dikkate alınarak doldurulması,

- Proje önerisinde yer alan metinsel ifadelerin, daha önce sunulmuş olan (sonuçlanan/yürürlükte olan projeler dahil) projelerde yer alan ifadelerle büyük ölçüde benzerlik içermemesi,
- Proje ekibinde yer alan kişilerin TÜBİTAK'a ya da farklı bir kurum/kuruluşa sunulmuş aynı/benzer içerikli projelerinin yürürlükte/sonuçlanmış ya da öneri durumunda olmaması,
- Projenin yurt dışı saha çalışması içermemesi,
- Önerilen makine-teçhizat ve hizmet alımı giderlerine ait proforma faturaların mutlaka olması, sarf malzemeleri için projede gerekliliğinin değerlendirilmesine imkan veren ayrıntıda liste verilmesi (Sarf malzemeler için proforma faturaya gerek yoktur)

- ▶ TÜBİTAK'tan talep edilen destek miktarının "1002 Programı" için belirlenen destek üst limitini aşmaması (Başvuru formunun eki olan "EK-2 Bütçe ve Gerekçesi" bölümünde yer alan "Genel Bütçe Tablosu"nda belirtilen destek miktarı ile çevrimiçi başvuru sırasında talep edilen miktarları birbirinden farklı olmamalıdır.)
- ▶ Proje kapsamında yapılacak arazi çalışması için arazi planının sunulması,
- ▶ Elektronik Başvuru Sistemindeki başvuru adımlarının eksiksiz olarak tamamlanması, sisteme yüklenen dosyaların açıldığından ve doğru belge olduğundan emin olunması,

- E-imza sürecinin tamamlanmış olması (Proje ekibinde yer alan kişilerin -yürütücü, araştırmacı, danışman-, proje ekibi dışındaki hak sahiplerinin ve tüm yürütücü/katılımcı kurum/kuruluş yetkililerinin nitelikli elektronik sertifika sahibi olması gerekmektedir),
- Kuruluş yetkilisi olarak; üniversitelerde ve üniversitelere bağlı enstitülerde/hastanelerde Rektör veya yetki verdiği Rektör Yardımcısının, üniversitelere bağlı olmayan hastanelerde Hastane Yöneticisi, Başhekim veya yetki verdiği Başhekim Yardımcısının, diğer kuruluşlarda Genel Müdür veya yetki verdiği Genel Müdür Yardımcısı/Başkan veya yetki verdiği Başkan Yardımcısının imzasının olması,

- Projenin araştırma projesi kriterlerine uygun olması, durum tespiti/veri toplamaya yönelik rutin bir çalışma niteliğinde olmaması,
- Projenin altyapı oluşturmaya yönelik olmaması,
- Sunulan kaynak listesinin metin ile ilişkilendirilmesi, proje önerisinde atıf yapılan tüm çalışmalara kaynakçada yer verilmesi,
- Projenin Etik Kurul Onay Belgesi ve Yasal/Özel İzin Belgesi gerektirip gerektirmediğinin belirlenmesi, gerektirmesi halinde alınacak belgenin istenilen kriterlere uygun olması, (Başvuruda gerekli olmadığı beyan edilen ancak ilgili Grup tarafından belgenin gerekliliğine karar verilen projeler bilimsel değerlendirmeye alınmadan iade edildiğinden söz konusu belgelerin gerekli olup olmadığına ilişkin kararın alınmasında titizlik gösterilmelidir

- ▶ Aynı proje önerisi ile daha önce TÜBİTAK'a başvuru yapıldı ve değerlendirme sonucunda iki kez özgün değer kriterinden yetersiz puan alındı ise aynı proje önerisi ile 3. kez başvuruda bulunulmaması,
- ▶ TÜBİTAK Merkez/Enstitülerinde çalışan kişilerin yürütücü/araştırmacı olarak proje ekibinde yer almaması.

Kimler Başvurabilir?

Proje Yürütücüsü

- Proje yürütücüsünün (emekliler hariç);
- Üniversite/Eğitim ve Araştırma Hastanesi personeli olması durumunda, projeyi öneren kuruluşun kadrolu personeli olması ve doktora/sanatta yeterlik/tıpta uzmanlık derecesine sahip olması
- Araştırma Enstitüsünde/İstasyonunda çalışması durumunda, projeyi öneren kuruluşun kadrolu personeli olması ve en az dört yıllık üniversite lisans eğitimi almış olması
- Doktora/sanatta yeterlik/tıpta uzmanlık öğrencisi olması durumunda, doktora yeterliğini almış olması ve ilgili Enstitü tarafından kabul edilmiş doktora tezleri ile başvuru yapması gerekmektedir.
- Doktora/tıpta uzmanlık/sanatta yeterlik öğrencileri için projenin yürütüleceği kurum/kuruluştaki kadrolu personel olma şartı aranmaz.

Araştırmacı

- ▶ Araştırmacıların; üniversitelerde, kamu kuruluşlarında veya özel kuruluşlarda çalışıyor olmaları,
- ▶ Üniversite/Eğitim ve Araştırma Hastanesi personeli olmaları durumunda doktora/sanatta yeterlik/tıpta uzmanlık derecesine sahip olmaları veya doktora/sanatta yeterlik/tıpta uzmanlık öğrenimine devam ediyor olmaları (Doktora/tıpta uzmanlık/sanatta yeterlik öğrencilerinin projelerde araştırmacı olarak görev alabilmeleri için öğretim elemanı olarak çalışma şartı aranır.),
- ▶ Kamu kuruluşları veya özel kuruluşlarda çalışmaları durumunda, en az dört yıllık üniversite lisans eğitimi almış olmaları gerekmektedir.

Danışman

- Projedeki katkı oranı %10'un altında olan kişiler araştırmacı olarak görev alamazlar, ancak danışman olabilirler. Bir projede danışman (*) yer alabilmesi için projenin özel uzmanlık gerektiren konu ya da konularının olması ve bu hususun proje önerisinde gerekçeli olarak belirtilmesi gerekir. Bir projede görev alacak danışman sayısı o projedeki özel uzmanlık gerektiren konu sayısı ile sınırlıdır.
- Proje başvurusunda bulunan doktora/sanatta yeterlik/tıpta uzmanlık öğrencilerinin tez danışmanları proje ekibinde danışman olarak yer alabilir.

BURSİYER

- Türkiye’deki yüksek öğretim kurumlarında lisans ve lisansüstü (Yüksek Lisans ve Doktora) eğitimlerine devam etmekte olan "öğrenciler" (özel öğrenciler ve hazırlık öğrencileri hariç) veya öğrenci statüsündeki "Araştırma Görevlileri" ile doktora sonrası araştırmacılar bursiyer olarak proje ekibinde yer alabilirler.
- BİDEB bursu veya kamu kurum/kuruluşlarından aylık burs alanlara, projeden de burs ödemesi yapılabilir. Ancak, BİDEB’ten veya kamu kurum/kuruluşlarından alınan aylık burs miktarı dikkate alınarak hesaplanacak toplam burs miktarı o yıl için Yönetim Kurulu tarafından belirlenen proje aylık burs üst limitlerini aşamaz. TÜBİTAK’ın desteklediği herhangi bir projeden burs alanlar, ikinci bir projede bursiyer olarak görev alamazlar.

Lisans bursiyerlerinde aranan koşullar:

- Herhangi bir kurum/kuruluştaki çalışmama,
- Türkiye’de kurulu bir yükseköğretim kurumunun lisans programında 3. sınıf ve üzeri öğrencisi olmak,
- Üniversitenin not sistemi esas olmak üzere, hazırlık hariç önceki yılların ağırlıklı genel not ortalamasının en az 4 üzerinden 2,5 veya 100 üzerinden 65 olması veya bölümünde hazırlık sınıfı hariç önceki yıllara ait ağırlıklı genel not ortalamasında ilk %20’lik dilime girilmiş olması.
- (Öğrencinin sınıfta kalması durumunda bursu kesilir. Bir projede aynı anda en fazla 4 (dört) lisans öğrencisi bursiyer olarak yer alabilir.)

Doktora Sonrası Araştırmacı bursiyerlerinde aranan koşullar:

- Doktoralı olup herhangi bir kurum/kuruluştaki çalışmama,
- Doçent ve üstü akademik unvana sahip olmama,
- Doktora/tıpta uzmanlık derecesinin alındığı tarih ile ilgili programın son başvuru tarihi arasında kalan sürenin 7 yıldan fazla olmaması.

Yabancı Uyruklu Yüksek Lisans/Doktora bursiyerlerinde aranan koşullar:

- Yüksek lisans bursiyerlerinin 30 yaşın altında olması (**)
- Doktora bursiyerlerinin 35 yaşın altında olması (**)

Başvuru Adresi

❗ Güvenli değil | ardeb-pbs.tubitak.gov.tr



ARDEB PBS

Proje Başvuru Sistemi

Dönemsel Başvuru Programları

Sürekli Başvuruya Açık Programlar

Çağrılı Başvuru Programları

Program Kodu	Program Adı	Bilgi Notu
1002	1002 - HIZLI DESTEK PROGRAMI	Bilgi Notu
1005	1005 - ULUSAL YENİ FİKİRLER VE ÜRÜNLER ARAŞTIRMA DESTEK PROGRAMI	Bilgi Notu
3501	3501 - KARIYER GELİŞTİRME PROGRAMI	Bilgi Notu

Başvuru Programına Giriş

Proje başvurunuza başlamadan önce, ARBİS bilgilerinizin güncel olduğundan emin olunuz, bilgileriniz güncel değilse lütfen güncelleyiniz.

ARBİS kaydınıza erişmek veya ARBİS'e üye olmak için [tıklayınız](#).

ARBİS Üyeliđi

- TÜBİTAK ARDEB tarafından yürütölen tüm destek programlarına başvuru yapabilmek veya araştırmacı/danışman olabilmek için başta Türkiye olmak üzere tüm dünyadaki araştırmacıların kişisel, deneyim, eğitim, iletişim ve bilimsel yetkinlik bilgilerinin tutulduğu bir veri tabanı olan Araştırmacı Bilgi Sistemi'ne (ARBİS) kayıt olunması, tüm bilgilerin eksiksiz doldurulması ve güncel tutulması zorunludur.

Proje Kotası

- ARDEB projelerinde görev alabilme limitleri içerisinde sayılan projelerinin bilgileri yer almaktadır. Toplam Kota Puanı üst limiti 6 olup; proje yürütücülüğü 2 puan, araştırmacılık (yurt dışı araştırmacılık hariç) görevleri ise 1 puan olarak kabul edilmektedir
- 1002 - Hızlı Destek Programı kapsamındaki projeler, toplam proje kotasına dahil değildir. Hızlı Destek programı kapsamında; aynı anda en fazla iki projede yürütücü veya dört projede araştırmacı olunabilir

Başvuruda Gerekli Belgeler

- ▶ Başvuru Formu (Elektronik başvuru sistemine yüklenmesi gereken belge)
- ▶ Başvuru Formu EK-1 Kaynaklar (Elektronik başvuru sistemine yüklenmesi gereken belge)
- ▶ Başvuru Formu EK-2 Bütçe ve Gerekçesi (Elektronik başvuru sistemine yüklenmesi gereken belge)
- ▶ Proje Önerisi Değişiklik Bildirim Formu (Tekrar sunulan proje önerileri için elektronik başvuru sistemine girilen bilgiler doğrultusunda sistem tarafından oluşturulan belge)

- ▶ Fikri Mülkiyet Hak Sahipliği Protokolü
- ▶ **Etik Kurul Onay Belgesi** (Eğer gerekli ise)
- ▶ **Yasal/Özel İzin Belgesi** (Eğer gerekli ise)
- ▶ **Destek Mektupları** (Eğer gerekli ise)
- ▶ Feragat Formu (Eğer gerekli ise)

Yürütücü/araştırmacının doktora/sanatta yeterlik/tıpta uzmanlık öğrenimine devam etmesi durumunda aşağıdaki belgelerin elektronik başvuru sistemine yüklenmesi gerekmektedir.

- ▶ Yürütücü olunması durumunda;
- ▶ Öğrenci Belgesi
- ▶ Doktora Tezine Ait Enstitü Onaylı Belge
- ▶ Doktora Tezine İlişkin Gerekçe
- ▶ Tez Danışmanı Onay Belgesi

Araştırmacı olunması durumunda;

- ▶ Öğrenci Belgesi
- ▶ Kadrolu Çalışıldığına Dair Belge

II. OTURUM BAŞVURU FORMU HAZIRLIĞI

Başvuru formu

1002 – HIZLI DESTEK PROGRAMI PROJE BAŞVURU FORMU

Başvuru formunun Arial 9 yazı tipinde, her bir konu başlığı altında verilen açıklamalar göz önünde bulundurularak hazırlanması ve ekler hariç toplam 12 sayfayı geçmemesi beklenir. Değerlendirme; önem ve özgün değer, amaç ve hedefler, yöntem, proje yönetimi ve yaygın etki başlıkları altında yapılacaktır. Araştırma proje önerisi değerlendirme formuna ulaşmak için [tıklayınız](#).



Proje Başlığı:

Proje Yürütücüsü:

Projenin Yürütüleceği Kurum/Kuruluş:

Sistemde bilgileri girerken İngilizce başlıkta yazılmalıdır. Formda istenmemektedir. Formda ÖZET ve İNGİLİZCE ÖZET kısımları bulunmamaktadır. Ancak sistemden proje yüklenirken bu kısımlar sorulmaktadır.

- Sistemden Proje bilgileri girildiğinde proje türü de sorulmaktadır.
- Temel Araştırma: Görünürde herhangi bir özel uygulaması veya kullanımı bulunmayan ve öncelikle olgu ve gözlemlenebilir gerçeklerin temellerine ait yeni bilgiler edinmek için yürütülen deneysel veya teorik çalışmadır.
- Uygulamalı Araştırma: Yeni bilgi edinme amacıyla yürütülen özgün araştırmadır. Bununla birlikte uygulamalı araştırma, öncelikle belirli bir pratik amaç veya hedefe yöneliktir.
- Deneysel Geliştirme: Araştırma ve/veya pratik deneyimden elde edilen mevcut bilgiden yararlanarak yeni malzemeler, yeni ürünler ya da cihazlar üretmeye; yeni süreçler, sistemler ve hizmetler tesis etmeye ya da halen üretilmiş veya kurulmuş olanları önemli ölçüde geliştirmeye yönelmiş sistemli çalışmadır.

Proje Özeti

URG-4/URGCP (Up-regulation gene-4/Up-Regulation Gene Cell Proliferation) geni ilk olarak cDNA çıkarımı yöntemiyle Hepatit B virüsü enfekte olmuş karaciğer karsinomlu dokularda tespit edilmiştir. Kanseri hücre ve dokularda genin ifadesinin normal hücre ve dokulara kıyasla daha fazla olduğu bulunmuştur. URG-4/URGCP geninin özellikle hücre çoğalması ve tümör oluşumunu indüklediği yapılan çalışmalar doğrultusunda gösterilmiştir. Dünya genelinde erkeklerde üçüncü kadınlarda ikinci sırada olan kolon kanserinin, önlenmesi ve tedavi stratejilerinin gelişmesi için genetik temeli olan çalışmalar yapılması ve burada görev alan yolların irdelenmesi gerekmektedir. Kanseri doğrudan ilişkili olan URG-4/URGCP birçok kanseri hücresinde ki rolü çalışılmasına rağmen kolon kanseri hücreleri ve dokularında yapılmış herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Bu amaçla çalışmalarımız hücre çalışmaları ve hasta çalışmaları olarak iki ana başlığa bölünmüştür. Hücre çalışmaları kapsamında, kolon kanseri hücreleri (HT-29) kullanılacaktır. İlk olarak, ön çalışmalarla mRNA (qPCR) ve protein (Western blotting) düzeyinde gösterdiğimiz URG-4/URGCP geninin ifadesi, siRNA uygulama çalışmalarıyla kolon kanseri hücrelerinde susturulacaktır. mRNA ve protein düzeyinde genin susturulduğu gösterilecektir. URG-4/URGCP geni susturulmuş olan ve normal kolon kanseri hücreleri kullanılarak, URG-4/URGCP geninin metastatik ve proliferatif marker genlerle (osteopontin, vimentin, E-kaderin, N-kaderin, TSPAN-8, twist, p27 ve siklin D1) ilişkisi mRNA (qPCR) ve protein (western veya IFC) seviyesinde analiz edilecektir. Aynı zamanda URG-4/URGCP geninin metastatik/ invaziv kabiliyetinin belirlenmesi amacıyla susturulmuş ve normal kolon kanseri hücrelerinde matri-jel invazyon, koloni formasyon ve yaralanma deneyleri gerçekleştirilecektir. Proliferatif kabiliyetinin belirlenmesi amacıyla MTT deneyleri ve Annexin-V/propidyum iyodür boyama çalışmaları yapılacaktır. Hasta çalışmaları kapsamında ise, 15 adet taze kolon kanseri ve normal kolon dokularından RNA izolasyonu gerçekleştirilecek ve qRT-PCR stratejisiyle hem URG-4/URGCP geninin hem de hücre çalışmalarında yapılan proliferatif ve metastatik marker genlerin ifadesi mRNA düzeyinde ve immunohistokimyasal olarak protein düzeyinde de

araştırılacaktır. Ayrıca, URG-4/URGCP geninin daha kapsamlı olarak kolon kanserli doku örneklerinde protein düzeyinde ifadeleri de 85 adet kolon kanserli ve 50 adet normal kolon doku preparatlarında immunohistokimyasal yöntemle araştırılacaktır.

Özet olarak, bu projede ki ana hedeflerimiz (i) 85 adet parafin bloktaki kolon kanseri dokuları-50 kanserli olmayan doku da URG-4/URGCP geninin ifadesinin belirlenmesi (ii) URG-4/URGCP geni susturulmuş kolon kanserli hücrelerde (HT-29), genin metastatik ve proliferatif marker genleri ile ilişkisinin mRNA ve protein düzeyinde aydınlatılması (iii) URG-4/URGCP geni susturulmuş kolon kanserli hücrelerinde genin metastatik ve proliferatif kabiliyetinin hücresel düzeyde araştırılması (iv) Taze doku örneklerinde (15 taze kanserli -kanserli olmayan doku) hem URG-4/URGCP hemde hedeflenen metastatik ve proliferatif marker genleri ifadesinin mRNA (qRT-PCR) ve protein düzeyinde (IHC-immunohistokimya) aydınlatılmasıdır. Bu anlamda kolon kanseri hücre ve dokularında URG-4/URGCP geninin metastazı indükleyici ve proliferasyonu artırıcı kilit role sahip olduğu

3001BF-01 Güncelleme Tarihi: 27/05/2013



tespit edilebilirse, çeşitli inhibitörlerin sentezi sağlanarak ya da genin regülasyonunun detaylı analizi gibi ilave çalışmalarla kolon kanseri hastalığının ilerlemesi ya da metastazı engellenebilecektir.

Project Title : Determination of relationship between URG-4/URGCP gene and proliferative and metastatic marker genes in Colon Carcinoma tissue and cells.

Project Summary

URG-4/URGCP was firstly found in Hepatitis B infected Hepatocellular Carcinoma tissues with cDNA substruction method. It was found that, the expression of this gene was higher in cancer cells and tissues than normal cells and tissues. URG-4 / URGCP gene has been shown to induce cell proliferation and tumor formation in particular. The prevention of colon carcinomas and the development of treatment strategies require genetic-based and pathway studies. Although, URG-4/URGCP, which is directly linked to cancer, has been clarified in many cancer cell lines and pathways, there is no studies about colon cancer cells and tissues. Simultaneously, siRNA mediated silencing of URG-4/URGCP gene will also be performed for the first time in colon cancer cells under this project.

For this purpose, our studies have been divided into two main headings as cell studies and patient studies. Colon cancer cells will be used within the scope of cell studies. With pre-studies, it was shown that URG-4 / URGCP expression was upregulated at mRNA level (qPCR) and protein level (Western Blotting or Flow cytometry analysis), the expression of this gene will be silenced in colon cancer cells and blocked expression will be showed at mRNA and protein level. The relation between proliferative and metastatic marker genes (osteopontin, vimentin, E-kaderin, N-kaderin, TSPAN-8, twist, p27 ve siklin D1) and URG-4/URGCP gene will be analyzed using silenced and normal colon cancer cells at mRNA (qPCR) and protein (western blotting or flow cytometer) level. At the same time colony formation, matrix-gel invasion and wound healing experiments will be performed in silenced and normal colon cancer cells to determine the mechanical invasive ability of the URG-4 / URGCP gene.

1. KONUNUN ONEMI VE OZGUN DEGERI

Proje önerisinde ele alınan konunun önemi, literatürün eleştirel bir değerlendirmesinin yanı sıra nitel veya nicel verilerle açıklanır. Konunun arka planı, günümüzde gelinen durum ve güncelliği yorumlanarak literatürün projeye ilişkisi ortaya konur.

Ozgün değer yazılırken proje önerisinin bilimsel niteliği, farklılığı ve yeniliği, alandaki hangi eksiği nasıl gidereceği veya hangi soruna nasıl bir çözüm getireceği vurgulanır. İlgili bilim ve teknoloji alanlarına kavramsal, kuramsal veya metodolojik olarak ne gibi özgün katkılarda bulunacağı kaynak gösterilerek açıklanır.

Kaynaklar <http://www.tubitak.gov.tr/ardeb-kaynakca> sayfasındaki açıklamalara uygun olarak EK-1'de verilir.

Kolon kanseri dünyada büyük bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya genelinde erkeklerde üçüncü kadınlarda ikinci sırada olan kolon kanserinin, yılda 1.2 milyon vakanın hastalığa yakalanması ile her yıl ortalama 600.000 insanın ölümüyle dünyada ikinci en yüksek ölüm oranına sahip olduğu tespit edilmiştir (Tariq ve Ghias, 2016). Kolon kanserinin altında yatan sebepler oldukça kompleks ve kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Bazı çevresel ve genetik faktörler bu kanserin oluşumuna neden olmaktadır. Beslenme ile ilgili olan çevresel faktörlerin arasında doymuş yağ, fazla kırmızı et, fazla alkol tüketimi gibi sebepler bulunmaktadır. Kolon karsinomanın önlenmesi ve tedavi stratejilerinin gelişmesi için genetik temeli olan çalışmalar yapılması ve burada görev alan yolların irdelenmesi gerekmektedir (Roper ve Hung, 2013).

Kolon kanseri vakalarında en fazla ölüm sebeplerinden birisi tümör metastazıdır. Kolon kanseri hücrelerinde tümör metastazı için çeşitli moleküler mekanizmalar tespit edilmiştir. CD44v6, CCAT2, Galektin-3 ve nükleer Beta katenin ve VEGF-A gibi genlerin moleküler markır olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir (Chu vd., 2013). Ancak, kolon kanserinin tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar bulabilmek amacıyla metastaz ve proliferasyona katkısı olabilecek yeni genlerin keşfine ihtiyaç vardır.

URG-4/URGCP geni 2002 yılında hepatokarsinogeneze katkısı olduğu kanıtıyla tespit edilmiştir. Hepatit B virüsü enfekte olmuş karaciğer karsinoma dokularında cDNA çıkarımı tekniği kullanılarak bulunmuş ve Hepatit B virüsünün kodladığı HBxAg proteininin doğal efektörü olabileceği öne sürülmüştür. Normal dokulara nazaran karaciğer karsinomada ekspresyonu arttığı tespit edilen bu gen, 922aa uzunluğunda 103,876 Da büyüklüğünde protein kodladığı tespit edilmiştir. URG-4/URGCP polipeptid kısmı incelendiğinde 690-697 aa aralığında ATP/GTP bağlanma motiflerinin olduğu ancak fonksiyonel analizlerde bu bölgelerin aktif olmadığı bulunmuştur. Genin aşırı ifadesinin sağlandığı hepatokarsinoma hücrelerinde hücre yaşayabilirliğinin ve canlılığının arttığı tespit edilmiştir (Satiroğlu Tufan vd., 2002). URG-4/URGCP ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, genin siRNA aracılığıyla

olmadığı bulunmuştur. Genin aşırı ifadesinin sağlandığı hepatokarsinoma hücrelerinde hücre yaşayabilirliğinin ve canlılığının arttığı tespit edilmiştir (Satiroğlu Tufan vd., 2002). URG-4/URGCP ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, genin siRNA aracılığıyla susturulduğu gastrik kanser (GES-1) hücrelerinde hücre çoğalması, canlılığı ve Siklin D1 geni ekspresyonunun ve koloni oluşturma kabiliyetlerinin azaldığı tespit edilmiş ve bu bağlamda genin GES-1 hücrelerinde onkogen olabileceği vurgulanmıştır (Song vd., 2006). Yine benzer bir çalışma 2010 yılında Hepatokarsinomlu hücrelerde yapılmış, URG-4/URGCP geni siRNA ile susturulmuş ve aşırı ifadesi sağlanmıştır. Genin ifadesinin susturulduğu hepatokarsinomlu hücrelerde siklinD1 geninin ekspresyonu mRNA seviyesinde azalırken, aşırı ifade edildiği durumlarda siklin D1 ekspresyonu artmıştır. Bu hücrelerde de URG-4/URGCP hücrelerin çoğalmasını arttırdığı tespit edilmiştir (Satiroğlu-Tufan vd., 2010). HepG2 hücrelerinde URG-4/URGCP geninin miRNA'larla ilişkisinin aydınlatılması üzerine yapılan çalışmada, URG-4/URGCP aşırı ifade olan hücrelerde 1,034 miRNA tespit edilmiş bunlardan 77 tanesinin daha fazla ifade olduğu bulunmuştur. Bunlardan en çok miR-1274b, miR-4271, miR-4286, miR3926, miR-4267 ifadelerinin aşırı artmış olduğu, miR-3664, miR-3663-5p, miR-3134 ifadelerinin ise aşırı azalmış olduğu bulunmuştur (Dodurga vd., 2012). Antifungal bir ilaç olan Rapamisin uygulanan çeşitli prostat kanseri hücrelerinde (PC3, DU145, LNCAP) URG-4/URGCP ekspresyon seviyesi analiz edilmiş, bu genin ekspresyonunun Rapamisin uygulanmış DU145 ve PC3 hücrelerinde ifadesinin azaldığı buna karşın LNCAP hücrelerinde ise ifadesinin arttığı gözlenmiştir. G1'den sentez fazına geçişi inhibe eden bu ilacın bütün prostat kanseri hücrelerinde sitotoksik etki oluşturduğu bulunmuştur (Dodurga vd., 2012). Buna benzer bir çalışma nöroblastoma hücreleri için yapılmıştır. İlaç endüstrisi ve gıdalarda korucu olarak kullanılan sülfid adında bir maddenin, nöroblastoma hücreleri üzerine sitotoksik etkisi ve invazyon koloni oluşturma kabiliyetleri, hücre siklusu ve apoptosis genleri ile ilişkisi çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, apoptoz ilişkili genlerin arttığı, URG-4/URGCP ekspresyonu düştüğü tespit edilmiştir (Dodurga vd., 2015). Valpronik asit ve temozomolit kimyasalları için de aynı şekilde çalışmalar yapılmıştır (Dodurga vd., 2014; Çitişlı vd., 2015). Hepatokarsinoma hücre hatlarında ve 278 tane hepatokarsinomlu parafine emdirilmiş ve taze doku

omleklerinde URG-4/URGCP ekspresyonu taranmıştır. % 48 oranında bu dokularda URG-4/URGCP ekspresyonu arttığı tespit edilmiştir. Bu hücre hatlarında URG-4/URGCP geni susturulmuş ve MTT analiziyle hücre canlılığına etkisi belirlenmiştir. Aynı zamanda Foxo3a transkripsiyon faktörü de susturularak çeşitli genlerin p21, p27 ve siklin D1) ifadeleri araştırılmıştır. Bu araştırmayla, URG-4/URGCP geni azaldığında Foxo3a transkripsiyon faktörünün fosforillenmediği ve dolayısıyla G1'den S fazına geçişin inhibe olduğu, aynı zamanda p21 ve p27 tümör supresör genlerinin ifadeleri artarak buna karşın siklinD1 ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Xie vd.,2012). Hepatokarsinoma hücreleriyle yapılan çalışmalarda URG-4/URGCP ekspresyonu çeşitli hepatoma hücrelerinde gösterilmiş ve geni overekspre eden hücrelerin anjiyogenik aktivitesi artırdığı bulunmuştur. Bu aktiviteyi NFKB transkripsiyon faktörü üzerinden regüle ettiği yapılan çalışmalar sonucu tespit edilmiştir (Xing vd.,2015). Bu genin ovaryum kanseri dokuları, lösemi, servikal kanser dokuları, küçük hücreli kanser hücreleri ve dokuları, nazofarenks kanser dokularında aşırı ifade olduğu immunohistokimya çalışmaları ile bulunmuştur (Li ve Zhou,2012; Dodurga vd.,2013; Zhang vd., 2014;Cai vd., 2015; Yu vd., 2016)

Başka bir çalışmada URG-4/URGCP ekspresyonunun mesane kanseri hücrelerinde ve dokularında arttığı, cisplatin uygulanmış mesane kanseri hücrelerinde apoptoza direnç gösterdiği ve bunu NFKB'yi aktive ederek yaptığı bulunmuştur (Wu vd.,2015).

Diyetle alınan fenolik bileşiklerden olan Ferulik asit, tiroid kanseri hücrelerine uygulanmış ve bu hücrelerde hem metastatik özellikleri hem de URG4/URGCP ekpresyon seviyesi belirlenmiştir (Dodurga vd.,2016).

Yaptığımız önceki çalışmalarda, genin TGF- β sitokini uygulanmış hepatoma ve prostat hücrelerinde ifadesinin arttığı ve bu artışın MAPK/ERK yolağı üzerinden gerçekleştiği tespit edilmiştir (Tokay ve Kockar,2016a).

URG-4/URGCP geni ile yapılmış olan susturulma çalışmaları tablo 1de özetlenmiştir. Özellikle gastrik kanseri, karaciğer

bu artışın MAPK/ERK yolağı üzerinden gerçekleştiği tespit edilmiştir (Tokay ve Kockar,2016a).

URG-4/URGCP geni ile yapılmış olan susturulma çalışmaları tablo 1de özetlenmiştir. Özellikle gastrik kanseri, karaciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve mesane kanserleri üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiştir. **Ancak kolon kanseri ile ilgili yapılan herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir.**

Tablo 1: URG-4/URGCP geni ile yapılan susturulma çalışmalarının özeti

Hücre Hattı tipi	Hasta Çalışması	Uygulanan metotlar	Genler	Kaynakça
GES-1 SGC7901 MKN28 MKN45 AGS BGC823 (Gastrik karsinoma hücreleri)	Gastrik kanser dokuları parafirme emdirilmiş (100 hasta)	siRNA uygulaması, soft agar ve tümör formasyon	siklinD1,URG-4	Song vd., 2006
HepG2 (Karaciğer Karsinoma)hücreleri	-	siRNA uygulaması, Hücre çoğalması, Flow sitometre (PI boyama)	SiklinD1, URG-4	Tufan vd., 2010
HCC hücre hatları (15 tip) QGY-7703, QGY7701, SMMC7721, HepG2, Hep3B, PLC/PRF/5, HuH7, HepG2215, HCCC9810, Bel-7402, Bel-7404, HCCL-M3, HCCL-M6, MHCC-97L ve MHCC-97H	Parafirme emdirilmiş 278 karaciğer kanseri dokusu,10 taze HCC tümörlü doku	siRNA uygulaması, IHC, Lusiferaz assay, Fare çalışması, koloni formasyon, MTT, BrdU boyama ve hücre döngüsü analizleri,	P27, p21, SiklinD1, URG-4, Akt, FOXO3a	Xie vd., 2012
HCC hücre hatları	Normal karaciğer dokuları	Over ekspresyon, siRNA uygulaması, HUVEC tüp oluşumu, CAM assay, Migrasyon deneyleri, Lusiferaz aktivitesi,	URG-4, VEGFC, TNF- α , IL-6,IL-8, v-myc	Xing vd., 2015
NCI-H292, NCI-H596,	212 doku (küçük	Over ekspresyon, sirNA ile	URG-4, MMP ailesi	Cai vd.,

Literatürde URG-4/URGCP geninin birçok kanser tipi ile ilişkisi aydınlatılmış olmasına rağmen kolon tümör dokusu ve kolon kanseri hücrelerinde ki ifadesi konusunda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Aynı zamanda, URG-4/URGCP geni susturulmuş kolon kanseri hücrelerin metastaz, invazyon ve koloni oluşturma yetenekleri de aydınlatılmamıştır. Bu çalışma ile, kolon tümörü ve tümörlü olmayan dokularda URG-4 geninin proliferasyon ve metastatik genler ile ilişkisini araştırılması ayrı önem kazanmaktadır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular, kolon kanserini moleküler çalışmalar dayanarak önleme ve tedavide yeni bir yol karşımıza çıkarabilir.

URG-4/URGCP geni ilk olarak hepatosellüler kanserli hücrelerde tespit edilmiş ve genin onkogen olabileceği düşünülmüştür. Özellikle proliferasyonu arttırdığı ve tümör oluşumunu arttırdığı çeşitli çalışmalarda tespit edilmiştir. Normal dokulara kıyasla çeşitli kanserli hücre ve dokularda ekspresyonunda aşırı artış olması ile dikkat çekmiştir. Genin hakkında sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. Ancak literatürde özellikle kolon karsinoma hücreleri ve dokuları ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Literatürde ki bu boşluktan yola çıkarak genin bu hücre ve dokularda ki rolünün araştırılması kolon kanserinin tedavisine yönelik çalışmalara katkı sağlayabilmesi açısından önemlidir. Çalışmanın özgün yönleri aşağıda sıralandığı gibidir:

- 1- İlk defa kolon kanseri hücrelerinde URG-4/URGCP geni susturularak metastatik ve proliferatif marker genlerle (osteopontin, vimentin, E-kaderin, N-kaderin, TSPAN-8, twist, p27 ve siklin D1) ilişkisi mRNA ve protein düzeyinde aydınlatılacaktır.
- 2- İlk defa kolon kanseri hücrelerinde URG-4/URGCP geni susturularak metastaz ve invazyon kabiliyeti hücresel yöntemlerle tespit edilmiş olacaktır.
- 3- İlk defa kolon kanseri hücrelerinde URG-4/URGCP geni susturularak proliferatif kabiliyeti gösterilmiş olacaktır.
- 4- Genin kolon kanseri dokularında ve normal kolon dokularında ki (hasta örneklerinden) ifadesi ilk olarak tespit edilmiş olacaktır. Daha kapsamlı olarak parafin bloklardaki 85 adet kolon kanseri dokularında URG-4/URGCP ekspresyonun protein düzeyinde taranmış olacaktır.
- 5- 15 adet taze kolon tümörlü dokularda, ifadesi mRNA düzeyinde arttığı yada azaldığı anlamlı bulunmuş proliferatif ve metastatik genlerin ifadesi protein düzeyinde immunohistokimyasal olarak analiz edilecektir.

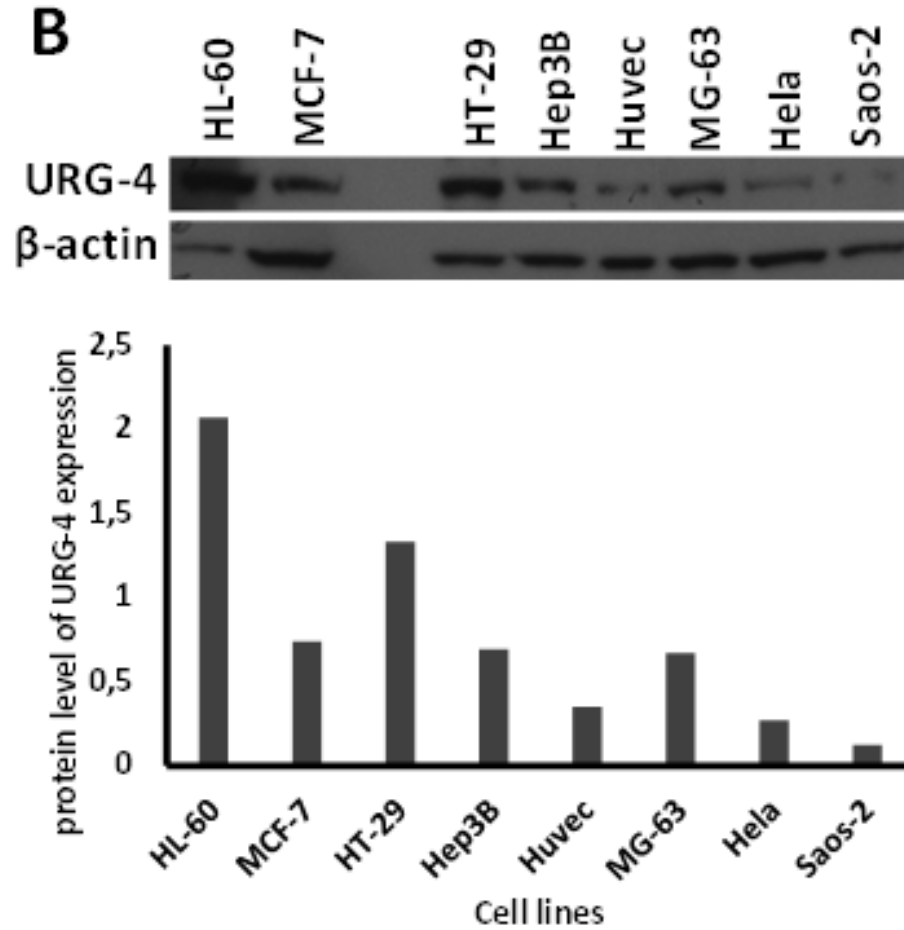
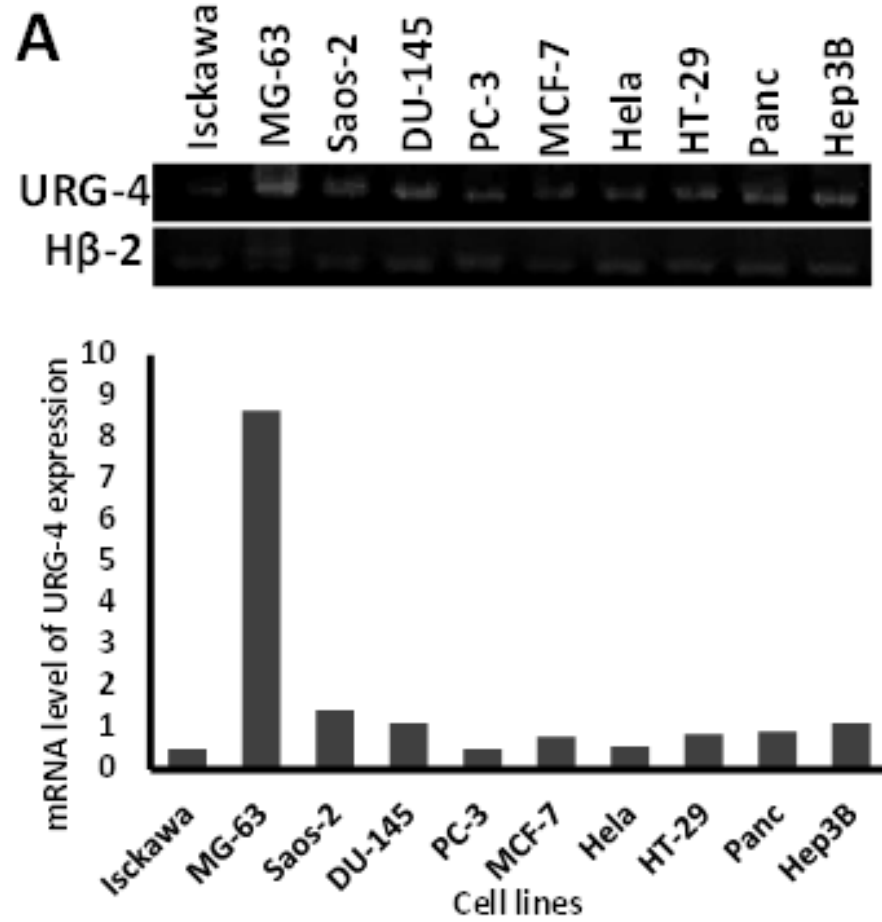
2. ARAŞTIRMA SORUSU VEYA HİPOTEZİ İLE AMACI ve HEDEFİ

Proje önerisinin araştırma sorusu veya hipotezi belirtilir. Amacı ve hedefi açık, ölçülebilir, gerçekçi ve proje süresince ulaşılabilir nitelikte olacak şekilde yazılır.

Kolon kanseri dünyada büyük bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Kolon karsinomanın önlenmesi ve tedavi stratejilerinin gelişmesi için genetik temeli olan çalışmalar yapılması ve burada görev alan yolların irdelenmesi gerekmektedir. Kolon kanseri vakalarında en fazla ölüm sebeplerinden birisi tümör metastazıdır. Kolon kanseri hücrelerinde tümör metastazı için çeşitli moleküler mekanizmalar tespit edilmiştir. Bu kapsamda, CD44v6, CCAT2, Galektin-3 ve nükleer Beta-katenin ve VEGF-A gibi genlerin metastaz ile ilişkileri ortaya konmuştur. (Chu vd., 2013). **Ancak, kolon kanserinin tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar bulabilmek amacıyla metastaz ve proliferasyona katkısı olabilecek yeni genlerin keşfine ihtiyaç vardır.**

Hepatit-B virüsünün kodladığı X antijeni (HBxAg) çeşitli genlerin ekspresyonunu artırarak veya azaltarak hepatosellüler karsinomanın gelişiminde önemli bir rol oynar. HBxAG pozitif ve negatif olan Hepatosellüler karsinomlu hücrelerle (HepG2) yapılan cDNA çıkarma çalışmalarıyla URG-4/URGCP geni ilk olarak 2002 yılında bulunmuştur. Bu çalışmayla bu genin HBxAG'nin doğal efektörü olabileceği vurgulanmıştır (Satiroğlu-Tufan vd., 2002). URG-4/URGCP geninin birçok kanser hücresi tipi (Hepatoma, Gastrik kanseri, Prostat kanseri, nöroblastoma, lösemi, glioma, serviks, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mesane kanseri, tiroid kanseri, nazofarinks kanseri) ve dokularda (gastrik, ovaryum kanseri, glioma, lösemi hastalarından alınan kemik iliği örneklerinde) aşırı ekspre olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Song vd., 2006; Satiroğlu-Tufan vd., 2010; Li ve Zhou, 2012; Dodurga vd., 2013; Zhang vd., 2014; Cai vd., 2015; Yu vd., 2016). Grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda, URG-4/URGCP geninin TGF- β 1 sitokini ile regülasyonu aydınlatılmıştır. Bu çalışmada TGF- β sitokininin genin ifadesini mRNA ve protein düzeyinde arttırdığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda genin promotor aktivitesini arttırdığı ve TGF- β sitokininin URG-4/URGCP geninin regülasyonunu MAPK/ERK yolağını kullanarak gerçekleştirdiği analiz edilmiştir (Tokay ve Köcker, 2016a). Regülasyon çalışmalarımız dahilinde yine genin SP1 transkripsiyon faktörü aracılığı

olmayan akciğer kanseri, mesane kanseri, tiroid kanseri, nazofarinks kanseri) ve dokularda (gastrik, ovayum kanseri, glioma, lösemi hastalarından alınan kemik iliği örneklerinde) aşırı ekspre olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Song vd., 2006; Satiroğlu-Tufan vd., 2010; Li ve Zhou, 2012; Dodurga vd., 2013; Zhang vd., 2014; Cai vd., 2015; Yu vd., 2016). Grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda, URG-4/URGCP geninin TGF- β 1 sitokini ile regülasyonu aydınlatılmıştır. Bu çalışmada TGF- β sitokininin genin ifadesini mRNA ve protein düzeyinde arttırdığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda genin promotor aktivitesini arttırdığı ve TGF- β sitokininin URG-4/URGCP geninin regülasyonunu MAPK/ERK yolağını kullanarak gerçekleştirdiği analiz edilmiştir (Tokay ve Köçkar, 2016a). Regülasyon çalışmalarımız dahilinde yine genin SP1 transkripsiyon faktörü aracılı ifadesinin artmış olduğu ve bu transkripsiyon faktörünün fonksiyonel olarak URG-4/URGCP promotoruna bağlandığı EMSA ve yönlendirilmiş mutagenez çalışmaları ile tespit edilmiştir (Tokay ve Köçkar, 2016b). Yapmış olduğumuz ön çalışmalarda, URG-4/URGCP geninin ifadesi çeşitli hücre hatlarında Ishikawa-(İnsan Endometriyum kanseri), MG-63-(İnsan Kemik karsinoma), Saos-2-(İnsan Kemik karsinoma), PC-3-(İnsan prostat kanseri), DU-145 (İnsan prostat kanseri), Hela (İnsan serviks kanseri), Panc (İnsan Pankreas kanseri) ve MCF-7 (İnsan meme kanseri) mRNA ve protein seviyesinde gösterilmiştir. HT-29 (İnsan Kolon Kanser Hücreleri) hücrelerinde URG-4/URGCP mRNA'sının ekspresyonunun PC-3 (Prostat kanseri) ve DU-145 (Prostat Kanser) hücrelerinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Tokay ve Köçkar, 2015). Protein düzeyinde ise HL-60 (İnsan Lösemi Hücre hattı) hücrelerinden sonra ikinci sırada olduğu tespit edilmiştir. **Bu çalışmada, HT-29 İnsan kolon kanseri hücrelerinde URG-4/URGCP ekspresyonu hem mRNA (RT-PCR) hem de protein seviyesinde (western blot) gösterilmiştir (Şekil 1). Ancak literatürde URG-4/URGCP geni ve kolon kanseri hücreleri ve kolon tümörlü doku sistemlerinde rolünün aydınlatılmasıyla ilgili bir çalışma mevcut değildir.**



Şekil 1. A: URG-4/URGCP ekspresyonunun çeşitli hücre hatlarında gösterilmesi, B: Western blotting yöntemi kullanılarak URG-4/URGCP ifadesinin protein seviyesinde gösterilmesi

Bu kapsamda hedeflerimiz aşağıda sıralandığı gibidir: Proje iş paketlerine ait akış diyagramı Şekil 2’de gösterildiği gibidir.

Birinci iş paketi (İP1) kapsamında;

URG-4/URGCP geninin HT-29 hücrelerinde susturulması amacıyla,

URG-4/URGCP genine spesifik olan siRNA, HT-29 hücrelerine uygulanacaktır. siRNA uygulanmış ve uygulanmamış HT-29 hücrelerinden izole edilen cDNA’lar kullanılarak yine qRT-PCR metoduyla mRNA ve western blotting veya immun floresans (IFC) metodu kullanılarak protein seviyesinde gösterilecektir.

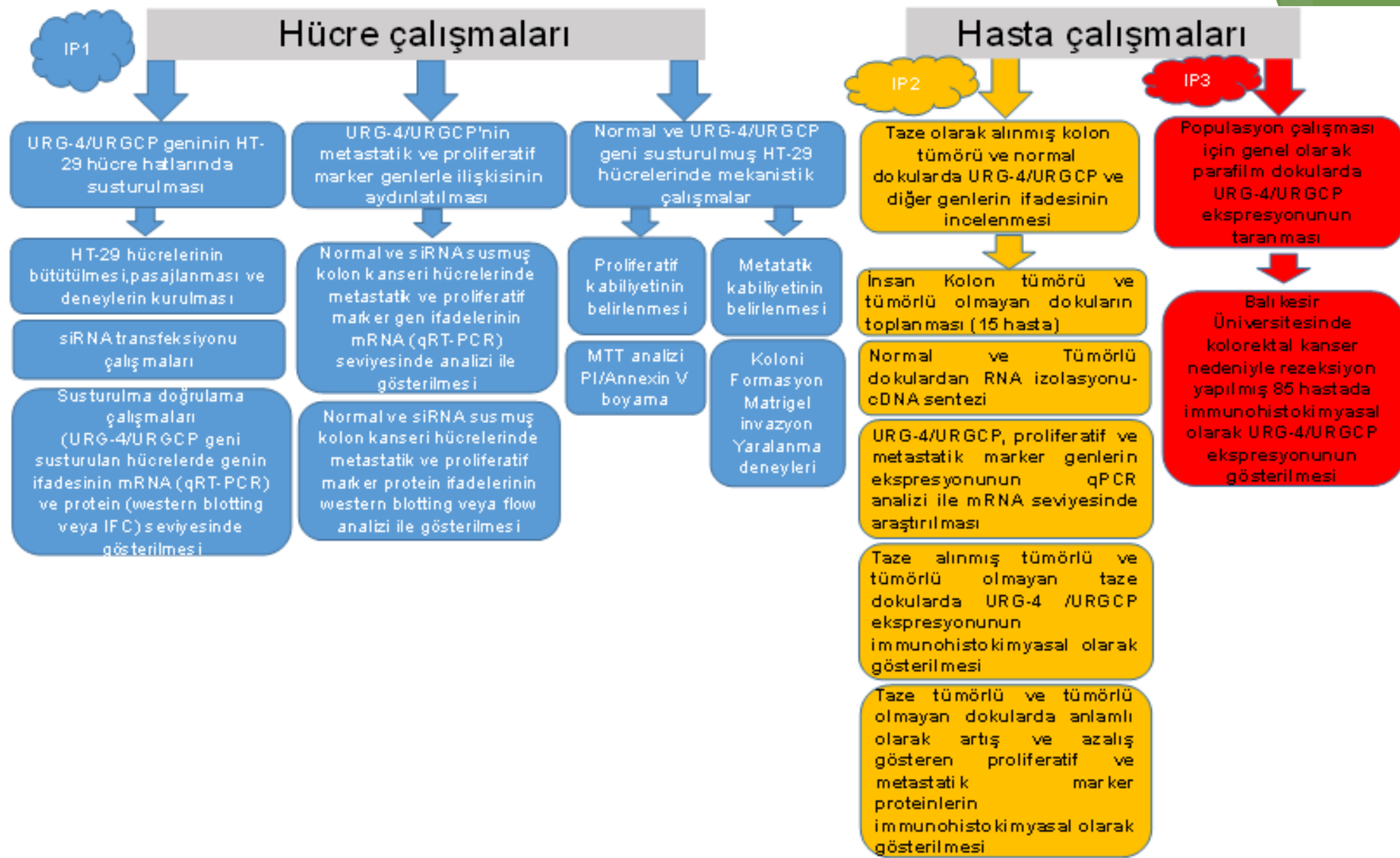
Hedefimiz URG-4/URGCP ifadesinin HT-29 hücrelerinde susturulmasıdır.

URG-4/URGCP’nin metastatik ve proliferatif marker genlerle ilişkisinin aydınlatılması amacıyla,

URG-4/URGCP seviyesini normal olarak ifade eden ve ifadesinin susturulduğu HT-29 hücre cDNA’ları kullanılarak metastatik ve proliferatif marker genlerine ait primerler kullanılarak qRT-PCR çalışmaları yapılacaktır. İfadesinde anlamlı artış ve azalış gösteren genler için western blot veya IFC analizleri yapılarak protein seviyesindeki ifadesi de incelenecektir. Çalışmamızda kullanılacak genler osteopontin, vimentin, E-kaderin, N-kaderin, TSPAN-8, twist, p27 ve şiklin D1 genleridir.

Hedefimiz URG-4/URGCP geninin kolon kanseri hücrelerinde metastaz ve proliferasyonda görevli olan genlerle ilişkisinin aydınlatılmasıdır.

URG-4/URGCP susturulmuş kolon karsinoma hücrelerinin proliferatif kabiliyetinin belirlenmesi amacıyla; URG-4/URGCP seviyesini normal olarak ifade eden ve ifadesinin susturulduğu HT-29 hücreleri kullanılarak, MTT analizi hücre canlılığı tespiti için yapılacaktır. Hücre döngüsü analizleri için Annexin V/propidyum iyodür boyama çalışmaları yapılacak ve sonuçlar flow sitometre ile analiz edilecektir.



Sekil 2. Proje is noktelerine ait akış diyagramı

YÖNTEM

- Projede uygulanacak yöntem ve araştırma teknikleri (veri toplama araçları ve analiz yöntemleri dahil) ilgili literatüre atıf yapılarak açıklanır. Yöntem ve tekniklerin projede öngörülen amaç ve hedeflere ulaşmaya elverişli olduğu ortaya konulur.
- Yöntem bölümünün araştırmanın tasarımını, bağımlı ve bağımsız değişkenleri ve istatistiksel yöntemleri kapsamaması gerekir. Proje önerisinde herhangi bir ön çalışma veya fizibilite yapıldıysa bunların sunulması beklenir. Yöntemlerin iş paketleri ile ilişkilendirilmesi gerekir.

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



İP1 kapsamında HT-29 hücrelerinin açılması, büyütmesi ve dondurulması, siRNA ile susturulma çalışmaları, hücrelerden RNA izolasyonu, hücrelerden cDNA sentezi, qPCR çalışmaları, western blotting, IFC, flow sitometre ve hücresel yöntemler olan MTT, Annexin V /Propidyum iyodür boyama, koloni formasyon, matrigel invazyon, yaralanma metotları uygulanacaktır. Aşağıda başlıklar halinde kullanacağımız yöntemler detaylandırılmıştır.

Hücre stoklarının açılması, büyütülmesi ve dondurulması

Hücreler flask yüzeyini kapladıktan sonra ortam (medyum) içeriği dökülerek 10 mL PBS ile yıkanacaktır. 2-3 mL Trypsin-EDTA eklenerek 5 dk boyunca bekletilecektir. Hücrelerin yüzeyden kalktıkları gözlendikten sonra balon içerisine 6 mL %10 FCS'li DMEM eklenerek Trypsin-EDTA inaktive edilecektir. 15 mL falkona içerik alındı ve 1000 devir/dk'da 5 dk boyunca çöktürülecektir. Hücre pelleti üç adet 75 cm³'likbalona paylaştırmak üzere tekrar ortam ile çözülecektir. Balon hacmi 15 mL'ye ortam ile tamamlanacaktır. Bu pasajlama işleminden sonra hücrelerin pasaj numarası 'pasaj 1' olarak değiştirilecektir. Deneyler genellikle pasaj sayısı 3'e gelmiş hücre grubuyla yapılacaktır. HT-29 hücre hatları -80 derin dondurucudan alındıktan sonra 37°C su banyosunda ılıtılarak eritilecektir. %10 FCS içeren DMEM (high glucose, pyruvate 500ml)+ %1 L-Glutamin eklenerek 15

belirlenerek invazyon kabiliyeti ölçülecektir.

İP2 içerisinde, taze kolon tümörlü doku ve normal dokulardan RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve q-PCR yöntemini içermektedir. Kolon tümörlü dokulardan RNA izolasyonu aşağıda detaylandırılmıştır. Diğer teknikler iş paketi 1'de de olduğu için yukarıda anlatılmıştır.

Kolon tümör doku ve normal dokuların tiplendirilmesi

50 yaş üzeri hastalarda tarama amaçlı yapılan veya karın ağrısı nedeniyle Gastroenteroloji Kliniği ile Genel Cerrahi Kliniği tarafından yapılan kolonoskopi sonrasında kolonda kitle saptanan hastalardan işlem esnasında biyopsi alınacaktır. Biyopsi spesmeninin histopatolojik olarak incelenmesi sonrasında Kolon in-situ karsinom veya invaziv kanser tanısı konulan hastalar çalışmaya dahil edilecektir. Malignite tanısı alan bu hastaların operasyon öncesi tümör markerları ile birlikte gerekli biyokimyasal parametreleri analiz edilerek hastaların kontrastlı tüm batin tomografileri çekilecektir. Hastalar cerrahi açıdan değerlendirildikten tedavi protokolleri planlanacaktır. Bazı hastalara özellikle rektum kanseri tanısı konulmuş hastalara ameliyat öncesi Radyoterapi ve/veya kemoterapi (Neoadjuvan tedavi) alması Onkologlarla hasta değerlendirildikten sonra karar verilmişken bazı hastalar direkt ameliyata alınacaktır. Neoadjuvan kemo-radyoterapisi biten hastalarla birlikte her iki hasta grubuna da palyatif veya küratif cerrahi kararı verilerek preoperatif anestezi yapılacaktır. Anestezisi onaylanan hastalara cerrahi kolon rezeksiyonu yapılacaktır. Kolon rezeksiyonu yapıldıktan sonra patolojik tanı gerçekleştirilecektir.

İmmunohistokimya Yöntemi

IP2 ve IP3 içerisinde, immunohistokimya yöntemi uygulanmaktadır. Bu yöntem aşağıda detaylıca anlatılmıştır.

İmmünhistokimyasal inceleme için kolorektal karsinomlu 85 ayrı olgunun parafin bloklarına aşağıda belirtilen işlemler sırası ile uygulanacaktır. "Poly-L-lysine" ile kaplanmış lam üzerinde 3 mikron kalınlığında kesitler alınacaktır. Fiziksel deparafinizasyon için kesitler bir gece 37 ° C'de etüvde bekletilecektir. Kimyasal deparafinizasyon için 3x10 dk. ksilen + 3x10 dk. % 96'lık alkol uygulanacaktır. Lamlar deiyonize distile su içinde 5 dk bekletilecektir. Endojen enzim blokajı: lamlar % 3'lük H₂O₂ solusyonunda 20 dk. bekletilecektir. Lamlar deiyonize distile su içinde 5 dk. bekletilecektir. Antijen retrieval: sitrat buffer(ph:6) mikrodalga fırında kaynatılacaktır. Sıcak distile su içinde bekletilen lamlar sitrat buffer (ph:6) solusyonuna alınacaktır. Mikrodalga fırında 800 Watt'a şoklanacaktır. İlk kaynama olduğu anda enerji 150-200 watt'a düşürülerek 15 dk. kademeli şoklama yapılacaktır. Süre sonunda enerji kesilecek ve lamlar 30 dk. soğumaya bırakılacaktır. Yıkama (2x5 dk. PBS ile) yapılacak Lamlardaki dokuların etrafı Pap-pen ile çizilecektir. Protein blokajı: 5 dk. Blocking Reagent-ultra v blok ile yapılacaktır.

Primer antikor ile inkübasyon: solusyon lam yüzeyinden uzaklaştırılır. Lamlar primer antikorlar (URG-4/URGCP, vimentin, osteopontin, E-kaderin, N-kaderin, Twist, TSPAN8, p27 ve siklinD1) 37° C'de etüvde, lamin kuruması engellenecek şekilde inkübe edilecek ve Yıkama(2x5 dk. PBS ile) yapılacaktır. Sekonder antikor (linking) ile inkübasyon (20 dk. Biotinylated goat anti-polyvalentlabvision ile). Yıkama(2x5 dk. PBS ile) gerçekleştirilecektir. Streptavidin peroksidaz ile inkübasyon 20 dk. yapılacaktır. Yıkama(2x5 dk. PBS ile) yapılacaktır. Kromojen ile inkübasyon: DAB(Diaminobenzen)kromojen ile 10 dk. Musluk suyundan geçirilecek olan kesitler Mayer's hemotoksilen ile boyanacaktır. (4 dk) Alkolden geçirilen kesitlere Aques Medium ile kapama yapılacaktır.

İmmünreaktivitenin değerlendirilmesi

Bu çalışmada pozitif kontrol için tümöre komşu benign kolon mukozası dikkate alınacaktır. İmmünhistokimyasal olarak URG4, vimentin, osteopontin, E-kaderin, Twist, TSPAN8, p27 ve siklin D1 ekspresyonu ışık mikroskopunda tümör hücrelerinde

PROJE YÖNETİMİ

İP No	İş Paketlerinin Adı ve Hedefleri	Kim(ler) Tarafından Gerçekleştirileceği	Zaman Aralığı (... Ay)	Başarı Ölçütü ve Projenin Başarısına Katkısı
1	Kolon kanser hücrelerinde ve siRNA ile URG-4 geni susturulmuş HT-29 hücrelerinde URG-4 geni ifadesinin mRNA ve protein seviyesinde gösterilmesi	ET,FK,NH		URG-4 geni susmasının mRNA ve protein düzeyinde gösterilmesi %30
1	Normal kolon kanseri hücreleri ve URG-4 geni susturulmuş HT-29 hücrelerinde metastatik ve proliferatif marker genleri üzerine etkisinin mRNA ve protein seviyesinde incelenmesi			mRNA ve protein düzeyinde körele sonuçların elde edilmesi %30
1	Normal kolon kanseri hücreleri ve URG-4 geni susturulmuş HT-29 hücrelerinde URG-4/URGCP geninin metastatik potansiyeli üzerine etkisinin belirlenmesi			Genin susturulmasının hücrelerin metastatik potansiyeline etkilerinin elde edilmesi %10
1	Normal kolon kanseri hücreleri ve URG-4 geni susturulmuş HT-29 hücrelerinde URG-4/URGCP geninin proliferatif potansiyeli üzerine etkisinin belirlenmesi			Genin susturulmasının hücrelerin proliferatif potansiyeline etkilerinin elde edilmesi %10
2	Tümörlü ve tümörlü olmayan taze kolon dokularında URG-4/URGCP ve proliferatif ve metastatik ekspresyonunun mRNA seviyesinde gösterilmesi			mRNA ve protein düzeyinde körele sonuçların elde edilmesi %10
3	Tümörlü ve tümörlü olmayan dokularda ve parafin dokularında, kolon kanseri preparatlarında Immunohistokimya ile protein seviyesinde URG-4/URGCP ifadesinin incelenmesi			Hasta dokularından URG-4/URGCP proteinin ekspresyon seviyesinin tespit edilmesi %10

Projede yer alacak başlıca iş paketleri ve hedefleri, her bir iş paketinin kimler tarafından hangi sürede gerçekleştirileceği, başarı ölçütü ve projenin başarısına katkısı “İş-Zaman Çizelgesi” doldurularak verilir. Her bir iş paketinde görev alacak yürütücü, araştırmacı ve personel ayrıntılı olarak belirtilir. Literatür taraması, sonuç raporu hazırlama aşaması, proje sonuçlarının paylaşımı, makale yazımı ve malzeme alımı ayrı birer iş paketi olarak gösterilmemelidir. Başarı ölçütü olarak her bir iş paketinin hangi kriterleri sağladığında başarılı sayılacağı açıklanır. Başarı ölçütü, ölçülebilir ve izlenebilir nitelikte olacak şekilde nicel veya nitel ölçütlerle (ifade, sayı, yüzde, vb.) belirtilir.

Risk Yönetimi

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 edilir. B planlarının uygulanması projenin temel hedeflerinden sapmaya yol açmamalıdır.

İP No	En Önemli Riskler	Risk Yönetimi (B Planı)

İP No	En Önemli Risk(ler)	B Planı
1	Kolon kanseri hücre modelinin büyütülememesi, ölmesi	ATCC yeni hücre temini
1	siRNA ile URG-4 geninin susturulamaması	Farklı bir firmadan yeni bir siRNA temin edilmesi Farklı bir transfeksiyon kiti kullanılması
1	Metastatik ve proliferatif marker genleri üzerine etkisi mRNA seviyesinde gösterilememesi	Yeni primerlerin tasarlanması, farklı PCR optimizasyonları
1	Protein seviyesinde gösterilememesi	Farklı marka antikorların temin edilmesi, IFC gibi farklı bir protokol uygulanması
2	Dokulardan RNA izolasyonu gerçekleştirilememesi	Farklı Kit kullanılması ya da yöntemin optimize edilip değiştirilmesi
3	İmmunohistokimya ile dokularda URG-4 ifadesinin protein seviyesinde gösterilememesi	Farklı bir firmadan antikor temin edilmesi

Yaygın Etki

- Proje başarıyla gerçekleştirildiği takdirde projeden elde edilmesi öngörülen çıktı(lar) ve etki(ler kısa ve net cümlelerle ilgili bölümde belirtilmelidir.
- Bu bölümde, projeden elde edilmesi öngörülen çıktılara yer verilmelidir. Söz konusu çıktılar, amaçlarına göre belirlenen kategorilere ayrılarak belirtilmeli, nicel gösterge ve hedeflere dayandırılmalı ve varsa bu çıktıları kullanacak kurum/kuruluş(lar)a ilişkin bilgi verilmelidir. Her bir çıktının elde edilmesinin öngörüldüğü zaman aralığı belirtilmelidir.

Çıktı Türü	Çıktı	Çıktının Elde Edilmesi Öngörülen Zaman Aralığı (*)
Bilimsel/Akademik Çıktılar (Bildiri, Makale, Kitap Bölümü, Kitap vb.):	Projelerden elde edilecek verilerden SCI kapsamındaki dergilerde makale hedeflenmektedir. Ayrıca, konuyla ilgili kongre ve sempozyumlarda bildiler sunulacaktır.	
Ekonomik/Ticari/Sosyal Çıktılar (Ürün, Prototip, Patent, Faydalı Model, Üretim İzni, Tescil, Görsel/İşitsel Arşiv, Envanter/Veri Tabanı/Belgeleme Üretimi, Telif Konu Olan Eser, Spin-off/Start- up Şirket vb.):	Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda Kolon kanseri hücreleri ve kolon tümörlü dokularda URG-4 geninin marker olma olasılığı çeşitli terapotik uygulamalarda kullanılarak tedavide umut verici olabilir.	
Araştırmacı Yetiştirilmesine Yönelik Çıktılar (Yüksek Lisans/ Doktora/Tıpta Uzmanlık Tezleri):	Bir bursiyer talebi ile proje bilim insanı yetiştirme potansiyeline sahiptir.	

Proje başarıyla gerçekleştirildiği takdirde projeden elde edilmesi öngörülen

- Toplumsal/kültürel etki,
- Akademik etki,
- Ekonomik etki,
- Ulusal Güvenlik etkisi
- Proje Başvuru Sistemi (PBS)'nde seçilen 11. Kalkınma Planı hedefleri ve politikaları çerçevesinde hedef kitle/alan belirtilerek açıklanmalıdır. Beklenen etkiler doğrulanabilir ve ölçülebilir olmalıdır. Etkilerin elde edilme zamanına ilişkin öngörüler belirtilmelidir.

Etki Türü	Etki	Etkinin Elde Edilmesi Öngörülen Zaman
Toplumsal/Kültürel Etki: - Yaşam Kalitesine Katkı, - Sürdürülebilir Çevre ve Enerjiye Katkı, - Refah veya Eğitim Seviyesinin İyileştirilmesine Katkı, - Ülke ya da Dünya Düzeyinde Önemli Bir Sosyal Soruna Getirilecek Çözümler vb.		
Akademik Etki: - Yeni Ar-Ge Kararları, - Ulusal/Uluslararası Ar-Ge İşbirlikleri, - Araştırmacı Sayısındaki ve Niteliğindeki Değişim, - Üniversite- Sanayi İşbirliklerine Katkı vb.	Ulusal-Uluslararası Arge işbirlikleri Üniversite Sanayi işbirliklerine katkı	
Ekonomik Etki: - Potansiyel Sektörel Uygulama Alanları, - Küresel Pazar Öngörülleri, - İstihdam Katkısı, - Rekabetçilik (İhracata Etkisi, İthal İkamesi, Yeni Firmaların Oluşumu, Yabancı Sermaye Yatırımının Tetiklenmesi vb.)		
Ulusal Güvenlik Etkisi: - Siber güvenlik, - Enerji güvenliği, - Sınır güvenliği, - Ekonomik güvenlik vb.		

Belirtmek istediğiniz diğer Konular

- Sadece proje önerisinin değerlendirilmesine katkı sağlayabilecek bilgi/veri (grafik, tablo, vb.) eklenebilir.

Proje Önerisi Değerlendirme Kriteri

Proje önerileri aşağıda belirtilen beş boyut altında değerlendirilir:

- ▶ Önem ve Özgün Değer
- ▶ Amaç ve Hedefler
- ▶ Yöntem
- ▶ Proje Yönetimi
- ▶ Yaygın Etki

ÖNEM VE ÖZGÜN DEĞER

- Proje konusunun önemi, literatürdeki nitel veya nicel verilerle desteklenerek ayrıntılı bir şekilde açıklanmış mıdır?
- Proje önerisinin özgünlüğü; bilimsel niteliği, farklılığı ve yeniliği, alandaki hangi eksikliği nasıl gidereceği veya hangi soruna nasıl bir çözüm getireceği, ilgili bilim ve teknoloji alanlarına kavramsal, kuramsal veya metodolojik olarak ne gibi özgün katkılarda bulunacağı yeterince açıklanmış mıdır?

AMAÇ VE HEDEFLER

- Proje önerisinin araştırma sorusu veya hipotezi verilmiş midir? Amacı ve hedefi açık, ölçülebilir, gerçekçi ve proje süresince ulaşılabilir nitelikte olacak şekilde tanımlanmış mıdır?

Yöntem

- Projede uygulanacak yöntem ve araştırma teknikleri (veri toplama araçları ve analiz yöntemleri dahil) ilgili literatüre atıf yapılarak açıklanmış mıdır? Sunulan yöntem(ler) öngörülen amaçlara ve hedeflere ulaşmaya ne kadar uygundur? Yöntem bölümü; araştırmanın tasarımını, bağımlı ve bağımsız değişkenleri ile istatistiksel yöntemlerini kapsayacak şekilde açık ve tutarlı bir şekilde sunulmuş mudur?

4.PROJE YÖNETİMİ

Yönetim Düzeni: İş-zaman çizelgesinde belirtilen; iş paketleri ve hedefleri, her bir iş paketinin kim(ler) tarafından ve hangi sürede gerçekleştirileceği proje amaç ve hedeflerine ulaşmak için uygun mudur?

- Proje ekibi, projenin kapsadığı faaliyet ve disiplin(ler) dikkate alındığında nitelik ve nicelik yönünden ne ölçüde yeterli ve uygundur? Görev dağılımı ve iş paketleri ile kişilerin yetkinlikleri uyumlu mudur?
- Başarı ölçütleri ne düzeyde ölçülebilir ve izlenebilirdir?

Risk Yönetimi: Projenin başarısını olumsuz yönde etkileyebilecek risklerle karşılaşıldığında projenin başarıyla yürütülmesini sağlamak için alınacak tedbirler (B Planı) ilgili iş paketleri belirtilerek verilmiş midir?

YAYGIN ETKİ

- Projeden beklenen yaygın etkilerin neler olabileceği net olarak belirtilmiş midir? İfade edilen yaygın etkiye ulaşılabilme potansiyeli ne düzeydedir?

Kriteri Karşılama Düzeyi	Puan Değeri	Tanım
İyi	6	Proje önerisi ilgili kriteri tüm boyutlarıyla karşılamaktadır. Eksiklik yok denecek kadar azdır.
	5	Proje önerisi ilgili kriteri iyi derecede karşılamaktadır. Önerinin kabul edilebilir seviyede eksiklikleri bulunmaktadır.
Geliştirilebilir	4	Proje önerisi ilgili kriteri genel hatlarıyla karşılamakla birlikte, önerinin iyileştirme ve geliştirmeye açık noktaları bulunmaktadır.
	3	Proje önerisi, ilgili kriteri orta derecede karşılamaktadır. Öneride iyileştirilmesi ve geliştirilmesi gereken önemli hususlar bulunmaktadır.
Yetersiz	2	Proje önerisi ilgili kriteri yeterli derecede karşılamamaktadır. Öneride önemli eksiklikler bulunmaktadır.
	1	Proje önerisi ilgili kriteri karşılamamaktadır. Proje önerisinde ciddi eksiklikler/zayıflıklar söz konusudur.

Elektronik İmza

- Araştırma Destek Programları Başkanlığı tarafından yürütölmekte olan programlar kapsamında 07.01.2019 tarihi itibarıyla elektronik imza (e-imza) uygulamasına geçilmiş olduğundan ve bundan böyle yapılacak proje başvurularında basılı belge gönderilmesi süreci tamamen yürürlükten kaldırıldığından projelerin; proje ekibindeki tüm kişiler (yürütücü, araştırmacılar ve danışmanlar), proje ekibi dışındaki hak sahipleri ve projeyi öneren/katılımcı kurum/kuruluş yetkililer tarafından e-imza dosya imzalama servisi (e-imza.tubitak.gov.tr) üzerinden nitelikli elektronik sertifika ile imzalanması gerekmektedir.

- Başvuruyu onayladıktan sonra Elektronik imza sürecini başlat butonundan bu süreç başlatılır.

ARDEB PBS
Proje Başvuru Sistemi

Başvurularım (0) Yeni Destek Başvurusu E-İmza Süreci ARDEB Proje Görevlerim Değerlendirme Sistemi Kuruluş Yetkilisi

Aktif Başvurularım

Proje başvuru kaydı bulunmamaktadır.

Önceki Başvurularım

Proje İdi:
Program Adı: 1002 - Hızlı Destek Programı
Çağrı Adı: 1002
Proje Başlığı:
Proje Yöneticisi/Yürütücüsünün Adı Soyadı ve Ünvanı:
Başvuru Tarihi:
Başvuru Onay Tarihi:
Proje Dosyaları:

Dosyaları Göster
Elektronik Başvuru Çıktısını İndir
Başvuru Onayını Kaldır
Elektronik İmza Sürecini Başlat

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Mali hakları saklıdır. © 2013