

ÖZET

TRANSKRİPSİYON İNFİDELİTESİ, TESPİT EDİLMESİ VE KULLANIMLARI

Bu buluş hücrelerde transkripsiyon infidelitesi (sadakatsızlığı) için özgün bir mekanizmanın tanımlanması ile ilgilidir. Bu buluş bir örnek içerisindeki transkripsiyon infidelitesinin seviyesinin belirlenmesi için kompozisyonlar ve yöntemlerin yanı sıra bunların örnek olarak terapötik, tanısal, farmakogenomik veya ilaç dizaynı için kullanımlarını da sunmaktadır. Açıklanacağı üzere, bu buluş özellikle hastalıkların (örneğin olarak proliferatif hücre hastalıkları gibi) belirlenmesi, izlenmesi veya tedavi edilmesi için, ilaçların dizayn edilmesi ve/veya taranması için, hasta veya hastalık profilinin çıkarılması, hastalığın derecesinin tahmin edilmesi ve ilaç etkisinin değerlendirilmesi için uygundur.

İSTEMLER

1. Bir memeli oznedeki bir kansere yatkınlığın veya aşamasının belirlenmesi için bir yöntem olup, bu yöntem *in vitro* veya *ex vivo* olarak;
 - a) bahsedilen ozneden alınan bir ornekteki nukleotid molekulleri içerisindeki bir veya daha fazla dizilim varyasyonunun varlığının veya oranının değerlendirilmesini içermektedir; bahsedilen varyasyon(lar) nukleotid baz sılmeleri (boşluklar), yerleştirmeler ve baz ailesi değişimlerinden seçilmektedir; ve/veya
 - b) a) adımındaki dizilim varyasyonlarından kaynaklanan bir veya daha fazla protein modifikasyonunun varlığının veya oranının değerlendirilmesini içermektedir;
- 5 bahsedilen dizilim varyasyonları RNA ana transkripti içerisine DNA'nın transkripsiyon infidelitesi (TI) vasıtası ile RNA'ya transkripsiyonu esnasında sokulmaktadır ve dizilim varyasyonları ve/veya protein modifikasyonlarının bahsedilen varlığı veya oranı bahsedilen oznede bir kansere yatkınlığın veya aşamasının bir göstergesidir.
- 10 2. Bir anti-kanser ilacının taranması, belirlenmesi veya optimize edilmesi için bir yöntem olup, bu yöntem bahsedilen ilacın İstem 1'de tanımlandığı gibi dizilim varyasyon(lar)ının ve/veya protein modifikasyon(lar)ının oranını değiştirip değıştirmedığının değerlendirilmesi adımını içermektedir.
- 15 3. Bir memeli geninin *in vitro* olarak modifiye edilmesi için bir yöntem olup, bu yöntem İstem 1'de tanımlandığı gibi transkripsiyon infidelitesinin varlığının veya oranının azaltılması için genin diziliminin modifiye edilmesini içermektedir.
- 20 4. Bir anti-kanser ilacı veya ilaç adayının etkisinin değerlendirilmesi için bir yöntem olup, bu yöntem bahsedilen ilacın İstem 1'de tanımlandığı gibi dizilim varyasyonlarının ve/veya protein modifikasyonlarının oranını değiştirip değıştirmedığının değerlendirilmesi adımını içermektedir ve bu tür bir değışiklik ilacın etkisinin bir göstergesidir.
- 25 5. Baz ailesi değışiklik(ler)inin A→C, T→G, G→T, A→T, A→U, G→C, G→U, T→A, C→A, ve C→G'den, tercihen A→C ve T→G'den seçildiğı, İstemler 1 ila 4'ten herhangi birine göre yöntem.
- 30 6. Transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan dizilim varyasyonlarının ve/veya protein modifikasyonlarının varlığı veya oranının en az bir spesifik ligand kullanılarak değerlendirildiğı, İstemler 1 ila 5'ten herhangi birine göre yöntem.

7. Kanser biyo-işaretleyicilerinin (biyo-markerlerinin) tanımlanması için bir yöntem olup, bu yöntem bir kansere sahip bir öznenen alınan bir örnekte İstem 1’de tanımlandığı gibi bir hedef protein veya RNA içerisinde TI tarafından oluşturulan dizilim varyasyonlarının ve/veya protein modifikasyonların varlığının tanımlanmasını ve tercihe bağlı olarak bahsedilen dizilim varyasyonlarının ve/veya protein modifikasyonlarının dizilimlerinin belirlenmesini içermektedir ve bahsedilen dizilim varyasyonları ve/veya protein modifikasyonlarına sahip bahsedilen protein veya RNA’lar bir biyo-işaretleyici olmaktadır.
8. Proteinin bir hücre yüzey proteinini veya salgılanmış bir protein olduğu, tercihen bir plazma proteinini veya bir reseptör olduğu, İstemler 1 ile 7’den herhangi birine göre yöntem veya kullanım.
9. Proteinin SEQ ID NO:1-32’den seçilmiş bir peptid dizilimi içerdiği, İstemler 1 ile 8’den herhangi birine göre yöntem veya kullanım.
10. Dizilim varyasyonunun aşağıdaki;
- A’nın ikamesinin tercihen A’dan önce veya sonra C olduğunda gerçekleşmesi,
 - T’nin ikamesinin tercihen T’den önce veya sonra G olduğunda gerçekleşmesi,
 - C’nin ikamesinin tercihen C’den önce veya sonra G veya A olduğunda gerçekleşmesi, ve
 - G’nin ikamesinin tercihen G’den önce veya sonra A olduğunda gerçekleşmesi,
- kurallarını takip ettiği, İstemler 1 ile 9’dan herhangi birine göre yöntem veya kullanım.
11. Kanserin göğüs veya kolon kanseri olduğu, İstemler 1 ile 10’dan herhangi birine göre yöntem veya kullanım.
12. Bir memeli öznenen bir kansere yatkınlığının, varlığının veya aşamasının belirlenmesi için İstem 1’e göre bir yöntem olup, bu yöntem in vitro veya ex vivo olarak;
- a) bahsedilen öznenen alınan bir örnekteki nükleotid molekülleri içerisindeki bir veya daha fazla dizilim varyasyonunun varlığının veya oranının değerlendirilmesini içermektedir; bahsedilen varyasyon(lar) A→C ve T→G nükleotid baz değişikliklerinden seçilmektedir; ve/veya
- b) a) adımındaki dizilim varyasyonlarından kaynaklanan bir veya daha fazla protein modifikasyonunun varlığının veya oranının değerlendirilmesini içermektedir;
- bahsedilen dizilim varyasyonları RNA ana transkripti içerisine DNA’nın transkripsiyon infidelitesi (TI) vasıtası ile RNA’ya transkripsiyonu esnasında

sokulmaktadır ve dızılım varyasyonları ve/veya protein modifikasyonlarının bahsedilen varlığı veya oranı bahsedilen oznede bir kansere yatkınlığın, varlığının veya aşamasının bir gostergesıdır.

5

Uğur G.YALÇINER

YALÇINER PATENT

VE DANIŞMANLIK LTD. ŞTİ.

TEL: (0312) 468 35 04 ANKARA

Katıncıdere VD 932 007 8400

10

12.05.2012

15

20

25

30

TRANSKRİPSİYON İNFİDELİTESİ, TESPİT EDİLMESİ VE KULLANIMLARI

Teknik Alan

Bu buluş hücrelerde transkripsiyon infidelitesi (sadakatsızlığı) için özgün bir mekanizmanın tanımlanması ile ilgilidir. Bu buluş bir örnek içerisindeki transkripsiyon infidelitesinin seviyesinin belirlenmesi için kompozisyonlar ve yöntemlerin yanı sıra bunların örnek olarak terapötik, tanısal, farmakogenomik veya ilaç dizaynı için kullanımlarını da sunmaktadır. Açıklanacağı üzere, bu buluş özellikle hastalıkların (örnek olarak proliferatif hücre hastalıkları gibi) belirlenmesi, izlenmesi veya tedavi edilmesi için, ilaçların dizayn edilmesi ve/veya taranması için, hasta veya hastalık profilinin çıkarılması, hastalığın derecesinin tahmin edilmesi ve ilaç etkisinin değerlendirilmesi için uygundur.

Önceki Teknik

Nükleik asit DNA ve RNA hücre çekirdeğinde genomik bilgilerin depolanması (DNA) ve protein üretmek için habercı RNA üreten ve transkripsiyon olarak adlandırılan işlemin ardından genomik bilgilerin sitoplazma içersine transfer edilmesi işlevini sağlayan makro-moleküllerdir. Her ikisi de nükleotidler olarak adlandırılan monomerlerden oluşan doğrusal polimerlerdir. DNA ve RNA'nın her biri dört tip nükleotidin kombinasyonlarını temsil etmektedir. Tüm nükleotidler ortak bir yapıya sahiptir: bir fosfodiester tarafından organik bir baza bağlı olan bir pentoza bağlanmış olan bir fosfat grubu: DNA için adenin, sitosiz, timin ve guanin (A, C, T, G) ve RNA için adenin, sitosin, urasil ve guanin (A, C, U, G). RNA içerisinde pentoz ribozdur ve DNA içerisinde ise deoksiribozdur. DNA molekulu bir çift helis olarak düzenlenmiş çift kollu düzenli nükleotidler olarak organize edilmişlerdir. RNA molekülleri ana olarak 4 tip molekul veren tek kollu polinükleotidlerdir: 1) DNA'dan kopyalanmış ve sitoplazma içerisinde proteinlere dönüştürülmüş tek kollu nükleotidler olan habercı RNA (mRNA), 2) iyi tanımlanmış 3 boyutlu bir yapıyı benimsemiş olan ve dönüşüm adı verilen bir süreç içerisinde spesifik AA sekansları (dizileri) ile protein oluşturmak üzere polipeptid zincirlerine transfer edilmiş spesifik amino asitlere (AA) bağlanan transfer RNA (tRNA), 3) mRNA üzerinde belirli bir sırada mevcut olan kodonlar (bir kodon = 3 nükleotid) tarafından belirlenen sekans aracılığı ile sağlanan bilgiyi muteakip AA'nın proteine çevrilmesine olanak veren bir yapı olan ribozomu oluşturan spesifik proteinler ile birlikte daha büyük moleküller olan ribozomal RNA (rRNA) ve 4) kodlama yapmayan RNA olarak adlandırılan kısa düzenlemeli RNA (ncRNA).

mRNA sekansı daha sonra donuşum olarak adlandırılan bir sureç ile farklı bir dile, yani AA diline donuşturulmaktadır.

5 Burada ilk defa transkripsiyon fidelitesinin (bağlılığının), yani DNA bilgısının mRNA ıçerisine transferinin, patolojik hucrelerde, ozellikle kanser hucrelerinde dramatik olarak duştuğunu goştermekteyiz. Kanser hucrelerinde transkripsiyon fidelitesinin bu eksikliği, mevcut veritabanlarında bulunan transkriptlerin çoğunluğunun yanı sıra rapor edilen 10 orneklerde test edilen genlerin çoğunu ve tum kanserleri etkileyen genel bir olgudur ve çok sayıda acil ve onemli sonuçları bulunmaktadır. Ozellikle transkripsiyon infidelitesinin keşfedilmesi patolojik vakaların incelenmesi için mevcut durumda kullanılan proteomik ve transkriptomik yaklaşımların iyileştirilmesine olanak sağlamaktadır. Transkripsiyon infidelitesinin keşfi ayrıca şiddetleri ağısından hastalıkların daha iyi sınıflandırılmasına da 15 olanak sağlamakta, terapötik etkinin tahmin edilmesini iyileştirmekte ve transkripsiyon fidelitesinin eksikliğini veya modifikasyonunu duzeltebilme kabiliyetleri ağısından ilaçların etkisinin izlenmesi için özgun yontemlerin dizayn edilmesine de olanak sağlamaktadır. Bu buluş bu nedenle hastaların tedavi edilmesi, tespit edilmesi ve izlenmesi ve ilaç etkisinin yanı sıra tanılama ve ilaç geliştirme için buyuk sonuçlara (implikasyonlara) ve faydalara sahiptir.

20

Aşağıda açıklanan keşfin etkisinin anlaşılması için mevcut durumda normal hucre işlevi için DNA'nın RNA'ya transkripsiyonu esnasında mutlak fidelitenin gerekli olduğuna inanıldığının kavranması onemlidir. Ancak, mevcut durumda onemli ve çozulmemiş bir husus devam etmektedir. Aslında, insan genomunun sıralanması ve açıklanması 25 (numaralandırılması) 30-40 bin genin kodlanmış olduğu (şıfrelendiği) fikrine sebep olmuştur. Bu tahmin proteomik yontemler tarafından tanımlanabilen proteinlerin mevcut sayısının çok altında kalmaktadır: 300 bin'e yakın protein tanımlanmıştır. Bu farklılığın bağdaştırılması için, alternatif ekleme (splays) adı verilen bir süreç vasıtası ile tek bir genin farklı proteinleri kodlayan çeşitli farklı mRNA'lar uretebileceği onerilmektedir. 30 Alternatif ekleme habercı-oncesi RNA (pmRNA)'nın farklı kısımlarını uzaklaştırmakta, bu sayede spesifik intronlara karşılık gelen farklı elementlerin uzaklaştırılmasına sebep olmakta ve farklı olgun mRNA'lar uretmektedir. RefSeq veri tabanının analizi 6946 gene karşılık gelen 11259 transkript iğerdiğini belirtmektedir. Bu nedenle, alternatif ekleme transkriptlerin heterojenliğini %76 arttırabilmektedir. Burada ağıkladığımız mekanizma

alternatif eklemekten farklıdır ve çok daha büyük protein heterojenliği meydana getirmektedir. Aslında, kodlanmış AA içerisinde değişiklikler ile sonuçlanan mRNA sekansının rasgele-olmayan modifikasyonlarının ortaya çıkışını, daha kısa protein izoformları veren premature stop kodonlarının sunulmasını, uzatılmış protein izoformları veren özgün kodon sekanslarının sunulduğunu belirten doğal stop kodonlarındaki değişimi göstermekteyiz. Aralık ve araya sokmanın yapılması mRNA okuma çerçevesini modifiye etmekte ve bu sayede şüphelenilmeyen protein sekansları yaratmaktadır. Bu buluşta açıklanan veriler bu transkripsiyon infidelitesi olgusunun normal hücrelerde mevcut olduğunu, ancak kanser-türevi hücreler gibi patolojik hücrelerde dramatik olarak geliştiğini göstermektedir. Bu nedenle transkripsiyon infidelitesinin (TI) DNA'dan RNA'ya transfer edilen bilgilerin farklılaşmasına (diversifikasyonuna) katkıda bulunduğu önerilmektedir. Sonuçlarımız transkripsiyon infidelitesinin rasgele ortaya çıkmadığını ancak bO'yu, yani TI olayı tarafından etkilenen bazıları, sara şartların önemli olduğu spesifik kuralları takip etmektedir.

Alzheimer hastalığı gibi nörodegeneratif hastalıklara sahip deneklerde moleküler yanlış okumanın bir gözlemi yapılmıştır (Hoi Elly M ve diğerleri: J. Biol. Chem., vol. 278, no. 41, 10 Ekim 2003, sayfa 39637-39643; Laxminarayana Dama ve diğerleri: International Immunology, vol. 12, no. 11, Kasım 2000, sayfa 1521-1529; Fischer David F ve diğerleri: FASEB Journal, vol. 17, no. 14, Kasım 2003, sayfa 2014-2024; Van Den Hurk Wilhelmına H ve diğerleri: J. Biol. Chem., vol. 276, no. 15, 13 Nisan 2001, sayfa 11496-11498 ; Gerez L ve diğerleri: Neurobiology Of Aging, Tarrytown, Ny, Us LnkD-Doi:10.1016/J.Neurobiolaging 2004.03.011, vol. 26, no. 2, 1 Şubat 2005, sayfa 145-155; WO01/40804). Bu referanslarda hiçbir mekanizma karakterize edilmemiştir.

RNA heterojenliğinin genomik değil RNA seviyesinde ortaya çıkmasının açıklanması için diğer bir mekanizma tasavvur edilebilir: RNA düzenleme. Ancak RNA düzenleme iki tip TI olayını açıklayamamaktadır, aralık ve araya sokmanın sunulması. RNA düzenleme okaryot içerisindeki mRNA ve tRNA'daki post-transkripsiyonel bazı değişimleri ile karakterize edilmektedir. Bilinen ikame düzenleme olaylarının büyük bir çoğunluğu C'den U'ya veya A'dan I'ya (G olarak okuyun) dönüşümleri içermektedir (Gott, J. M. & Emeson, R. B. (2000) Annu Rev Genet 34, 499-531 - Maas, S. & Rich, A. (2000) Bioessays 22, 790-802. - Niswender, C. M. (1998) Cell Mol Life Sci 54, 946-64). Ayrıca bakınız Klimek-Tomzak ve diğerleri, British J. of Cancer vol.94, 10 (2006) sayfa 586-

592); Cappione ve diğeri, AJHG vol. 60,2 (1997) sayfa 305-312; veya Maas ve diğeri, PNAS vol. 98,25 (2001) sayfa 14687-14692). Farklı çalışmalar bu dönüşümlerin adenosin ve sitidin deaminleri tarafından katalize edilen deaminasyon mekanizmaları tarafından açığa çıktığını göstermektedir. Diğer bir ikame düzenleme olayı ise "U'dan C'ye" dönüşumdur. Mikroskobik tersine çevrilebilirlik teorisi sitidin deaminaz reaksiyonunun bu dönüşümü oluşturmak üzere geriye gidebileceğini söylerken, bir CTP sentetaz-tipi aktivitenin bundan sorumlu olabileceğini de önermektedir. Çeşitli örneklerde RNA düzenlemenin normal hücrelere karşı kanser hücrelerine spesifik olabileceği gösterilmiştir. İlaveten, bu olgunun oranı kanser koşullarında etkilenebilmektedir.

Kanser setinde cDNA seviyesinde %5.7 C->T, %9.2 T->C ve %4.7 A->G değişiklikleri gözlenmiştir. Bu nedenle mRNA düzenlemesi burada açıklanan tek baz ikamelerinin %20'sinden fazlasından sorumlu olamaz. Aslen, en yaygın baz ikameleri: A-> C (%24.6) ve T-> G (%16.8) bilinen insan enzimatik RNA düzenleme süreçleri ile halihazırda açıklanmayan baz ailesi değişikliklerini temsil etmektedir.

İlaveten, transkripsiyon infidelitesinin mRNA düzenlemeden farklı bir mekanizma (veya mekanizmalar) vasıtası ile baz silinmelerine ve/veya yerleştirmelerine neden olması beklenmektedir. Ayrıca, son zamanlarda yapılan bir çalışma dbSNP kayıtlarının (Tek Nukleotid Polimorfizm veri tabanı) sayısının aslında düzenleme alanları olduğunu göstermektedir (Eisenberg, E. ve diğeri (2005) Nucleic Acids Res. 33 (14), 4612-7). Bizim yaklaşımımızda dbSNP'deki tüm SNP'ler göz önüne alınmamaktadır, bu nedenle bilinen SNP'ler veya düzenleme alanlarına karşılık gelen yanlış SNP'ler hariç tutulmaktadır.

Bu nedenle, gözlemlenen kanser mRNA heterojenliğini açıklayan mekanizma transkripsiyon infidelitesidir.

Buluşun Kısa Açıklaması

Bu buluş hücrelerde ve özellikle memeli hücrelerindeki transkripsiyon infidelitesini kullanmak, belirlemek veya değiştirmek için kompozisyonlar ve yöntemler ile ilgilidir. Bu buluş örnek olarak artan veya azalan transkripsiyon infidelitesi ile ilişkili olan veya bundan kaynaklanan hastalıkların teşhis edilmesi ve/veya tedavisi için terapötik ve tanılama amaçları için özellikle uygundur.

Bu buluşun spesifik bir amacı bir vakada kanserin varlığının veya aşamasının belirlenmesi için bir yöntem ile ilgilidir, bu yöntem bahsedilen vakadan alınan bir ornekte transkripsiyon infidelitesinin varlığının veya oranının (*in vitro* veya *ex vitro*) değerlendirilmesini içermektedir, bahsedilen varlık veya oran bahsedilen vakada kanserin varlığının veya aşamasının bir belirtecidir.

Bu buluşun diğer bir amacı bir ilacın taranması, belirlenmesi veya optimize edilmesi için bir yöntemdir, bu yöntem bahsedilen ilacın bir genin transkripsiyon infidelite oranını değiştirip değiştirmediğinin (örnek olarak arttırması veya azaltması) değerlendirilmesi adımını içermektedir.

Bu buluşun bir diğer amacı bir insan veya hayvanın, özellikle kanserlerin tedavi edilmesi için bir yöntem içerisinde kullanılmak üzere farmasötik bir kompozisyonun üretilmesi için bir memeli geninin transkripsiyon infidelite oranını değiştiren (örnek olarak arttıran veya azaltan) bir bileşiğin kullanımı ile ilgilidir.

Bu buluşun diğer bir amacı bir ilaç veya aday ilacın etkisinin değerlendirilmesi için bir yöntem ile ilgilidir, bu yöntem bahsedilen ilacın bir memeli geninin transkripsiyon infidelite oranını değiştirip değiştirmediğinin (örnek olarak arttırdığının veya azalttığının) değerlendirilmesi adımını içermektedir, bu tür bir değişiklik ilaç etkisinin bir belirtecidir.

Bu buluş ayrıca bir örnek içerisindeki transkripsiyon infidelitesinin (seviyesinin) belirlenmesi veya ölçülmesi için yöntemler, ürünler (problar, primerler, antikorlar veya bunların türevleri gibi) ve bunlara karşılık gelen kitleleri de sunmaktadır.

Bu buluş ilaveten proteinler veya nükleik asitler içerisindeki transkripsiyon infidelite sekanslarının tanımlanması için ve bunların örnek olarak işaretleyiciler, immünojenler olarak ve/veya bunların spesifik ligandlarının üretilmesi için kullanımı için yöntemler de sunmaktadır.

Bu bağlamda, bu buluş kanser biyo-ışaretleyicilerinin tanımlanması için bir yöntem ile ilgilidir ve bu yöntem bir özünden alınan bir ornekte bir hedef protein veya nükleik asit içerisindeki transkripsiyon infidelite alan(lar)ının tanımlanmasını ve tercihe bağlı olarak

bahsedilen transkripsiyon infidelite alan(lar)ının diziliminin belirlenmesini içermektedir. Belirli ve tercih edilen bir uygulamada, hedef protein bir hucre yuzeyi proteini veya salgılanmış bir proteindir, özellikle bir hucre yuzeyi proteini veya bir plazma proteindir.

- 5 Bu buluş ayrıca bir özellik veya patolojik duruma özel bir lıgandın tanımlanması ve/veya uretilmesi için bir yontemı de açıklamaktadır, bu yontem bahsedilen özellik veya patolojik duruma sahip bir oznedenden alınan ornekte bir veya daha fazla hedef protein veya nukleik asit içersinde en az bir transkripsiyon infidelite alanının varlığının tanımlanmasını, tercihe bağlı olarak bahsedilen en az bir adet transkripsiyon infidelite alanının diziliminin belirlenmesini ve transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan bahsedilen en az bir protein (veya alan) veya nukleik aside spesifik olarak bağlanan bir lıgandın uretilmesini içermektedir.

- 15 Bu buluş özellikle kanser biyo-işaretleyicilerinin tanımlanması için uygundur. Memeli oznelerde bu tür rahatsızlıklara özel lıgandların, özellikle bir oznedeki bir hucre proliferatif rahatsızlığın varlığını veya seviyesini belirleyebilen lıgandların uretilmesi için özellikle uygundur.

- 20 Bu buluş ayrıca spesifik olarak transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan bir protein (veya alan) veya nukleik aside bağlanan bir lıgandı açıklamaktadır. Bu lıgand spesifik olarak transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan bir proteine (veya alana) bağlanan bir antikör (veya daha sonra açıklanacağı gibi herhangi bir kısmı (Fab, Fab', CDR vb. gibi) veya türevi) olabilir. Bu lıgand ayrıca spesifik olarak transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulmuş bir nukleik aside bağlanan bir nukleik asit de (örnek olarak prob, primer, RNAı (gırışım RNA'sı) vb.) olabilir.

- 30 Bu buluş ilaveten transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan bir proteinin, özellikle bir memeli proteinin ve daha çok tercih edilen halıyle bir insan proteinin bir alanını içeren bir peptidi açıklamaktadır. Bu peptid tıpkı olarak sentetik bir peptiddir: yani örnek olarak kimyasal sentez, amino asit sentezi ve/veya uzatması, protein sindırımı, peptid birleştirme, rekombınant ekspresyon vb. gibi yontemlerle yapay olarak hazırlanmış bir peptiddir. Bu peptid tıpkı olarak bahsedilen proteinin bir C-terminal kısmının dizilimini (sekansını) içermektedir. Peptid tercihen 100, 80, 75, 70, 65, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25 ve hatta 20'nin altında amino asit içermektedir (ancak diğer

uygulamalarda, peptid uzunluğu daha fazla olabilir). Protein bir hücre yüzeyi proteini (örnek olarak bir reseptör vb.), salgılanmış bir protein (örnek olarak bir plazma proteini vb.) veya bir hücre içi proteini olabilir.

- 5 Bu buluşta ayrıca yukarıda tanımlandığı gibi transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan bir peptidin bir immunojen olarak kullanımı da açıklanmaktadır. Bu buluş ayrıca yukarıda tanımlandığı gibi transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulmuş bir proteinin bir parçasını içeren bir peptidi ve tercihe bağlı olarak uygun bir taşıyıcı, eksipiyen ve/veya adjuvanı içeren bir aşı kompozisyonunu da açıklamaktadır.

10

Bu buluş içerisinde ilaveten bir antikorun üretilmesi için bir yöntem de açıklanmaktadır, bu yöntem insan olmayan bir memelinin yukarıda tanımlandığı gibi transkripsiyon infidelitesi ile oluşturulmuş bir peptid ile immunize edilmesini ve bahsedilen peptide bağlanan antikorların veya karşılık gelen antikor-üreten hücrelerin geri toplanmasını içermektedir. Tercihe bağlı olarak antikorun türevleri de üretilebilir.

15

Spesifik bir uygulamada, bu buluş bir antikor üretimi için bir yöntemi açıklamaktadır, bu yöntem (i) transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulmuş bir protein alanının tanımlanmasını ve (ii) bahsedilen alana spesifik olarak bağlanan bir antikorun üretilmesini içermektedir. Tercihe bağlı olarak, antikorun türevleri de üretilebilir.

20

Bu buluşta ayrıca transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan bir proteinin bir parçasına spesifik olarak bağlanan bir antikor veya büyük oranda aynı antijen özelliğine sahip bu tür bir antikorun bir türevi de açıklanmaktadır. Antikor poliklonal veya monoklonal olabilir. Türevi terimi herhangi bir kısmını (Fab, Fab', CDR, vb. gibi) veya tek zincirli antikorlar, bi-fonksiyonel antikorlar, insanlaştırılmış antikorlar, insan antikorları, kimerik antikorlar vb. gibi diğer türevleri içermektedir.

25

Bu buluşun diğer bir açıklaması yukarıda açıklandığı gibi bir moleküle konjuge olmuş (bağlanmış) bir antikor veya bunun bir türevi ile ilgilidir. Molekül bir ilaç, bir etiket, toksik bir molekül, bir radyoizotop vb. olabilir.

30

Bu buluş ayrıca yukarıda tanımlandığı gibi bir antikor veya türevinin bir genin transkripsiyon infidelitesinin (örnek olarak *in vitro*) belirlenmesi veya nicel hale

getirilmesi için kullanılması ile de ilgilidir.

Bu buluş ayrıca yukarıda tanımlandığı gibi bir konjuge bir antikor veya türevinin bir tedavi veya tanılama reaktifi (ayırıcı) olarak kullanımı ile de ilgilidir.

5

Bu buluş ilaveten spesifik olarak transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulmuş bir protein veya nükleik aside bağlanan bir reaktifi içeren, bir destek üzerine sabitlenmiş bir cihaz veya ürünü de açıklamaktadır. Reaktif örnek olarak bir prob veya bir antikor veya bir türevi olabilir.

10

Bu buluşta ilaveten bir hücre veya doku veya organizma içerisinde transkripsiyon infidelitesine neden olunması veya başlatılması veya uyarılması için bir yöntem de açıklanmaktadır. Bu tür bir yöntem tıpkı olarak bir transkripsiyon infidelitesi alanının normal genomik sekanslar içerisinde örnek olarak bir gen terapisi vektörü aracılığı ile sokulmasını içerebilir. Bu tür bir modifikasyon bir hücre veya dokunun yıkımı ile sonuçlanabilir. Özellikle hücre toksik proteinlerinin veya bileşiklerinin üretimi ile sonuçlanan herhangi bir gen sekansı içerisinde açık bir okuma çerçevesi oluşturmak mümkündür. Hasta (veya hedef) bir hücre içerisinde, toksik veya terapötik moleküller kullanılarak hedeflenen spesifik bir bİyo-işaretleyicinin ekspresyonu da mümkündür. Bu nedenle bu yaklaşımı kullanarak, transkripsiyon infidelitesi meydana geldiğinde veya belirli bir oranı aştığında hücrenin olumune veya tedavi edilmesine neden olunması mümkündür.

15

20

25

30

Bu buluş içerisinde ayrıca bir insan veya hayvanın tedavisi için bir yöntemde kullanılmak üzere farmasötik bir kompozisyonun üretilmesi için transkripsiyon infidelitesi alan(lar)ı içeren bir nükleik asidin kullanımı da açıklanmaktadır. Bu gen; bir memeli geni veya viral bir gen, bakteriyel bir gen vb. gibi patojenik bir ajandan gelen bir gen dahil olmak üzere herhangi bir gen olabilir. Bu bağlamda, bu buluş bir patojen tarafından kaynaklanan bir hastalığın tedavisi için bir yöntem ile ilgilidir, bu yöntem bahsedilen patojen tarafından kodlanmış bir genin transkripsiyon infidelitesine neden olunmasını veya uyarılmasını içermektedir.

Bu buluş ayrıca azaltılmış transkripsiyon infidelitesi ile in vitro olarak rekombinant polipeptidlerin üretim yöntemleri ile de ilgilidir. Bu tür yöntemler rekombinant

polipeptidlerde mikro-heterojenlikte bir düşüşe olanak vermektedir. Bu yöntem transkripsiyon infidelitesinin ortaya çıkış sıklığını düşürmek için rekombinant bir nukleik asit içeren konakçı hücrelerin uyarlanmış kodon kullanımı ile birlikte kullanımını içermektedir. Bu yöntem ayrıca transkripsiyon infidelitesinin ortaya çıkma sıklığını azaltan herhangi bir bileşik veya tedavinin kullanımını da içermektedir. Yöntem prokaryotik veya okaryotik konakçı hücrelerde, örnek olarak E. coli veya CHO suşlarında kullanılabilir.

Bu buluş örnek olarak hücre proliferatif hastalıklar (örneğin kanserler), bağışıklık rahatsızlıkları (örneğin oto-immun hastalıklar (çoklu skleroz, Amiyotropik Lateral Skleroz (ALS)), gref reddi), yaşlanma, inflamatuvar hastalıklar, diyabetler vb. gibi artan veya azalan transkripsiyon infidelitesi oranı ile ilişkili çeşitli patolojik durumların belirlenmesi, izlenmesi veya tedavi edilmesi için ve/veya terapötik olarak aktif ilaçların üretilmesi, dizayn edilmesi veya taranması için herhangi bir memeli özünde, özellikle herhangi bir insan özünde kullanılabilir. Bu buluş ayrıca prokaryotik hücreler, alt okaryotlar (örneğin mayalar), bocek hücreleri, bitki hücreleri, mantar vb. gibi herhangi diğer dokular veya hücre türlerinde transkripsiyon infidelitesinin belirlenmesi, izlenmesi, module edilmesi veya hedeflenmesi için de kullanılabilir.

Şekillerin Kısa Açıklaması

Şekil 1: cDNA kutuphanesi oluşturulması ve dizilmesi (sekanslama) prensibi

Şekil 2: (a-q) Analiz için kullanılan mRNA referans sekansları. Blastın çarpılmasını onlemek için mRNA referans sekanslarının poliA kuyruğu sistematik olarak uzaklaştırılmıştır. Şekil 2r test edilen genlerin bir listesini sunmaktadır.

Şekil 3: Tıpkı MegaBLAST çıktı dosyaları.

Şekil 4: İncelenen her bir gen için herhangi bir pozisyondaki nukleotid sekans sapmasının yüzdesi.

Şekil 5: TPT1, VIM = EST'ler ve oran testi analizlerinin sayısı.

Şekil 6: Elektronik filtrelerin arka arkaya uygulanmasından önce ve sonra EST'lerdeki değişimler. Clip 400 ve hücre hattı uzaklaştırma etkileri.

Şekil 7: DNA içeriği: a) Baz bO heterojenliği üzerinde pmRNA baz kompozisyonunun etkisi, b) İkame edilen her bir baz için yerine geçen bazın kompozisyonu, c) İstatistiksel olarak belirgin C>N testleri içerisinde etkilenen ve değiştirilen bazların yeniden bulunması, d) b-1 veya b+1'in tekrarına karşılık gelen ikame bazı üzerinde pmRNA baz kompozisyonunun

etkisi.

Şekil 8: VIM için sanal varyant mRNA ve protein.

Şekil 9: Kodlama etkisi

Şekil 10: Ilgilenilen protein = stop kodonu istatistiksel olarak etkilendiğinde amino asit dizilimleri.

Şekil 11: DHPLC = belirleme prensibi ve limitleri.

Şekil 12: DHPLC = primerler ve beklenen PCR ürünleri.

Şekil 13: İncelenen 60 proteinin listesi.

Şekil 14: Antikor üretimi.

Şekil 15: DHPLC Sonuçları

Şekil 16: Sanger hassasiyeti

Şekil 17: Kanserli hasta plazmasında APOAII ve APOCII PSP'nin belirlenmesi

Şekil 18: Plazma proteinleri üzerinde potansiyel PSP

Şekil 19: mRNA dizilim ikame tahminlerinin değerlendirilmesi

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Tanımlar

Transkripsiyon İnfidelitesi

Transkripsiyon infidelitesi terımı bir hücre içerisinde çeşitli ayrı RNA moleküllerinin tek bir gen sekansından üretildiği özgün bir mekanizmayı tanımlamaktadır. Bu yeni tanımlanan mekanizma potansiyel olarak her türlü geni etkilemektedir, rasgele değildir ve aşağıda açıklanacağı üzere belirli kuralları takip etmektedir. Örneklerde gösterildiği gibi, transkripsiyon infidelitesi RNA molekülleri içerisinde ikameler, silmeler ve araya sokmalara neden olabilir ve bu şekilde tek bir genden farklı proteinler yaratabilmektedir. Transkripsiyon infidelitesi ayrıca kodlama yapmayan RNA sekanslarını da etkileyebilir ve bu şekilde işlevlerini module edebilir. Bu nedenle transkripsiyon infidelitesinin ölçülmesi, module edilmesi veya hedeflenmesi hastalıkların belirlenmesi veya tedavi edilmesi ve ilaç geliştirilmesi için özgün bir yaklaşımı temsil etmektedir.

Transkripsiyon İnfidelite Alanı

Bu buluşun kapsamı içerisinde, Transkripsiyon İnfidelite Alanı terımı transkripsiyon infidelitesi tarafından etkilenen bir sekans ve/veya pozisyonu ifade etmektedir. Bu transkripsiyon infidelitesinin bir sonucu olarak oluşturulan en az bir modifikasyon içeren

bir nukleik asit veya amino asit alanı olabilir. Bu tür bir modifikasyon örnek olarak kodlama çerçevesinde bir değişimden (ilave ve/veya silme), stop kodonlarının sunulması veya bastırılmasından, yeni bir başlatma kodonunun sunulmasından, nukleotid(ler)in ikame(ler)inden (AA'nın değişiminin ima edilmesi veya edilmemesi) vb. kaynaklanabilir.

- 5 Bir transkripsiyon infidelite alanı transkripsiyon infidelitesinden kaynaklanan bir veya daha fazla sekans varyasyonları içerebilir. Bir transkripsiyon infidelite alanı örnek olarak 1 adet modifiye edilmiş nukleotid veya amino asit rezidusu ile örnek olarak 150 adet modifiye edilmiş nukleotid veya amino asit rezidusundan veya daha fazlasından oluşmaktadır. Transkripsiyon infidelite alanı tipik olarak sadakatlı transkripsiyondan
- 10 kaynaklanan sekanstan en az bir nukleotid veya amino asit modifikasyonu (örnek olarak ikame, silme, yerleştirme, ters çevirme vb.) ile ayrılmaktadır. Transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan bir protein veya alan (TI-proteini) tipik olarak en az bir adet modifiye edilmiş amino asit rezidusuna sahip olan 1 ile 50 arasında (veya hatta daha fazla) amino asit içermektedir. Bir nukleik asit transkripsiyon infidelite sekansı tipik
- 15 olarak en az bir adet modifiye edilmiş nukleotid rezidüsüne sahip 1 ile 150 arasında (ve hatta daha fazla) nukleotid içermektedir.

Transkripsiyon Infidelitesi Kuralları ve Tanımlanması

- Bu uygulamada tanımlandığı gibi transkripsiyon infidelitesinin spesifik belirleme
- 20 tekniklerine ve/veya spesifik kurallarına dayanarak, herhangi bir gen veya protein için Transkripsiyon Infidelite Alanlarının tahmin edilmesi ve tanımlanması artık mümkündür. Bu alanlar ayrıca verilen RNA için mevcut sekansları hizalayarak ve baz ikamelerini tanımlayarak da elde edilebilir. Bunlar nihayetinde örnek olarak tahmin edilen bir TI-proteini için spesifik lıgandlar kullanılarak çeşitli teknikler ile doğrulanabilir.

25

Bir transkripsiyon infidelite alanını tanımlamak için spesifik bir yöntem:

- verilen bir gen, RNA veya cDNA molekulunun veya bir kısmının diziliminin (sekansının) sağlanması, ve
 - bahsedilen sekans içerisinde, örnek olarak aşağıda (iii) içerisinde anlatıldığı gibi
- 30 transkripsiyon infidelitesi kurallarını takip ederek, transkripsiyon infidelitesinden kaynaklanan bir nukleotid değişiminin (örnek olarak ikame, silme, yerleştirme, tersine çevirme) tanımlanması, adımlarını içermektedir.

Bir transkripsiyon infidelite alanının tanımlanması için diğer bir spesifik yöntem:

- verilen bir protein veya bir kısmının diziliminin sağlanması, ve
- bahsedilen sekans içerisinde, örnek olarak aşağıda (iii) içerisinde anlatıldığı gibi transkripsiyon infidelitesi kurallarını takip ederek, transkripsiyon infidelitesinden kaynaklanan bir amino asit değişiminin (örnek olarak ikame, silme, yerleştirme, tersine çevirme) tanımlanması, adımlarını içermektedir.

Bir molekul içerisinde transkripsiyon infidelitesinden kaynaklanan bir değişikliğin varlığı uç adımlik bir süreç ile tanımlanabilmektedir ve bu süreç:

- (i) Çoklu Karşılık Gelme Faktöryel Analizi (MCFA) faktörleri üzerinde kuadratik diskriminasyona dayalı bir öğrenme makinesi ile transkripsiyon infidelite alanlarının tanımlanması
- (ii) aynı yöntem ile transkripsiyon infidelite alanlarının (b-1 veya b+1 veya diğer) kategorisinin tanımlanması ve
- (iii) aşağıdaki transkripsiyon infidelite kurallarını kullanarak değiştirilecek bazın tahmin edilmesi:

- Bir tekil olarak mevcut olan herhangi bir baz için, yani oncesinde veya sonrasında kendisi tarafından takip edilmeyen herhangi bir baz için, ikame edilecek baz büyük ihtimalle ikame edilecek olandan önceki ile aynıdır (b-1 kategorisi durumunda) veya ikame edilecek olandan sonraki baz ile aynıdır (b+1 kategorisi durumunda). Örnek olarak CAT, CCT haline gelecek (b-1 kuralı); ATG, AGG haline gelecektir (b+1 kuralı);
- Uç arka arkaya A içerisinde ikameler meydana geldiğinde, ikinci A'nın ikamesi tercihen C'ye gitmektedir;
- Uç arka arkaya T içerisinde ikameler meydana geldiğinde, ikinci T'nin ikamesi tercihen C'ye, daha sonra A'ya ve sonrasında ise G'ye gitmektedir;
- C ve G'nin uzatmaları ikincide çok nadir ikame edilmektedir, ancak eğer varsa, ikinci C'nin ikamesi tercihen A'ya ve ikinci G'nin ikamesi tercihen C'ye gitmektedir;
- Diğer durumlar için değiştirme bazı tercihen C'dir.

Herhangi bir hedef protein veya nükleik asidin dizilimi içerisindeki transkripsiyon infidelite alanlarının tanımlanması için diğer yöntemler örnek olarak ifade edilen mevcut dizilim etiketlerinin (EST'ler) karşılaştırılmasını, tanımlanan dizilimlerin doğrudan

güçlendirilmesini ve güçlendirme ürünlerinin spesifik dizilim yöntemleri (Sanger, kimyasal, Payro-sekanslama) ile dizilmesini içermektedir. Bu tür bir yaklaşık AA değişiklikleri, protein uzunluğunda modifikasyonlar vb. içeren varyant dizilimler vermektedir. Daha sonra transkripsiyon infidelite alanları taşıyan mRNA veya cDNA ile seçici olarak eşleşen oligonukleotid dizayn edilebilir ve bu bir dizilim havuzundan transkripsiyon infidelitesine sahip nukleotidin seçici amplifikasyonuna olanak vermektedir. ayrıca TI-proteinini hedefleyen antikorlar da üretilebilir.

Alternatif olarak, bir transkripsiyon infidelite alanının sekans analizi veya biyoinformatik kuralları vasıtası ile de tanımlanması mümkündür. Sonuçta ortaya çıkan sekans (dizilim) herhangi bir transfeksiyon vektörü içerisinde klonlanabilir. Ayrıca sadece transkripsiyon infidelitesi meydana gelirse kopyalanacak veya dönüştürülecek olan bir raportör gen ile gerçeğe içerisinde bu tür bir transkripsiyon infidelite alanı içeren bir yapının dizayn edilmesi de mümkündür. Raportör gen bir enzim veya floresan protein olabilir veya hedef hücreyi bir toksine karşı hassas veya dayanıklı yapan herhangi bir gen olabilir.

Transkripsiyon infidelite alanlarının (veya ikamelerinin) tanımlanmasına olanak veren detaylı bir yöntem aşağıda açıklandığı üzere TDG yöntemini içermektedir:

RNA içerisindeki transkripsiyon infidelite alan(lar)ının belirlenmesi için Pan ve Weissman ve Liu ve diğerleri tarafından açıklanan bir teknik (PNAS, 2002,99(14), 9346-9351 ve Anal Biochem. 2006 Eyl 1;356(1):117-24) uyarlanabilir. Bu teknik kompleks karışımlardan yanlış-eşleşme içeren DNA çiftlerinin ayrı ayrı zenginleştirilmesi kabiliyetine sahip bir enzim olan Tiamin DNA glikosilaz (TDG)'in kullanımına dayanmaktadır. Bu enzimler spesifik olarak nukleotid yanlış eşleşmelerini tanımakta ve abazik alanlar meydana getirmektedir (deoksiriboz ile DNA'nın bazlarından biri arasındaki bağ parçalanmaktadır). Daha sonra, TDG geri döndürülebilir şekilde bu abazik alanları bağlayabilmekte ve bu sayede yanlış-eşleşme içeren DNA parçalarının afinite saflaştırması için kullanılabilir. Tıpkı bir denemede, RNA'lar 2 hücre türünden (normal ve kanserli) ekstrakte edilmekte ve çift-kollu cDNA yapmak üzere ters kopyalanmaktadır. Her bir örneğin ısı ile denaturasyonu ve yavaş renaturasyonundan sonra, yanlış-eşleşme(ler)e sahip cDNA'lar oluşturulmakta ve mükemmel çiftlerden ayrılabilir. Bu cDNA'lar daha sonra ya doğrudan sekanslama ile analiz edilebilmekte veya DHPLC ile karşılaştırılabilir (ileride açıklanacaktır).

Transkripsiyon infidelitesi alanlarının veya mutasyonlarının tanımlanması için adapte edilebilen diğer teknikler örnek olarak US6,329,147 ; US4,979,330 ; WO02/077286 veya US6,120,992 dokümanlarında açıklanmaktadır.

5

Tipik olarak transkripsiyon infidelite alanlarının tanımlama yöntemleri ilave olarak tanımlanan sekansı içeren bir molekulun üretilmesi, bahsedilen moleküle spesifik olarak bağlanan bir lıgandın oluşturulması ve biyolojik bir örnek içerisinde bahsedilen lıgand tarafından spesifik olarak tanınan bir antıjenin varlığının doğrulanması ile transkripsiyon infidelite alanının doğrulanması adımını da içermektedir.

10

Bir nukleik asidin tipik bir transkripsiyon infidelite sekansı; transkripsiyon infidelitesinden kaynaklanan en az bir baz ikamesi, sılınması veya yerleştirilmesi içeren, tercihen Örnek 5'te açıklanan bir kuralı takip eden, uzunluğu 1 ila 150 nukleotid arasında olan bir sekanstır. Transkripsiyon infidelite sekansı daha yüksek olabilir.

15

Bir TI-proteininin tipik bir alanı transkripsiyon infidelitesinden kaynaklanan en az bir amino asit ikamesi (veya baz sılınması veya yerleştirilmesi nedeniyle kodlama çerçevesindeki modifikasyondan dolayı daha fazla değişiklik) içeren, tercihen Örnek 5'te açıklanan bir kuralı takip eden, uzunluğu 1 ila 5 amino asit arasında olan bir amino asit sekansıdır. Bir TI-proteininin alanı daha yüksek olabilir. TI-proteinlerinin alanlarının örnekleri deneysel bölümde, örnek olarak Şekil 13 ve 14'de sunulmaktadır.

20

Transkripsiyon İnfidelitesinin Belirlenmesi veya Ölçülmesi

Bu buluş DNA'nın RNA'ya transkripsiyonu sırasında veya hemen sonrasında ortaya çıkan yüksek oranda doğal sekans anormalliklerinin beklenmeyen keşfine dayanmaktadır. Bu süreç normal hücrelerde mevcut olabilir, ancak patolojik hücrelerde, örnek olarak kanser hücrelerinde büyük oranda artmaktadır. DNA'nın RNA'ya transkripsiyonunun bire bir baz tamamlayıcılar tarafından tanımlananlardan farklı kuralları takip ederek sekans varyasyonlarını oluşturduğunun keşfi transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan nukleik asit veya proteinlere spesifik özgün reaktiflerin (örnek olarak problemler, primerler, antikorlar, aptamerler) rasyonel dizaynına olanak vermektedir. Bu tür reaktifler bu nedenle transkripsiyon infidelitesinin tespit edilmesine veya ölçülmesine, normal veya hastalıklı durumlar arasında ayırım yapılabilmesine ve transkripsiyon infidelitesi ortaya

30

koyan hucrelere molekullerin hedeflenebilmesine olanak verebilmektedir.

Ilaveten, bu buluş hastalığın (ornek olarak kanserin) seviyesinin kestirimcisi (tahmin edicisi) olan reaktiflerin (ornek olarak problr, primerler, antikorlar, aptamerler) rasyonel dizaynına da olanak vermektedir. Aslında, hastalığın seviyesi (şiddeti) ile daha yuksek oranda transkripsiyon infidelitesinin korelasyon gostermesi beklenmektedir ve daha fazla gen urunu etkilendikçe bu oran kademeli olarak artmaktadır. Hastalıklı hucre(ler)de transkripsiyon (in)fidelitesinin burada açıklanan yontemle veya diğer herhangi bir teknoloji ile doğrudan ölçümü verilen herhangi bir dokuda hastalık surecinin farklı aşamalarında hücrelerin tespit edilmesine olanak vermektedir. Gen ekspresyonundaki bu varyasyonların doğru şekilde ölçülmesi (transkriptler ve proteinler) de hastalığın derecesine göre ilaç etkisinin değerlendirilme kapasitesini arttırmaktadır. Mevcut durumda, çeşitli mikro-dizi teknikleri gen ekspresyonundaki değişimlerin ölçülmesine olanak vermektedir. Ancak, bu verilerin güvenilirliği ve en önemlisi yeniden üretilebilirliği (tekrar edilebilirliği) halı hazırda yeterli değildir. Bu transkriptomik deneylerin değişkenliğinin büyük bir kısmının bu buluşun mucitleri tarafından keşfedildiği uzere kısmen transkripsiyon infidelitesi tarafından kaynaklandığını kabul edebiliriz. Bu nedenle, bu ortak olgunun keşfi transkripsiyon infidelitesinden minimum seviyede etkilenen veya bu buluşta açıklanan kuralları takip eden spesifik dizilimlerde ortaya çıkan transkripsiyon infidelitesini doğrudan yansıtan gen ekspresyon reaktiflerinin dizayn edilmesine olanak vermektedir.

Ayrıca transkripsiyon infidelitesinin transkripsiyon oranı tarafından module edilmesi de olasıdır ve hatta büyük ihtimalle boyledir. Patolojik durumdaki verilen bir genin artan ekspresyonunun TI'yı arttıracığı ve bu şekilde protein heterojenliğini arttıracığını tahmin etmekteyiz.

Transkripsiyon infidelitesi bu teknik alanda bilinen ve bu buluşa uyarlanabilen birkaç adet teknik kullanılarak tespit edilebilmekte veya ölçülebilmektedir. Özellikle bir protein veya nukleik asidin çeşitli formları arasında tespite olanak veren spesifik problr, primerler veya antikorlar, elektroporoz, jel migrasyon analizi, spektrometri vb. gibi transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan nukleik asit veya proteine spesifik reaktifler kullanılarak transkripsiyon infidelitesi ölçülebilir. Transkripsiyon infidelitesi oranı transkripsiyon infidelitesine maruz kalan bir hucrede genlerin sayısı ve/veya

verilen bir gen için oluşan transkripsiyon infidelite alanlarının sayısı değerlendirilerek tespit edilebilir. Bu tür bir oran bir test örneği içerisindeki transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan nükleik asit veya protein seviyesi ile referans bir örnekten elde edilenler karşılaştırılarak belirlenebilir.

5

Transkripsiyon Infidelitesinin nükleik asit seviyesinde tespit edilmesi

Yukarıda açıklandığı üzere, transkripsiyon infidelitesi RNA molekülleri içerisinde dizilim varyasyon(lar)ı meydana getirmektedir. Bu nedenle transkripsiyon infidelitesinin tespit edilmesi veya ölçülmesi, bir veya daha fazla gen tarafından kodlanmış RNA'lar veya tüm bir hücre veya doku veya örnek içerisindeki bu tür varyasyon(lar)ın varlığının veya (mutlak veya nispi) miktarının tespit edilmesi ile gerçekleştirilebilir. Nükleik asitler içerisinde transkripsiyon infidelitesinin tespiti hibridizasyon, amplifikasyon, heterodubleks formasyon vb. gibi çeşitli teknikler ile gerçekleştirilebilir.

15

Çeşitli farklı doku türleri içerisinde mevcut olan nükleotidlerin tanımlanmasında kullanılan hemen hemen tüm teknolojiler hibridizasyon adı verilen bir süreçte dayanmaktadır. Hibridizasyon, polimorfizmin belirlenmesi ve gen ekspresyonundaki varyasyonların aranması için kullanılan mikro-diziler gibi teknolojiler için kritiktir. Bu teknik gen ekspresyonunun seviyesinin ölçülmesi için uygulanmaktadır. Oligonükleotid problemlerinin hibridizasyonu ayrıca düşük fazlalık mesajlarının daha iyi incelenmesine olanak vermek üzere fazla miktarda eksprese edilen gen dizilimlerinin çıkartılması için de kullanılmaktadır – bu prosedür çıkartımcı (eksiltici-subtraktif) hibridizasyon olarak adlandırılmaktadır. Hibridizasyon ayrıca, mesaj dizilimini RNA tipinden DNA tipi dizilime dönüştürmek için ters transkriptaz uygulanmasından sonra ya da doğrudan PCR deneylerinde yaygın olarak kullanılan gen amplifikasyon reaksiyonunun da birinci adımıdır.

20

25

30

Hibridizasyonun altında yatan temel mekanizma, ilgili dizilimlerin birbirlerini tamamlayıcı olması koşulu ile, tek kollu nükleotid(ler) dizilimlerinin birbirlerine bağlanabilmesidir. 4 bazın her birinin hem uzunluğu hem de spesifik sırası hibridizasyonun etkisini ve dizilimin belirliliğini (spesifitesini) belirlemektedir. Bu her bir spesifik bazın kovalent olmayan bir şekilde tamamlayıcı bazına bağlandığını ima etmektedir: A T'ye ve C G'ye ve bunların tersi. Bir dizilim eşleşmesindeki bu kovalent olmayan bağlanma bazın sırası ile

koşullandırılmaktadır. Bu nedenle genel uygulamada bazların tanımlanmış bir dizilimi tek bir tamamlayıcı dizilime bağlanmaktadır. Bu spesifik bağlanma reaksiyonu verilen herhangi bir nukleotid karışımı içerisindeki herhangi bir tamamlayıcı dizilimin tanımlanmasına olanak veren hibridizasyon için temel teşkil etmektedir. Hibridizasyonun etkinliği, uygun sırada, birbirlerine eşleşen bazların sayısı (bazı seviyedeki yanlış eşleşmeler tolere edilmektedir) ile belirlenmekte ve bağlama tamponunun katılığı (sıklığı), CG ve TA'nın nispi miktarları (CG ve TA sırasıyla 3 ve 2 hidrojen bağı ile bağlanmaktadır) ve erime sıcaklığı, yani çift-kollu DNA'nın %50 çözünmesine olanak vermek için gerekli olan sıcaklık gibi deney koşulları tarafından belirlenmektedir.

10

Hibridizasyon kullanılarak transkripsiyon infidelitesinin tespit edilmesi tipik olarak bir orneğin bir transkripsiyon infidelitesi için spesifik olan bir nukleik asit probu ile temas ettirilmesi ve oluşan hibridlerin (melezlerin) varlığının (veya miktarının) tespit edilmesini içermektedir, bahsedilen varlık veya miktar transkripsiyon infidelitesinin varlığının veya oranının doğrudan bir göstergesidir. Tercih edilen bir uygulamada, bu yöntem sırasıyla bir veya daha fazla genin farklı transkripsiyon infidelitesi dizilimlerin için spesifik olan bir nukleik asit seti kullanmaktadır. Bir transkripsiyon infidelitesi dizilimi için spesifik olan nukleik asit problemleri, bu uygulamada açıklanan dizilim bilgisi ve nukleotid ikame, yerleştirme veya silme kurallarını kullanarak, herhangi bir gen için hazırlanabilir (bakınız örnek olarak Örnek 5).

20

Bu buluşun kapsamı içerisinde bir nukleik asit "probu" bir transkripsiyon infidelite dizilimi veya bunun bir tamamlayıcısı ile seçici hibridizasyon kabiliyetine sahip olan ve bahsedilen dizilim veya tamamlayıcıyı içeren bir örnek içerisinde bunların varlığını (veya miktarını) tespit etmeye uygun olan bir polinukleotid dizilimi içeren bir nukleik asit veya oligonukleotid anlamına gelmektedir. Problemler tercihen bir transkripsiyon infidelite dizilimine tam olarak tamamlayıcıdır, ancak bazı yanlış eşleşmelere tolere edilebilir. Problemler tipik olarak uzunluğu 8 ila 1500 nukleotid arasında, örnek olarak 10 ila 1000 arasında, daha tercih edilen haliyle 10 ila 800 arasında ve tipik olarak 20 ila 700 arasında olan tek kollu nukleik asitleri içermektedir. Daha uzun problemlerin de kullanılabileceği anlaşılmalıdır. Bu buluşa ait tercih edilen bir prob uzunluğu 8 ila 400 nukleotid arasında olan ve bir transkripsiyon infidelite dizilimine spesifik olarak hibritleşebilen tek kollu bir nukleik asit molekuludur.

30

Bu buluşun spesifik bir uygulaması bir transkripsiyon infidelite dizilimi içermeyen bir nukleik asit molekulu bölgesine seçici olarak hibritleşen bir nukleik asit probudur.

5 Nukleik asit hibridizasyonunu belirtmek için kullanıldığında seçicilik, probun hedef dizilime hibridizasyonunun bahsedilen probun diğer bir dizilime hibridizasyondan farklı olduğunu belirtmektedir. Bu bağlamda, her ne kadar prob ile hedef dizilim arasında mukemmel tamamlayıcılık gerekli olmasa da, seçici hibridizasyona olanak vermek için yeterli miktarda yüksek olmalıdır.

10 Bu buluşa ait tercih edilen problemler, bir hücre yüzeyi proteinini veya salgılanmış bir protein kodlayan bir RNA molekulu (veya karşılık gelen cDNA molekulu) içerisindeki bir transkripsiyon infidelite dizilimine tamamlayıcı (tümleyen) olan bir dizilimi içermektedir. Bu buluşa ait spesifik prob örnekleri bir transkripsiyon infidelite dizilimini tamamlayan veya 1'den 32'ye kadar SEQ ID'lerinden herhangi birinin bir peptid dizilimini kodlayan bir
15 dizilime sahiptir.

Örnek olarak hibridlerin kararlılığını arttırmak (örnek olarak 2'alkoksiribonükleotidler gibi modifiye edilmiş nükleotidler veya gruplarının araya ilave edilmesi) veya probun etiketlenmesi için problemlerin dizilimi örnek olarak kimyasal olarak modifiye edilebilir. Tıpkı
20 etiket örneklerine, kısıtlayıcı olmaksızın, radyoaktivite, floresans, luminosans, enzimatik etiketleme ve benzerleri dahildir. Prob hedef nükleik aside bir solüsyon veya suspansiyon içerisinde hibritleştirilebilir veya kısıtlama olmaksızın bir boncuk, kolon, plaka, substrat (nükleik asit dizileri veya parçaları üretmek için) vb. gibi katı bir desteğe bitleştirilebilir.

25 (Hibridizasyon problemleri ile birlikte kullanılabilen) diğer bir uygulamaya göre transkripsiyon infidelitesi spesifik primerler kullanılarak seçici amplifikasyon ile tespit edilmekte veya ölçülmektedir. Transkripsiyon infidelitesinin seçici amplifikasyon ile tespit edilmesi tıpkı olarak bir transkripsiyon infidelite dizilimini spesifik olarak güçlendiren
30 (amplifiye eden) bir nükleik asit primeri ile bir örneğin temas ettirilmesini ve oluşan amplifikasyon ürünlerinin varlığının (veya miktarının) tespit edilmesini içermektedir, bahsedilen varlık veya miktar transkripsiyon infidelitesinin varlığının veya oranının doğrudan bir göstergesidir. Tercih edilen bir uygulamada, bu yöntem sırasıyla bir veya daha fazla farklı transkripsiyon infidelite diziliminin spesifik amplifikasyonuna olanak

veren bir nukleik asit primeri setini kullanmaktadır. Amplifikasyon, kısıtlayıcı olmaksızın, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), lıgaz zincir reaksiyonu (LCR), transkripsiyon tarafından aracılık edilen amplifikasyon (TMA), kol (sarmal) oteleme amplifikasyonu (SDA) ve nukleik asit dizilimi temelli amplifikasyon (NASBA) gibi bu teknik alanda bilinen 5 çeşitli tekniklere gore gerçekleştirilebilmektedir.

Bir transkripsiyon infidelite dizilimine spesifik olan nukleik asit primerleri, bu uygulamada açıklanan dizilim bilgileri ve nukleotid ikame, yerleştirme ve dilme kurallarını kullanarak, herhangi bir gen için hazırlanabilir (bakınız örnek olarak Örnek 10 5).

"Primer" terımı, bir transkripsiyon infidelite dizilimi ile veya bunun bir tamamlayıcısı ile veya bir transkripsiyon infidelite alanının bitişğinde bulunan bir nukleik asit bölgesi ile seçici hibridizasyon kabiliyetine sahip olan ve bahsedilen dizilim veya tamamlayıcıyı 15 içeren bir örnekte bahsedilen transkripsiyon infidelite alanının tamamını veya bir kısmını amplifiye etmeye uygun olan bir polinukleotid dizilimi içeren bir nukleik asit veya oligonukleotid ifade etmektedir. Bu buluşa ait tipik primerler uzunluğu 5 ila 60 nukleotid arasında olan, daha tercih edilen haliyle uzunluğu 8 ila 50 nukleotid arasında olan ve daha tercih edilen haliyle uzunluğu yaklaşık 10 ila 40, 35, 30 veya 25 nukleotid 20 arasında olan tek-kollu nukleik asit molekülleridir. Yüksek spesifikitenin sağlanması için mukemmel tamamlayıcılık tercih edilmektedir. Ancak, belirli yanlış eşleşmeler yukarıda problemler için açıklandığı gibi tolere edilebilmektedir.

"Bitişğinde" terımı, bolgenin transkripsiyon infidelite alanından konvansiyonel 25 polimeraz aktiviteleri ile uyumlu bir mesafede, örnek olarak bahsedilen alandan 250 bp'den daha fazla olmayan, tercihen 200, 150, 100 veya daha tercih edilen haliyle 50 bp'yı aşmayan bir mesafede yukarıda konumlandırılmış olması gerektiğini belirtmektedir.

Bu buluşun diğer bir yönü de en az bir çift nukleik asit primeri içermektedir ve 30 bahsedilen primer çifti bir algılama ve bir ters primer içermektedir ve bahsedilen algılama ve ters primerler bir transkripsiyon infidelite diziliminin veya tam olarak tamamlayıcı olan bir dizilimin seçici amplifikasyonuna olanak vermektedir. Bu buluşa ait spesifik primer örnekleri örnek olarak **Şekil 12**'de açıklanmaktadır.

Buluşun diğer bir uygulamasına göre, transkripsiyon infidelitesi Denature Edici Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (DHPLC) ile ölçülmektedir. Bu yöntemin prensibi örnek olarak **Şekil 11**'de açıklanmaktadır. Temel olarak, amplifikasyon ürünleri denature edilmekte ve yeniden tavlama esnasında transkripsiyon infidelite dizilimlerinin varlığının bir sonucu olarak hem homodubleksler hem de heterodubleksler oluşmaktadır. Daha sonra bu karışım DHPLC ile analiz edilmektedir. Heterodubleksler ve homodublekslerin DNA yapıları analiz sıcaklığında farklı olduğundan, farklı şekilde ayrıştırılmakta ve (nispi) miktarları tayin edilebilmektedir.

Transkripsiyon infidelite dizilimlerinin (sekanslarının) kanser hücrelerinde normal hücrelerdekine göre daha büyük bir frekansta mevcut olduğunun doğrulanması için seçilen genlerin tahmin edilen transkripsiyon infideliteleri belirtilen oligonukleotidler (bakınız Örnek 6) kullanılarak RT-PCR ile amplifiye edilmiştir. Homo- ve heterodublekslerin varyasyonları doğrulanmıştır (Şekil 15).

Transkripsiyon infidelitesinin tespit edilmesi, nicel hale getirilmesi veya izlenmesi için bu buluş içersinde kullanılmak üzere nükleik asitlerin tespit edilmesi için uygun olan herhangi bir diğer teknik de kullanılabilir.

Transkripsiyon İnfidelitesinin proteinler seviyesinde tespit edilmesi

Transkripsiyon infidelitesi protein diziliminde değişikliklere neden olduğundan transkripsiyon infidelitesinin varlığı veya seviyesi de T1-proteinlerinin varlığı veya miktarı tespit edilerek ölçülebilir.

Proteinlerde transkripsiyon infidelitesinin ölçülmesi için bu teknik alanda bilinen çeşitli teknikler kullanılabilmekte ve/veya adapte edilebilmektedir. Özellikle, transkripsiyon infidelitesi proteinlerde davranışlarını doğrudan değiştiren modifikasyonlara neden olduğundan, bu değişiklikler örnek olarak 2-boyutlu jel elektroporozu ve kütle spektrometrisi ile veya yüzey geliştirilmiş lazer salınım iyonizasyonu ile tespit edilebilmektedir. TI proteininin insan plazmasında var olduğunun bir doğrulanması olarak, ApoAII'nin kurallara uygun (kanonik) STOP'un ardından konumlandırılmış bir peptidin kütle spektrometri profilini göstermekteyiz. Kütle spektrometri verilen argininin kurallara

uygun STOP ile ikame edildiğini göstermektedir. İlaveten, transkripsiyon infidelitesi daha uzun veya daha kısa (hucresel veya plazma) protein izoformlarının oluşmasına neden olduğundan (baz ikamesinden dolayı premature stop kodonunun veya silmeler veya yerleştirmeler durumunda açık okuma çerçevesinde bir yer değiştirmeden dolayı), bu tür izoformlar bunların spesifik ligandları ve/veya protein dizilim stratejileri kullanılarak tespit edilebilir veya nicel hale getirilebilir. Bu bağlamda, protein uzunluğunda ve AA birincil dizilimindeki değişikliklerin baskın olarak proteinin karboksı-terminal alanında meydana geldiğini göstermekteyiz. Buna göre, dizilim (sekanslama) stratejileri, önceden şüphelenilmeyen bir bölge olan, proteinlerin C-terminaline doğru yönlendirilmelidir (gerçekte, mevcut durumda kullanılan doğrudan protein dizilimi yöntemleri sadece NH₂ terminal AA'da başlayarak elde edilebilmektedir).

Spesifik ligandlar kullanılarak transkripsiyon infidelitesinin tespit edilmesi tipik olarak bir orneğin bir TI-proteininin bir alanı için spesifik olan bir ligand ile temas ettirilmesini ve oluşan kompleksin varlığının (veya miktarının) tespit edilmesini içermektedir, bahsedilen varlık veya miktar transkripsiyon infidelitesinin varlığının veya oranının doğrudan bir göstergesidir. Tercih edilen bir uygulamada, bu yöntem sırasıyla bir veya daha fazla TI-proteininin farklı alanları için spesifik olan bir ligand setini kullanmaktadır. Bu alanlar için spesifik olan ligandlar bu uygulamada açıklanan dizilim bilgileri ve amino asit ikame kuralları kullanılarak herhangi bir protein için hazırlanabilmektedir (bakınız örnek olarak Örnek 5). Ligand çözünabilir formda kullanılabilir veya bir yüzey veya destek üzerine kaplanabilir.

Bu bağlamda, bu buluş ayrıca bir TI-proteininin bir alanına seçici olarak bağlanan herhangi bir ligand ile de ilgilidir. Spesifik antikorlar, sentetik moleküller, aptamerler, peptidler ve benzerleri gibi farklı tür ligandlar ele alınabilir.

Spesifik bir uygulamada, ligand bir antikor veya bunun bir kısmı veya türevidir. Buna göre bu buluşun belirli bir yönü bir TI-proteininin bir alanına spesifik olarak bağlanan bir antikor ile ilgilidir.

Bu buluşun kapsamı içerisinde bir antikor poliklonal bir antikoru, monoklonal bir antikoru ve bunların büyük oranda aynı antijen özelliklerine sahip olan parçalarını veya türevlerini tanımlamaktadır. Parçalara örnek olarak Fab, Fab'2, CDR bölgeleri vb.

dahildir. Turevlerine ise tek zincirli antikorlar, insanlaştırılmış antikorlar, insan antikorları, poli-klonal antikorlar vb. dahildir.

5 TI-proteinlerinin alanlarına karşı antikorlar bu teknik alanda genellikle bilinen prosedurler ile üretilebilmektedir. Örnek olarak TI-proteinin alanını (örnek olarak bir peptid veya protein olarak) tek başına veya uygun bir proteinle birleştirerek insan olmayan bir hayvana enjekte ederek poliklonal antikorlar üretilebilir. Uygun bir periyodun ardından, hayvan kanatılır, sera (serum) geri toplanır ve bu teknik alanda bilinen teknikler ile saflaştırılır (Paul, W.E. "Fundamental Immunology" Second Ed. Raven Press, NY, sayfa 176,1989; Harlow ve diğerleri "Antibodies: A laboratory Manual", CSH Press, 1988 ; Ward ve diğerleri (Nature 341 (1989)544).

15 T1-proteinleri ile aynı dizilime sahip peptidler bu teknik alanda genel olarak bilinen prosedurler ile üretilebilmektedir. Bu tür peptidler uygun bir destek ile birleştirilebilmekte ve biyolojik örnekler (örnek olarak vücut sıvıları) içerisinde mevcut olan oto-antikorların tespit edilmesi için kullanılabilmektedir.

Örnek olarak immün bir B-lenfositin miyeloma hücrelerine füzyonunu içeren *Kohler-Millstein* (2) tekniği (Kohler-Millstein, Galfre, G. ve Milstein, C, Methods Enz. 73 sayfa 1 (1981)) ile TI-proteinlerinin alanlarına karşı monoklonal antikorlar hazırlanabilir. Örnek olarak, yukarıda açıklandığı gibi bir immünojen açıklandığı gibi insan olmayan bir memeliye enjekte edilebilir. Daha sonra, dalak dışarı çıkartılır ve miyeloma ile füzyon işlemi çeşitli yöntemlere göre gerçekleştirilir. Sonuçta ortaya çıkan hibridoma hücreleri daha sonra TI-proteinlerinin alanlarına karşı salgılanan antikorlar için test edilebilir.

25 TI-proteinlerinin belirli bir alanı için "seçici" olan bir antikor bahsedilen alana (veya bunun bir epitop-içeren kısmına) bağlanması spesifik olmayan bağlanmasından (yani diğer bir antijene, özellikle bahsedilen alanı içermeyen doğal bir proteine bağlanmasından) güvenilir şekilde ayırt edilebilen bir antikoru tanımlamaktadır. TI-proteinlerinin alanları için seçici olan antikorlar bir örnek içerisinde bu tür alanları içeren proteinlerin varlığının tespit edilmesine olanak vermektedir.

Teşhis (Tanılama)

Bu buluş bir öznenen alınan bir ornekteki bir hastalığın diğer şeyler yanında varlığının,

yokluğunun, yatkınlığının, riskinin veya şiddetinin belirlenmesi için kullanılabilecek tespit veya tanı testlerinin uygulanmasına da olanak vermektedir. "Teşhis (tanı)" teriminin farmakogenomik, prognostik (geleceğe yönelik tahmin) ve benzeri yöntemleri içerdiği ele alınmalıdır.

5

Belirli biryonu ile bu buluş biyolojik bir örnek içerisinde, tercihen bir insan biyolojik örneği içerisinde *in vitro* veya *ex vivo* olarak kanserlerin varlığının, yokluğunun, yatkınlığının, riskinin veya şiddetinin tespit edilmesi için bir yöntem ile ilgilidir ve bu yöntem bahsedilen örneğin bir transkripsiyon infidelite alanına spesifik olarak bağlanan bir ligand ile temas ettirilmesini ve bir kompleksin oluşumunun belirlenmesini içermektedir.

10

Bu buluşun spesifik bir amacı bir öznedeki kanserlerin varlığının, yokluğunun, yatkınlığının, riskin veya şiddetinin tespit edilmesi için bir yöntem ile ilgilidir ve bu yöntem öznenen alınan bir örneğin *in vitro* veya *ex vivo* olarak kanser hücreleri tarafından eksprese edilen bir transkripsiyon infidelite alanına spesifik olarak bağlanan bir ligand ile temas ettirilmesini ve bir kompleksin oluşumunun belirlenmesini içermektedir.

15

Bu buluşun diğer bir uygulaması bir öznenin bir kanser tedavisine tepkisinin veya tepki verme yeteneğinin değerlendirilmesi için bir yöntemdir, bu yöntem öznenen alınan bir örnek içerisindeki transkripsiyon infidelitesinin varlığının veya oranının tedaviden önce veya tedavi süresince farklı zamanlarda tespit edilmesini içermektedir.

20

Bu buluş ayrıca bir kanser hastalığının tedavisinin etkisinin belirlenmesi için bir yöntem ile de ilgilidir, bu yöntem (i) bahsedilen tedavi esnasında veya sonrasında öznenen bir doku örneği sağlanmasını, (ii) bahsedilen örnek içerisinde transkripsiyon infidelitesinin varlığının ve/veya oranının tespit edilmesini ve (iii) bahsedilen transkripsiyon infidelitesinin varlığının ve/veya oranının bahsedilen öznenen tedavinin öncesinde veya erken bir aşamasında alınan bir referans örneğindeki transkripsiyon infidelitesi miktarı ile karşılaştırılmasını içermektedir.

25

30

Bir örnek içerisindeki transkripsiyon infidelitesinin varlığı (ve artışı) bir kanser hastalığının varlığının, yatkınlığının veya ilerleme seviyesinin bir göstergesidir. Bu nedenle bu buluş daha etkili ve duruma özel uygun terapötik müdahalelerin dizaynına olanak

sağlamaktadır. Ayrıca, semptomatik-öncesi seviyedeki bu teşhis onleyici bir rejimin uygulanmasına da olanak vermektedir.

- 5 Bu buluşa ait tanı yöntemleri *in vitro*, *ex vivo* veya *in vivo*, tercihen *in vitro* veya *ex vivo* olarak gerçekleştirilebilir. Örnek bir özünden elde edilen ve hangisi uygunsa nükleik asitler veya polipeptidler içeren herhangi bir biyolojik örnek olabilir. Bu tür örnekler örnek olarak vücut sıvıları, dokular, hücre örnekleri, organlar, biyopsiler vb. dahildir. En çok tercih edilen örnekler kan, plazma, serum, salya, urin, seminal sıvı ve benzerleridir. Nükleik asitlerin veya polipeptidlerin test için mevcudiyetinin oluşturulması veya
- 10 geliştirilmesi için yöntem uygulanmadan önce örnek işleme tabi tutulabilir. Bu işlemlere örnek olarak aşağıdakilerden bir veya daha fazlası dahil olabilir: hücre kırımı (lizis) (örnek olarak mekanik, fiziksel, kimyasal vb.), santrifugasyon, ekstraksiyon, kolon kromatografisi ve benzerleri.
- 15 Bu buluşa ait bir yöntem insan örnekleri içerisinde transkripsiyon infidelitesi tarafından üretilen özgün peptidlere karşı yönlendirilmiş olan ve antikor üretimine neden olan immun uyarım oluşturan antikorların varlığının belirlenmesini içermektedir. Bu buluşa ait ikinci bir yöntem transkripsiyon infidelite peptidlerine karşı yönlendirilmiş immunolojik yapı taşıyan hücrelerin tespit edilmesine yöneliktir.

20

İlaç Dizaynı ve Terapi

- Yukarıda belirtildiği üzere, bu buluş aday bir molekulun transkripsiyon infidelitesini module etme kabiliyetinin değerlendirilmesi ile özgün ilaçların dizaynına (veya taranmasına) olanak vermektedir. bu tür yöntemlere bağlama testleri ve/veya
- 25 fonksiyonel (aktivite) testleri dahildir ve hayvanlarda ve benzerlerinde *in vitro* (örnek olarak hücre sistemleri içerisinde veya hücresel olmayan deneylerde) gerçekleştirilebilir.

- Bu buluşum spesifik bir amacı biyolojik olarak aktif bir bileşiğin seçilmesi, karakterize edilmesi, taranması veya optimize edilmesi için bir yöntem ile ilgilidir ve bu yöntem bir
- 30 test bileşiğinin transkripsiyon infidelitesini module edip etmediğinin *in vitro* olarak belirlenmesini içermektedir. Transkripsiyon infidelitesinin modülasyonu belirli bir gen veya proteine göre veya önceden belirlenmiş bir gen veya protein setine göre veya global olarak test edilebilir.

Bu buluşun diğer bir uygulaması biyolojik olarak aktif bir bileşiğin seçilmesi, karakterize edilmesi, taranması veya optimize edilmesi ile ilgilidir ve bahsedilen yöntem bir test bileşiğinin *in vitro* olarak bir gen ile temas ettirilmesini ve bahsedilen test bileşiğinin bahsedilen genden transkripsiyon infidelite alanları içeren RNA moleküllerinin üretimini module etme kabiliyetinin belirlenmesini içermektedir.

Bu buluşun diğer bir uygulaması biyolojik olarak aktif bir bileşiğin seçilmesi, karakterize edilmesi, taranması ve/veya optimize edilmesi için bir yöntem ile ilgilidir ve bahsedilen yöntem bir test bileşiğinin bir hücre ile temas ettirilmesini ve bahsedilen hücre içerisinde test bileşiğinin transkripsiyon infidelitesini module edip etmediğinin belirlenmesini içermektedir.

Yukarıdaki tarama testleri plakalar, tüpler, şişeler vb. gibi herhangi bir uygun cihaz içerisinde gerçekleştirilebilir. Tıpkı olarak test çok-kuyucuklu mikro-titer plakaları üzerinde gerçekleştirilmektedir. Bu buluş kullanılarak, çeşitli test bileşikler paralel olarak test edilebilir. İlaveten, test bileşiği çeşitli orijinli, tabiatta veya kompozisyonda olabilir. İzole olarak veya diğer maddelerle karışım halinde, lipid, peptid, polipeptid, nükleik asit, küçük molekül gibi herhangi bir organik veya inorganik madde olabilir. Bileşikler örnek olarak birleşik bir bileşik kutuphanesinin tamamı veya bir kısmı olabilir.

Transkripsiyon infidelitesini module eden bu buluşa ait bileşikler bir hücre içerisindeki transkripsiyon infidelitesinin azaltılması için terapötik fayda gibi pek çok faydaya sahiptirler. Bu tür bileşikler proliferatif hastalıklar (örnek olarak kanserler), immün hastalıklar, yaşlanma, inflamatuvar rahatsızlıklar vb. gibi anormal transkripsiyon infidelitesi ile ilişkili veya anormal transkripsiyon infidelitesi nedeniyle oluşan hastalıkların tedavisi (veya önlenmesi) için kullanılabilir.

Bu buluşa ait diğer bileşikler transkripsiyon infidelitesini hedef alan bileşikler, yani seçici olarak transkripsiyon infidelite alanlarına bağlanan bileşiklerdir. Bu tür bileşikler (örnek olarak antikörler, RNAi vb.) tek başlarına veya bir etikete konjuge olarak tanı reaktifleri olarak veya terapötik ajanlar olarak kullanılabilirler.

Transkripsiyon infidelitesini module eden veya hedefleyen buluşa ait bileşikler oral veya sistemik verme, intravenöz, intra-arteriyel, intra-serebral veya intraaternal

enjeksiyonların dahil olduğu herhangi bir uygun yolla verilebilirler. Dozaj geniş bir limit içerisinde değişiklik gösterebilir ve bu teknik alanda uzman kişilerce bilinen çeşitli faktörlere bağlı olarak kişisel gereksinimlere göre her bir spesifik durum için ayarlanması gerekecektir. İzotonik solüsyon, tamponlanmış veya salın solüsyonlar vb. gibi herhangi bir solüsyon, suspansiyon, toz, jel vb. gibi bu teknik alanda bilinen farmasötik olarak kabul edilebilir herhangi bir dozaj formu kullanılabilir. Bileşikler tek başlarına verilebilirler, ancak genellikle standart farmasötik uygulamaya göre (Remington'un Farmasötik Bilimleri, Mack Yayınları'nda açıklandığı gibi) farmasötik bir taşıyıcı ile birlikte verilmektedirler. Antikorlar ise halı hazırda insan deneylerinde ve terapilerinde kullanılan ve bu teknik alanda bilinen yöntemler ve protokollere göre verilebilir.

Transkripsiyon infidelitesinin normal hücre işlevi üzerine etkisi

Genel olarak çoğu hücre fonksiyonundan proteinlerin sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Ancak kodlama yapmayan RNA olarak bilinen RNA'nın da bu nedenle kendi başlarına fonksiyonel moleküller olduğu da açıktır. Onemleri daha önceden hafife alınan bu transkriptler pek çok organizma içerisinde mevcuttur ve pek çok hücre fonksiyonunu düzenlemektedirler. Bunların arasında rRNA, tRNA, tmRNA (trans-haberci RNA) bulunmaktadır, ancak RNA'nın transkripsiyonel-sonrası modifikasyonlarına eklemeye veya diğer hücresel işlevlerde müdahale eden kodlama yapmayan RNA (snoRNA, snRNA vb.) da bunların arasındadır. Hem RNA'nın hem de proteinin işlevleri bu uygulamada açıklanan transkripsiyon infidelitesinin eksikliğinden etkilenebilir. DNA dizilimi çekirdek içerisinde RNA polimeraz II olarak adlandırılan ve DNA molekülünün dizilimini algılayan ve ana DNA şablonuna tamamlayıcı olan tek kollu bir nükleotid polimeri sentezleyen bir proteinin faaliyeti ile mRNA'ya dönüştürülmektedir (kopyalanmaktadır). RNA bazının verilen herhangi bir pozisyondaki düzeni ve tipi bir şablon olarak hizmet eden DNA kolu üzerinde mevcut olan bazın düzeni ve tipi tarafından belirlenmektedir. mRNA'nın birinci bazına karşılık gelen, kopyalanan RNA'nın 5' ucu başlangıçtaki nükleotide ilüştürülmüş olan 7-metilguanilat'a bağlıdır ve bu sayede RNA'yı bozunmadan koruyan 5' CAP'ı oluşturmaktadır. Bu modifikasyon transkripsiyon (kopyalama) tamamlanmadan önce oluşmaktadır. Birinci transkriptin 3' ucundaki işlem poli(A) polimerazı olarak adlandırılan bir enzim tarafından bir adenin dizisi rezidusunun eklendiği bir serbest 3'-hidroksil grubu vermek üzere bir endonükleaz ile bölünmeyi içermektedir. Sonuçta ortaya çıkan poli(A) kuyruğu 100-250 arasında nükleotid içermektedir. İşlemin son adımı elementin intronik dizilimlerine karşılık gelen ana transkriptinden bölünmeyi ve

ardından ekzonlar ile ligasyonu içeren ekleme (splays) işlemidir. Bu süreç bazıları RNA'ya bağlanan çeşitli proteinler ve ncRNA'lar tarafından kontrol edilmektedir. Bu bağlanma işleminin transkripsiyon infidelitesinin eksikliği tarafından etkilenebilen tek bir adım olması mümkündür. Aslında, bu proteinlerin tümünün kendisi spesifik RNA tarafından kodlanmaktadır; bu nedenle bu proteinlerin işlevi potansiyel olarak transkripsiyon infidelitesinin eksikliği tarafından etkilenmektedir. RNA olgunlaşmasının yüksek seviyede kompleks olan süreci dönüşümün oluşması için çekirdekten dışarı ihraç edilecek olan mRNA'nın üretimine neden olmaktadır. Bu aşamada, olgun mRNA üzerinde mevcut tüm nükleotid uçlularının AA'ya dönüştürülmeyeceğinin anlaşılması önemlidir. Olgun haberci RNA'lar mRNA'nın genel stabilitesinin belirlenmesinde ve dönüşümde diğer rollerde işlevsel önem taşıyan 5' ve 3' dönüştürülmemiş bölgeler olarak adlandırılan kodlama yapmayan bölgeler içermektedir. DNA içerisinde bulunan bilgilerin uygun protein AA dizilimine etkili olarak taşınması için transkripsiyonun mutlak sadakatı (fidelitesi) gereklidir. Aslında, transkripsiyon esnasında veya olgunlaştırma esnasında meydana gelen herhangi bir hata muhtemelen mRNA stabilitesinde değişikliklerin oluşmasına ve nihai olarak protein AA ana diziliminde bir varyasyona neden olacaktır. Protein dizilimindeki bu varyasyonlar transkripsiyonun başlangıcı, transkripsiyonun kendisi, RNA'nın 5' ile kapanması, 3' poliadenilasyon, RNA eklenmesi ve/veya RNA'nın ihracı ile ilişkili protein diziliminin değiştirilmesi ile transkripsiyon infidelitesi olgusunu daha kötü duruma getirebilir. Bu nedenle, bu buluşta transkripsiyon infidelitesinin kanser hücrelerinden izole edilmiş çok sayıda geni etkilediğinin gösterilmesi bu olgunun kendi kendisini azdirması ve bu nedenle hastalığın şiddetinin artması olasılığını açmaktadır. Transkripsiyon infidelitesinin neden olduğu RNA dizilimlerindeki varyasyon hücre işlevi üzerinde anı sonuçlara sahip olabilir. Aslında, RNA ana transkripti içerisine DNA şablonunununkilere tümleyen olmayan bazların sokulması sonuçta ortaya çıkan protein AA ana dizilimi üzerinde potansiyel anı sonuçlara sahiptirler. Değişiklik kodonun ilk 2 bazını etkilediğinde, AA dizilimi üzerinde tipik olarak doğrudan bir etki ortaya koymaktadır. Kodonun uçuncu bazını etkileyen varyasyonlar protein AA dizilimi üzerinde daha az bir etkiye sahip olacaktır, çünkü genetik kod dejenere edilmiştir. Bu nedenle, kodonun uçuncu pozisyonunda konumlandırılmış olan bazdaki değişiklikler proteinin AA dizilimini doğrudan etkilemeyebilir. Aşağıda açıklanan verilere dayanarak, transkripsiyon infidelitesinin kodon üzerindeki pozisyonuna bağlı olmaksızın tüm bazları etkileyen bir olgu olduğuna ve bu nedenle protein AA ana dizilimini etkilediğine inanılmaktadır. Protein içerisindeki değişiklikler tarafsız olabilir veya protein işlevinde bir modifikasyona

(bir artış veya aktivite kaybı) neden olabilir. Transkripsiyon infidelitesi olgusu ağırlıklı olarak yetişkin mRNA'nın en azından ilk 400-500 bazının kodlanmasından sonra gözlenen bir olgudur; mRNA'nın 5' ucu nispeten daha az etkilenmektedir. Kansere hastalarından alınan kanser hücrelerinde ve plazma içerisinde daha kısa ve daha uzun protein parçalarının mevcut olacağına inanılmaktadır. Bu daha kısa ve daha uzun izoformlar aşağıda açıklanan transkripsiyon infidelite kurallarından doğrudan çıkarılabilir. Bu durum kanser veya immünolojik hastalık şiddetinin spesifik işaretleyicilerinin belirlenmesi için rasyonel dizayn edilmiş yöntemlerin üretimine olanak vermektedir. Çoğu genin transkripsiyon oranı hücresel ihtiyaçlara uyum sağlamak üzere kontrol edildiğinden, transkripsiyon infidelitesinin doğrudan aşırı veya eksik protein işlevinden dolayı gen ekspresyonunda değişikliklere neden olduğu önerilmektedir. Bu nedenle, transkripsiyon infidelitesi olgusu hücre kapasitesi üzerinde görevini yapabilmesi için temel bir etki ortaya koymaktadır. Bu nedenle tüm kanser hücresi türlerinden izole edilen çoğu genin ortak bir özelliği olarak bu hasarın belirlenmesi, verilen herhangi bir hücre içerisinde transkripsiyon infidelitesi oranının nicel ölçümüne olanak veren yeni yöntemlerin aranması için bir mantık sunmaktadır. Bu tarama deneyi transkripsiyon infidelitesini kısıtlayabilen özgün ilaçların test edilmesine olanak vermekte ve bu sayede hastalığın ilerlemesini önlemekte ve normal hücre işlevini geri getirmektedir.

Transkripsiyon infidelitesi ve Patoloji

Bu buluş transkripsiyon infidelitesinin protein diziliminde önemli değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Verilen herhangi bir proteinin işlevi doğrudan AA dizilimine bağlı olan 3-D (3 boyutlu) yapısı tarafından belirlenmektedir. Değişken bir AA, protein kesimi veya protein uzatımına sahip proteinler protein aktivitesinde etkili bir modifikasyon ile sonuçlanabilir veya etkisiz kalabilir. Normal homologlarının fonksiyonunu büyük oranda engelleyen modifiye edilmiş protein örnekleri açıklanmıştır. Transkripsiyon infidelitesi çok sayıda geni etkileyen ve bu nedenle çok sayıda protein ortaya çıkaran bir olgudur. Bu proteinlerden bazıları DNA yapısının kararlı halde tutulması ve DNA'nın onarımında rol aldığından, bu proteinlerin arızalı işlemesi DNA onarımının bozulmasına ve hücrelerin herhangi bir hasarlı DNA'yı başarılı şekilde onarma kapasitesinin büyük oranda düşmesine neden olabilir. Normal hücreleri içerisinde transkripsiyon fidelitesinin (sadakatının), transkripsiyonu kontrol eden çeşitli protein komplekslerinin faaliyetinden dolayı olması nedeni ile bu proteinlerdeki başlangıçtaki ufak değişikliklerin bu olguyu kademeli olarak artırması oldukça mümkündür. Bu

sonrasında hücre farklılaşma durumunu bastıracak ve hastalığın artan şiddette formlarına neden olacak daha büyük oranda transkripsiyon infidelitesi ile sonuçlanacaktır. Transkripsiyon infidelitesinin gerçekten kanser hücreleri içerisinde ortaya çıktığının ve verilen herhangi bir gen tarafından kodlanmış proteinlerde geniş bir çeşitliliğe neden olduğunun gösterilmesi özgün tanı problemlerinin taranması ve özgün terapötik hedeflerin dizayn edilmesi için özgün bir alan açmıştır.

Bu buluş DNA üzerinde mevcut bilgilerin çeşitlendirilmesine katkıda bulunan ve spesifik kuralları takip eden özgün bir olguyu açıklamaktadır. Bu rasgele olmayan transkripsiyon infidelitesi süreci kanser hücreleri içerisinde büyük oranda şiddetlenmektedir ancak ayrıca aynı kuralları takip eden normal hücrelerde de görülmektedir. Bu mekanizma mRNA içerisinde özgün bazlar ortaya koymakta ve bu sayede ribozom seviyesinde dönüştürülecek mesajda etkili değişikliklere neden olmaktadır. Bu olgu büyük ihtimalle oldukça geneldir, çünkü test edilen çoğu gen içerisinde mevcuttur. Transkripsiyon infidelitesinin anı sonucu tek bir genin şüphelenilenden çok daha fazla protein üretebilmesidir. Bu nedenle buluşumuz genom üzerindeki kısıtlı sayıdaki gen ile biyolojik örneklerde mevcut olan çok sayıda protein arasındaki nispi uyumsuzluğu kısmen açıklama potansiyeline sahiptir. Transkripsiyon infidelitesinin rasgele olmayan bir süreç olduğunu ve bazıları burada açıklanmış olan spesifik kurallar tarafından yönetildiğini gösterdik. Bazıları biyoinformatik ve biyolojik yöntemler kullanılarak sürecin daha da karakterizasyonu ile açığa çıkacaktır. Biz burada transkripsiyon infidelitesinin kanser üzerindeki uygulamalarına odaklanmaktayız. Ancak, sürecin genel olduğuna ve protein çeşitliliği oluşumuna katkı sağlayabileceğine inanmaktayız. Proteinlerin bu çeşitlenmesi spesifik bir protein paterninin tanınması için bağışıklık sisteminin kapasitesi üzerinde belirgin bir etki ortaya koyabilir. Bu bağlamda, transkripsiyon infidelitesinin immün rahatsızlıkların patojenezinde bir rol oynadığına inanılmaktadır. Burada transkripsiyon infidelite olaylarının tek bazın ikamesine neden olduğu düşünülmektedir. Biz tek baz ikameleri üzerine odaklandık, çünkü bu mekanizmanın mRNA yapısında büyük bir kararsızlığa (destabilizasyona) neden olma olasılığı düşüktür. Bu nedenle, tek bazlı ikameler donuşuma mudahale etmemelidir, ancak gerçekten özgün bir mesaj olarak tanınmalıdır. Transkripsiyon infidelitesinin ayrıca baz silinmesine ve/veya yerleştirilmesine neden olmasının da beklendiğini göreceğiz. Yukarıda açıklanan aynı yöntem transkripsiyon infidelitesinin alternatif mekanizmalarını tespit edecektir.

Bu uygulamada açıklanan özgün süreç çeşitli anı pratik uygulamalara sahiptir.

Hastalığa spesifik özgün biyo-işaretleyicilerin optimizasyonu ve spesifik hastalık proteinlerine yönelik hedeflenecek özgün antikorların dizaynı.

- 5 Bu uygulamanın öğretileri doğrultusunda, herhangi bir protein diziliminde transkripsiyon infidelitesinin bir sonucu olarak meydana gelebilen değişikliklerin tahmin edilmesi ve bu nedenle aşık moleküler kütleler ve izoelektrik noktalar gibi fiziko-kıymasal özelliklerdeki değişikliklerin tahmin edilmesi artık mümkündür. Bu 2-D jellerde ve kütle spektrometrisinde modifiye edilmiş protein paternleri verebilir. Transkripsiyon
- 10 infidelitesi çoğu geni etkilediği için kısıtlı bir protein seti üzerine odaklanmak ve hastalığa (örnek olarak kanser) özel biyo-işaretleyicilerin tanımlanması için değişikliklerinin karakterize edilmesi artık mümkündür. Alternatif olarak TI-proteinleri alanlarına yönelik, yani modifiye edilmiş AA ve transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan doğal proteini uzatan ilave yeni AA içeren protein alanlarına yönelik spesifik
- 15 antikorların dizayn edilmesi mümkündür. Bu alanlara yönlendirilmiş antikorlar protein varyantına özel olacak ve bu nedenle vucut sıvısı içerisinde, hücre yüzeyinde veya kanser hücreleri içerisinde mevcut hastalığa (örnek olarak kanser) özel proteinlere doğru hedeflenmiş olacaktır. Bu antikorlar vucut sıvıları içerisindeki patolojik bir durumun protein karakteristiklerinin belirlenmesi için, plazma içerisinde dolaşan
- 20 hastalıklı hücrelerin belirlenmesi için, histolojik örnekler içerisindeki hastalıklı hücrelerin belirlenmesi için, hastalık şiddetinin belirlenmesi için ve ayrıca spesifik hastalık hücrelerine yönelik ilaçların hedeflenmesi için kullanılacaktır. Bu örnek olarak adenovirusler, lipozomlar vb. gen terapi vektorleri aracılığı ile transkripsiyon infidelitesine meyilli dizilimlerin gen transferi ile başarılabılır. Alternatif olarak TI'dan
- 25 kaynaklanan bir alan ile aynı dizilime sahip olan spesifik peptidler dizayn edilmiştir. Bunlar örnek olarak vucut sıvıları içerisinde mevcut olan T1-proteinlerinin alanlarına doğru yönlendirilmiş spesifik ve doğal oto-antikorların belirlenmesi için kullanılabilir.

- Transkripsiyon infidelitesi rasgele olmayan bir şekilde meydana gelmekte ve test edilen
- 30 genlerin büyük bir kısmında mRNA stop kodonlarını sıklıkla etkilemektedir. İlaveten, verilen herhangi bir mRNA popülasyonunun %6'ya kadarının bu ilave dizilimleri içerdiği tahmin edilebildiğinden, verilen bir kanser hücresi içerisinde karboksı-terminal ucunda özgün bir dizilim ortaya koyan spesifik bir protein popülasyonu belirlenebilir. Bu nedenle bu dizilimlerin hedeflenmesi olası değildir, çünkü DNA'yı etkileyen nadir genetik

hastalıklar haricinde kanonik stop kodonlarını hemen takip eden dizilimlerin çerçeve-ıçı okunmasını sağlayabilen hiçbir süreç rapor edilmemiştir. Bu gizli dizilimlerin varlığından daha önce şüphelenilmemiştir. Kanonik stop kodonları üzerinde oluşan tek bazlı ikamelere neden olan transkripsiyon infidelitesinin keşfi, bu tür kodlama dizilimlerinin 5 varlığını ortaya koymakta ve ilaveten bu hücreler içerisinde gelişmiş transkripsiyon infidelitesi nedeniyle kanser hücreleri içerisinde artmış varlıklarını göstermektedir. Bu nedenle özgün kansere-özel ilaçların dizayn edilmesi için normalde gizli olan bu dizilimlerin belirlenmesi ve hedeflenmesi mümkündür.

10 Kodlama dizilimi üzerinde oluşan tek bazlı silme ve yerleştirme ile ilgili TI kodlama çerçevesinde bir değiş tokuşa neden olmaktadır. Bir konverjans (yakınsama) olarak, karşılık gelen protein içerisindeki dizilimler modifiye edilmektedir (AA dizilimi ve protein uzunluğunda değişiklik). Bu nedenle verilen bir kanser hücresi içerisinde özgün bir dizilim ortaya koyan spesifik bir protein popülasyonu tespit edilebilir. Bu şekilde özgün kansere 15 özel ilaçların dizayn edilmesi için bu normalde saklı olan dizilimlerin tanımlanması ve hedeflenmesi mümkündür.

Ozgün veya modifiye edilmiş protein dizilimlerinin varlığı nedeniyle ve bu değişikliklerin hücre yüzeyindeki protein üzerinde mevcut olduğu ele alındığında, hastalığa özel 20 dizilimlere karşı aşılama için bu dizilimlerin kullanılması önerilmektedir. Bu aşılar verilen herhangi bir hastalık (örnek olarak kanser) formu ile tanılanan hastalarda immün tepkilerin tetiklenmesi veya genetik yatkınlık nedeniyle veya çevresel bir toksin veya riske artan maruz kalma nedeniyle spesifik hastalıkların (örnek olarak kanser) artan gelişme riskine sahip hastalarda onleyici immün tepkilerin başlatılması için 25 kullanılacaktır.

Bu buluşun spesifik bir amacı bu nedenle bir oznede bir kanserin varlığının veya aşamasının belirlenmesi için bir yöntem ile ilgilidir ve bu yöntem bahsedilen ozneden alınan bir örnek içerisinde transkripsiyon infidelitesinin varlığının veya oranının (*in vitro* 30 veya *ex vivo*) test edilmesini içermektedir, bahsedilen varlık veya oran bahsedilen oznede bir hastalığın varlığının veya aşamasının bir göstergesidir. Örnek nükleik asitler ve/veya proteinler içeren herhangi bir doku, hücre, sıvı, biyopsi vb. olabilir. Örnek reaksiyon öncesinde seyreltme, konsantrasyon, lısız vb. ile işlenebilir. Yöntem tıpkı olarak plazma proteinleri, hücre yüzey proteinleri vb. gibi birkaç adet farklı genin veya

proteinin transkripsiyon infidelitesinin test edilmesini içermektedir.

5 Bu buluşun diğer bir amacı bir insan veya hayvanın tedavisi, özellikle kanserlerin tedavisi için bir yöntemde kullanmak için farmasotik bir kompozisyonun üretiminde bir memeli geninin transkripsiyon infidelitesi oranını değiştiren (örnek olarak arttıran veya azaltan) bir bileşiğin kullanımı ile ilgilidir.

10 Bu buluşun diğer bir amacı bir ilaç veya aday ilacın etkisinin test edilmesi için bir yöntem ile ilgilidir, bu yöntem bahsedilen ilacın bir memeli geninin transkripsiyon infidelite oranını değiştirip değiştirmediğinin test edilmesi adımını içermektedir ve bu tür bir değişiklik ilacın etkisinin bir göstergesidir.

15 Bu buluş ilaveten bir örnek içerisindeki transkripsiyon infidelitesinin tespit edilmesi veya (seviyesinin) ölçülmesi için yöntemler ve ürünler (problar, primerler, antikorlar veya bunların türevleri gibi) ile ve bunlara karşılık gelen kitleler ile de ilgilidir.

20 Bu buluş ayrıca kanser biyo-işaretleyicilerinin tanımlanması için bir yöntem ile de ilgilidir ve bu yöntem bir özünden alınan bir örnek içerisindeki bir hedef protein, RNA veya gen içerisindeki transkripsiyon infidelite alan(lar)ının varlığının belirlenmesini ve tercihe bağlı olarak bahsedilen transkripsiyon infidelite alan(lar)ının diziliminin belirlenmesini içermektedir. Spesifik ve tercih edilen bir uygulamada, hedef protein bir hücre yüzey proteini veya salgılanmış bir proteindir, özellikle bir hücre yüzey proteini veya bir plazma proteindir.

25 Bu buluşun diğer bir açıklaması bir özellik veya patolojik bir duruma özel lıgandların üretilmesi veya tanımlanması için bir yöntem ile ilgilidir ve bu yöntem bahsedilen özellik veya patolojik duruma sahip bir özünden alınan bir örnek içerisinde bir veya daha fazla hedef protein, RNA veya gen içerisindeki transkripsiyon infidelite alan(lar)ının varlığının belirlenmesini, tercihe bağlı olarak bahsedilen transkripsiyon infidelite alan(lar)ının diziliminin belirlenmesini ve bahsedilen transkripsiyon infidelite alan(lar)ına spesifik olarak bağlanan lıgand(lar)ın üretilmesini içermektedir.

Bu buluşun diğer bir açıklaması bir proteinin, özellikle bir memeli proteininin, daha tercih edilen haliyle bir insan proteininin bir transkripsiyon infidelite alanını içeren

- (sentetik) bir peptid ile ilgilidir. Bu peptid tipik olarak bir proteinin dahili bir kısmını veya bahsedilen proteinin bir C-terminal kısmının dizilimini içermektedir. Bu peptid tercihen 100, 80, 75, 70, 65, 60, 50,45,40, 35, 30, 25 veya hatta 20'den az amino asit içermektedir. Protein bir hucre yuzey proteini (ornek olarak bir reseptor vb.), salgılanmış
- 5 bir protein (ornek olarak bir plazma proteini) veya bir hucre içi protein olabilir. Bu tur plazma proteini ornekleri ornek olarak Şekil 13'te sunulmuştur ve bunlara apolipoproteinler (ornek olarak AI, AII, CI, CI I, CI 11, D,E), tumleyici bileşenler (ornek olarak C1s, C3, C7), C-reaktif protein, serpin peptidaz inhibitörler, fibrinogen (ornek olarak FGA1, FGA2), plazminogen, transferin, transhretin vb. dahildir. Hucre yuzeyi reseptor
- 10 orneklerine ornek olarak sitokin reseptorleri ve hormon reseptorleri vb. dahildir. Spesifik bir uygulamada, bu buluş yukanda listelendiği uzere bol miktarda mevcut olan bir insan plazma proteininin veya hucre yuzey reseptorunun bir transkripsiyon infidelite alanını içeren sentetik bir peptid ile ilgilidir.
- 15 Bu tur peptidlerin spesifik ornekleri Şekiller 10, 14 ve 18'de açıklanmaktadır. Daha spesifik olarak, bu buluşa ait sentetik peptid ornekleri aşağıdaki amino asit dizilimlerinin (sekanslarının) tamamını veya bir kısmını içermektedir:

QMWQLEWYIHLSS (TPT1) (SEQ ID NO: 1) KLHTLSAAIYYQQE (VIM) (SEQ ID NO: 2)
 DFLSNK (RPS6) (SEQ ID NO: 3) MYTVEFSVHKNN (RPL7A) (SEQ ID NO: 4) NGSLGMSDLCT (RPS4X) (SEQ ID NO: 5) ASG (FTH1) (SEQ ID NO: 6) EPSEPSDF (FTL) (SEQ ID NO: 7)
 APSIFPTLPAKPGTKQPRSPVTALSLHMLLMVSSAPSCGLIQTVSSFTVYIFTL (TPI1) (SEQ ID NO: 8) ARHGRDEEVWHRKSHHFEVQAWAWVGGGLVCWPRKCHMRSTLISSLDLSLLFVIPHRTEAEWVV VMFDRRH (AHSG) (SEQ ID NO: 9)
 RSKAYSSVFLERWCKANTLSKKHKFL (ALB) (SEQ ID NO: 10) GLDSTRALENEMTV (APCS) (SEQ ID NO: 11)
 GARRRPPSRCSE (APOA1) (SEQ ID NO: 12) SVQTIVFQPLASRTPTGQS (APOA2) (SEQ ID NO: 13)
 IVFQPLASRTPTGQS (APOA2) (SEQ ID NO: 14) QDPFSDVKGRVPYSPDPFGSD (APOC2) (SEQ ID NO: 15)
 DPPSVDKGRVPYSPD (APOC1) (SEQ ID NO: 16) DLNTPSPPAYPSCCELLGSCNLQGCPCRLKRDLSLSALLPHLMGPPPGMLASQ (APOC3) (SEQ ID NO: 17)
 PGSTGRHLPHLVTSASLSPTPPPHKDKPINHDKGS (APOD) (SEQ ID NO: 18) TPKPAAMRPHATPCLLPFRSLQRETLSPQPSWGGP (APOE) (SEQ ID NO: 19)
 EARVGGNVGSQTQ (AZGP1) (SEQ ID NO: 20) PSVLHTARGPRMPRPLAPAGREPDHLPC (CHI3L1) (SEQ ID NO: 21)
 DVDVAFAPTGAESSSPQDELQPPRESSARHQVTRPQPPGPQLRPASPRSGSCTLTLDSAANGK NRIAPACN (CLU) (SEQ ID NO: 22)
 NVIPLKRKMNTLN (HRG) (SEQ ID NO: 23) TPAARLMWSSNMPYFAQKTAKDMTSSWLQPRFIFLEVVN (IGFBP3) (SEQ ID NO: 24)
 GWGVFLLNPMAGGHAPTIISWEERQSWEIDGSHSSLLSLLCLWATLPTPLLSQ (INHA) (SEQ ID NO: 25)
 TGPTHHSPPSPSISTWCLVPVHSVNNKP (KLK1) (SEQ ID NO: 26) WTPEPLLQPLSHPLPPAHPLGQQL (PKM2) (SEQ ID NO: 27)
 LDGRQSDALHLEAGTWVGI (PLG) (SEQ ID NO: 28) SLPSSSGALSKELGMQAGCLGLWAQPGPCAPSGHGMCPVCLSLGSDSLCSSHMRGPWTLO SGGSWAS (SERPINA3) (SEQ ID NO: 29)
 NLRGRAATKVKMGTMHEFALVSLAQVVCANHVCLHSSVLPCVLNKK (TF) (SEQ ID NO: 30)
 GPAPPRPAPAGPAPPRPAPAALEPMGAVFKOTRAPSPPGAPLKMERGLRISVSLGACLGSPSLTF PHSLSLSPLCLLLPVCTIPLPGIKAQGTSGEHCYS (TGFB1) (SEQ ID NO: 31)
 GTSPFVOLKDEGWDFM (TTR) (SEQ ID NO: 32)

Bu buluşun diğer bir açıklaması yukarıda tanımlandığı gibi bir immunojen olarak bir transkripsiyon infidelite alanını içeren bir peptidin kullanımı ile ilgilidir. Bu buluş ayrıca yukarıda tanımlandığı gibi bir transkripsiyon infidelite alanını içeren bir peptidi ve tercihe bağlı olarak uygun bir taşıyıcı, eksipiyen ve/veya adjuvan içeren bir aşıyı da açıklamaktadır.

Bu buluş ayrıca bir destek üzerinde hareketsiz hale getirilmiş olan ve spesifik olarak bir transkripsiyon infidelite alanına bağlanan bir reaktif içeren bir cihaz veya ürünü de açıklamaktadır. Reaktif örnek olarak bir prob veya bir antikor veya bunların türevi olabilir.

Bu buluş örnek olarak proliferatif bozukluklar (örnek olarak kanserler), immün hastalıklar (örnek olarak oto-immün hastalıklar (çoklu skleroz, ALS), graft reddi), yaşlanma, inflamatuvar hastalıklar, diyabetler ve benzeri gibi transkripsiyon infidelitesi oranının artması veya azalması ile ilişkili çeşitli patolojik durumların tespit edilmesi, izlenmesi veya tedavi edilmesi için ve/veya terapötik olarak aktif ilaçların üretilmesi, dizayn edilmesi veya taranması için herhangi bir memeli özne üzerinde, özellikle herhangi bir insan özne üzerinde kullanılabilir. Bu buluş ayrıca prokaryotik hücreler, alt okaryotik hücreler (örnek olarak maya), böcek hücreleri, bitki hücreleri, mantar vb. gibi herhangi bir diğer hücre türünde transkripsiyon infidelitesinin tespit edilmesi, izlenmesi, module edilmesi veya hedeflenmesi için de kullanılabilir.

Transkripsiyon infidelite alanlarını hedefleyen ajanların üretimi ve kullanılması

Bu buluşun öğretilerini kullanarak, örnek olarak bir transkripsiyon infidelite alanı içeren proteinlere veya nükleik asitlere veya bu tür protein veya nükleik asitleri içeren veya eksprese eden hücrelere veya dokulara bağlanan transkripsiyon infidelite alanlarını hedef alabilen ajanların üretilmesi mümkündür. Hedefleme ajanı yukarıda açıklandığı gibi bir antikör (veya bir türevi), bir prob, bir primer, bir aptamer vb. olabilir.

Bu tür hedefleme ajanları örnek olarak bir örnek, doku, özne vb. içerisindeki transkripsiyon infidelitesinin tespit edilmesi, izlenmesi ve benzerleri için tanılama ajanları olarak kullanılabilir. Bu amaçla, ajan bir radyo-etiket, bir enzim, bir floresan etiket, ışıdayan (luminesan) bir boya vb. bir etiketleme kısmı ile bağlı olabilir.

Hedefleme ajanları ayrıca örnek olarak anormal transkripsiyon infidelitesi ortaya koyan bir hücre veya doku veya organizmanın tedavi edilmesi için terapötik bir molekül olarak da kullanılabilir. Ajan bu şekilde veya tercihen toksik bir molekül, bir ilaç vb. gibi aktif bir molekül ile bağlanmış olarak kullanılabilir.

Bu buluşun spesifik bir uygulaması bu nedenle transkripsiyon infidelitesini hedefleyen bir ajanın bir üretim yöntemini açıklamaktadır ve bu yöntem (i) bir protein veya nükleik asidin bir transkripsiyon infidelite alanının tanımlanmasını ve (ii) bahsedilen alana seçici olarak bağlanan bir ajanın üretilmesini içermektedir. Transkripsiyon infidelite alanı örnek olarak verilen bir RNA molekülü için mevcut dizilimler hizalanarak ve özellikle 3' ucundaki dizilim

varyasyonları belirlenerek tanımlanabilir. Transkripsiyon infidelite alanları ayrıca herhangi bir gen dizilimine bu uygulamada açıklandığı gibi (bakınız örnek olarak Örnek 5) transkripsiyon infidelitesi kuralları veya ileride açıklanacak yeni kurallar uygulanarak da tanımlanabilir. Bahsedilen tanımlanmış alanı içeren peptid veya nükleik asit molekulu daha sonra konvansiyonel yöntemler kullanılarak üretilir. Tercih edilen bir uygulamada yöntemin (i) adımı bir salgılanmış veya hücre yüzey proteininin (örnek olarak bir reseptör vb.) veya bir nükleik asidin bir transkripsiyon infidelite alanının tanımlanmasını içermektedir. Aslında, bir hücreye temas ettirilmiş veya bir özneye verilmiş bir hedefleme ajanı kullanılarak salgılanan proteinler veya hücre yüzey proteinleri kolaylıkla hedeflenebilir. Bu tür TI-proteinlerinin alanlarının örnekleri örneklerde açıklanmaktadır.

Bir TI-proteininin alanına karşı bir immün tepkiye neden olan veya uyaran veya engelleyen bir aşının üretilmesi ve kullanılması

Bu buluşun öğretisi kullanılarak, TI-proteinlerine karşı veya bu tür TI-proteinlerini veya karşılık gelen nükleik asitleri içeren veya eksprese eden hücreler veya dokulara karşı bir immün tepkiye neden olan veya engelleyen bir aşı bileşiminin üretilmesi mümkündür.

Tipik olarak aşı kompozisyonu bir immünojen olarak bir transkripsiyon infidelite alanının dizilimini içeren bir molekül içermektedir. Aşı kompozisyonu herhangi bir farmasötik olarak kabul edilebilir taşıyıcı, eksipryan veya adjuvan içerebilir. Aşı kompozisyonu, TI-proteinleri eksprese eden hastalıklı bir hücre veya dokuya karşı, bahsedilen hücre veya dokunun bağışıklık sistemi tarafından yok edilmesi ile sonuçlanan bir immün tepki üretilmesinde kullanılabilir. Alternatif olarak, aşı kompozisyonu oto-immün rahatsızlıklarda mevcut olan transkripsiyon infidelite alanlarına karşı bir tolerans oluşturulması için kullanılabilir.

Bu buluşun spesifik bir uygulaması bu nedenle TI-proteinlerinin bir alanına karşı bir immün tepkiye neden olan, uyaran veya engelleyen bir immünojenin bir üretim yöntemini açıklamaktadır ve bu yöntem (i) bir protein veya nükleik asidin bir transkripsiyon infidelite alanının tanımlanmasını ve (ii) bu tür bir alanı veya bir varyantını içeren bir peptidin üretilmesini içermektedir. Transkripsiyon infidelite alanı örnek olarak verilen bir RNA molekulu için mevcut dizilimler hızalanarak ve özellikle 3' ucundaki dizilim varyasyonları belirlenerek tanımlanabilir. Transkripsiyon infidelite alanları ayrıca herhangi bir gen dizilimine bu uygulamada açıklandığı gibi (bakınız örnek olarak Örnek 5) transkripsiyon

infidelitesi kuralları veya ileride açıklanacak yeni kurallar uygulanarak da tanımlanabilir. Bahsedilen tanımlanmış alanı içeren peptid molekulu daha sonra konvansiyonel yöntemler kullanılarak üretilebilir. Tercih edilen bir uygulamada yöntemin (1) adımı bir salgılanmış veya hücre yüzey proteininin (örnek olarak bir reseptör vb.) veya bir nükleik asidin bir transkripsiyon infidelite alanının tanımlanmasını içermektedir. Aslında, salgılanmış proteinler ve hücre yüzey proteinleri bağışıklık sistemi tarafından bir tepkiye daha fazla maruzdurlar. Bu tür TI-proteinlerinin alanlarının örnekleri örneklerde açıklanmaktadır.

Rekombinant Protein Üretim Sistemlerinde Transkripsiyon İnfidelitesinin Azaltılması

Bu buluşun spesifik bir açıklaması rekombinant üretim sistemlerinde, özellikle terapötik protein üretim sistemlerinde meydana gelebilecek transkripsiyon infidelitesinin onlenmesi veya azaltılması için bir yöntem ile ilgilidir. Aslında, bu tür bir transkripsiyon infidelitesi sistemin üretim miktarını düşürebilir veya çeşitli faaliyet profilleri ortaya koyabilen karakterize edilmemiş proteinler üzerinde karışımların üretimi ile sonuçlanabilir. Bu nedenle bakteriyel üretim sistemleri (eğer transkripsiyon infidelitesi kuralları prokaryotik sistemler için aynı ise), okaryotik üretim sistemleri (örnek olarak mayalar, memeli hücreleri vb.) gibi rekombinant üretim sistemlerinde transkripsiyon infidelitesinin oluşumunun veya oranının azaltılabilmesi tavsiye edilmektedir ve yüksek değerdedir. Bu tür bir azaltma işlemi örnek olarak kodlama yapan nükleik asit molekulunun dizilimi uyarlanarak ve/veya transkripsiyon infidelitesi yolu ile üretilen RNA molekülleri engellenerek başarılabılır. Alternatif olarak, transkripsiyon infidelite alanları içeren proteinler ortamda uzaklaştırılabilir.

Bir gen için Transkripsiyon İnfidelitesine hassasiyetin azaltılması

Bu buluşun spesifik bir açıklaması bir gen içerisinde oluşabilecek TI'nın onlenmesi veya azaltılması için bir yöntem ile ilgilidir. Aslında, bu tür TI bir proteinin ekspresyonunu veya aktivitesini etkileyebilir veya çeşitli faaliyet profilleri ortaya koyabilen karakterize edilmemiş proteinlerin karışımlarının üretilmesi ile sonuçlanabilir. Bu nedenle, bahsedilen gen için TI'nın ortaya çıkışının veya oranının azaltılabilmesi tavsiye edilmektedir ve yüksek değerdedir. Bu tür bir azaltma işlemi örnek olarak genin dizilimi modifiye edilerek (gen terapisi) ve/veya transkripsiyon infidelitesi tarafından oluşturulan RNA molekülleri engellenerek gerçekleştirilebilir. Alternatif olarak, TI alanlarını içeren proteinler spesifik olarak bozunabilirler (örnek olarak bozunma için

ozellikle hedefleme).

RNA seviyesinde transkripsiyon infidelitesinin ölçülmesi.

Transkriptomik en yaygını kanser olan çeşitli patolojik durumlarda oluşan RNA (tercihen mRNA) seviyelerindeki değişimleri ölçen bilimdir. Transkriptomik önceden tanımlanmış bir alt kumesini tanımlayan spesifik bir oligonukleotid seti ile cDNA'nın hibridizasyonuna dayanmaktadır. Hibridizasyon verimliliği cDNA'ya ters kopyalanacak olan herhangi bir RNA'nın spesifik dizilimlerine bağlıdır. Verilen bir RNA içerisindeki şüphelenilmeyen dizilim varyasyonlarının oluşması hibridizasyonun verimini düşürecek ve bu nedenle transkriptomik çipler tarafından alınan sinyallerde değişikliğe neden olacaktır. Transkripsiyon infidelitesinin RNA baz diziliminde değişikliğe neden olduğunun keşfi iki birincil sonuca sahiptir: birincisi, transkripsiyon infidelitesinden dolayı baz yanlış eşleşmesi sonucu minimize etmek için transkriptomik çiplerin optimizasyonuna olanak verir ve bu şekilde transkriptomik deneyin hassasiyetini artırır. Aslında, transkriptomik deneylerin mevcut kısıtlaması çalışmalar arasında yeniden üretilebilirliğin olmamasıdır. Bahsedilen varyasyonun büyük kısmının transkripsiyon infidelitesinden kaynaklandığına inanmaktayız. Yukarıda açıklandığı üzere transkripsiyon infidelitesinin kurallarının anlaşılması, normal veya hastalıklı hücrelerden elde edilen herhangi bir cDNA karışımı içerisindeki transkripsiyon infidelitesi oranını spesifik olarak ölçen mikro-dizi çiplerin dizaynına artık olanak vermektedir. RNA seviyesinde transkripsiyon infidelite oranının takip edilmesi verilen herhangi bir hücre içerisinde oluşan transkripsiyon infidelitesinin nispi oranının yüksek verimli taranmasına olanak vermektedir. Bu hastalığın şiddetinin belirlenmesi, terapötik stratejilerin tanımlanması ve farmakolojik duyarlılaşma (sensitizasyon) profillerine göre hastalıklı hücrelerin sınıflandırılması için temel bilgileri sağlamaktadır. Aynı tarama örnek olarak kanser terapisinde özgün ilaçların etkisinin test edilmesine de olanak vermektedir.

Transkripsiyon infidelitesinin diğer uygulamaları

Transkripsiyon infidelitesi sağlam kurulmuş genetik koda çeşitlilik ekleyen yeni keşfedilmiş doğal bir mekanizmadır. Transkripsiyon infidelitesinin düşük oranlarda da olsa normal dokularda bile olduğu gözlemlenmiştir. Transkripsiyon infidelitesinin genom içerisinde tanımlanan genlerin nispeten düşük miktarının açıklanmasına ve biyolojik sınırlar ile dokuların canlı hücreleri içerisinde mevcut olan proteinlerin çok daha fazla olan çeşitliliğinin açıklanmasına katkıda bulunduğunu önermekteyiz.

- Transkripsiyon infidelitesinin immunolojik seviyede spesifik bir işleve sahip olduğunu onermekteyiz. Ayrıca bağışıklık sisteminin en azından kısmen kendini tanımlamak için tercihen spesifik genleri etkileyen, verilen bir orandaki transkripsiyon infidelitesi oranına dayandığını da onermekteyiz. Bu nedenle, henüz bilinmeyen nedenlerle ortaya çıkan transkripsiyon infidelitesi oranındaki anormallikler belirli immun tepkileri tetiklemeye katkıda bulunuyor olabilir ve oto-immun ve alerjik hastalıkların patojenezine katkıda bulunuyor olabilir. Transkripsiyon infidelitesindeki bireysel-arası farklılıklar da bağışıklık sisteminin genlerinin polimorfizmi tarafından koşullandırılıyor, bu nedenle bağışıklık sisteminin dolaşan hücrelerinde ortaya çıkan transkripsiyon infidelitesi oranını belirliyor olabilir, örnek olarak T veya B lenfositleri, ve ayrıca graftların donör ve alıcılarının uygunluğunun değerlendirilmesine ve hastalıkların konakçı şiddetine karşı graft şiddetinin belirlenmesine katkıda bulunuyor olabilir.
- Ayrıca transkripsiyon infidelitesinin normal yaşlanma süreci içerisinde daha büyük bir oranda meydana geldiğini varsaymaktayız. Bu durum genel olarak tüm enzimleri ve en spesifik olarak hücre replikasyonu, DNA onarımı ve normal transkripsiyon infidelitesi oranının sürdürülmesinde görevi bulunan proteinleri etkileyen, performansta zamanla düşüş durumları yaratacaktır. Yukarıda açıklanan konsept bu nedenle araştırmayı yaşlanma mekanizmalarına doğru yeniden yönlendirebilir. Bu nedenle mRNA ve cDNA dizilimleri için taramaya izin veren biyokimyasal, proteomik, transkriptomik ve diğer yöntemler ve DNA tarafından belirlenen fidelite verilen bir şahısta oluşan transkripsiyon infidelitesi oranının nicel hale getirilmesi için kullanılabilir. Transkripsiyon infidelitesi oranını düşüren özgün moleküllerin test edilmesi bu nedenle biyolojik taramadan etkilenecek ve yaşlanma oranını düşüren ilaçların geliştirilmesine neden olacaktır.

Bu buluşun diğer yönleri ve avantajları buluşu örneklerle gösteren ve bu uygulamanın kapsamını kısıtlamayan aşağıdaki deneysel bölümde açıklanacaktır.

Deneysel Bölüm

Örnek 1. Tipik cDNA kütüphanesi oluşturma ve dizilim prensibi (bakınız Şekil 1)

Tümleyici bir DNA (cDNA) kutuphanesi hazırlamanın birinci adımı olgunlaşmış mRNA'nın

ilgili hucre veya dokudan izole edilmesidir. Poli(A) kuyruklarından dolayı, bir matrise kovalent olarak bağlanmış tumleyen oligo dT ile hibridizasyon vasıtası ile tum hucre mRNA'larının bir karışımının elde edilmesi basittir. Bağlanmış mRNA daha sonra düşük bir tuz tamponu ile ayrıştırılır. Daha sonra mRNA'nın poli(A) kuyruğunun, mRNA şablonundan tumleyici bir DNA kolu sentezleyen bir enzim olan bir ters transkriptazın varlığında oligo dT ile hibritleşmesine olanak verilir. Bu orijinal mRNA şablonunu içeren çift kollu nükleotidler ve onun tumleyici DNA dizilimini verir. Sonrasında RNA kolu alkali işlemi ile veya RNase H'nin faaliyeti ile uzaklaştırılarak tek kollu DNA elde edilir. Daha sonra terminal transferaz olarak adlandırılan ve bir şablona ihtiyaç duymayan ancak her bir cDNA kolunun serbest 3' ucuna deoksiligonükleotid ekleyen bir DNA polimeraz olan bir enzimin faaliyeti vasıtası ile tek kolu DNA'nın 3' ucuna bir seri dG eklenir. Oligo dG'nin orijinal cDNA kolunun tumleyicisi olan bir DNA kolu olan DNA polimeraz vasıtası ile, sentezleme için bir primer olarak hareket eden oligo dC ile hibritleşmesine izin verilir. Bu reaksiyonlar orijinal preparasyonda bulunan mRNA moleküllerine karşılık gelen tam bir çift kollu DNA molekulu üretmektedir. Bu çift kollu DNA moleküllerinin her biri yaygın olarak cDNA olarak adlandırılmaktadır ve her biri bir uçta bir oligo dC – oligo dG çift kolu ve diğer uçta bir oligo dT – oligo dA çift kol bölgesi içermektedir. Bu DNA daha sonra kısıtlama alanlarında metilasyon ile korunmaktadır. Kısa kısıtlama bağlayıcıları daha sonra her iki uçta bağlanmaktadır. Bunlar belirli bir kısıtlama enzimi için tanıma alanları içeren çift kollu sentetik DNA segmentleridir. Lıgasyon (bağlama) işlemi, "kor uçlu" çift kollu DNA moleküllerini birleştirebilen bakteriyofaj T4'ten DNA lıgaz ile gerçekleştirilmektedir. Sonuçta ortaya çıkan, her ucunda bir kısıtlama alanına sahip, kor uçlu çift kollu DNA daha sonra yapışkan bir uç oluşturan bir kısıtlama enzimi ile işleme tabi tutulmaktadır. cDNA kutuphanelerinin oluşturulmasındaki nihai adım kısıtlama bolunmesine tabi tutulmuş çift kolun bir bakteriyum içerisinde transfekte edilmiş spesifik bir plazmid ile lıgasyonudur. Daha sonra rekombinant bakteriler bir plazmid kutuphanesi oluşturmak üzere büyütülmektedir – plazmidin spesifik antibiyotik direncine karşılık gelen antibiyotiklerin varlığında. Her bir klon mRNA'nın tek bir parçasından türetilen bir cDNA taşımaktadır. Bu klonların her biri daha sonra izole edilmekte ve klasik dizilim yöntemleri kullanılarak dizilmektedir (sekanslanmaktadır). Tıpkı bir dizilim işlemi yerleştirme alanında başlamakta ve her bir klon için 400 ila 800 arasında baz çift dizilimi vermektedir. Bu dizilim, dizilimin ikinci defa yapılmasının başlangıcı için bir şablon görevi görmektedir. Bu ileri doğru ilerleme tum plazmid yerleşiminin aşamalı dizilimine gitmektedir. Çeşitli cDNA olarak belirlenmiş EST'lerin

dizilmesinin sonuçları çeşitli açık veri tabanlarında bırakılmıştır.

Örnek 2. Veri tabanının açıklanması

EST veri tabanları cDNA kutuphanelerinden elde edilen cDNA dizilimlerine karşılık gelen
5 dizilim bilgilerini içermekte ve bu nedenle temelde bu kutuphanelerin oluşturulmasında
kullanılan dokuların içerisinde verilen herhangi bir zamanda mevcut olan ayrı
mRNA'ların dizilimine karşılık gelmektedir. Bu dizilimlerin kalitesi çeşitli nedenlerle
sorgulanmaktadır. İlk olarak, yukarıda açıklandığı gibi, cDNA kutuphanelerinin
10 oluşturulma süreci başlangıçta okaryotik mRNA'nın 3' ucundaki bir poli(A) kuyruğunun
varlığına büyük oranda bağlıdır. İkinci olarak, mRNA'lar RNase'ler olarak adlandırılan bol
miktardaki nukleazlar tarafından kolaylıkla sindirilebilen oldukça kırılgan moleküllerdir.
Uçuncusu, bu kutuphaneler oluşturulup dizilirken, kullanılan orijinal malzemenin
kalitesine ve depolanmasına az önem verilmiştir. Bu nedenle EST dizilimleri genomik
bilgilerin (notlarla) açıklanması için, yani tanımlanmış ve tam olarak dizilmiş bir genomik
15 DNA segmentinin herhangi bir spesifik mRNA'yı kodlayıp kodlamadığının belirlenmesi
için kullanılmıştır. Bu bağlamda, kodlama yapan genomik dizilimlerin tanımlanması için
EST dizilimleri faydalı olmuştur. Ancak EST diziliminin kendisinden doğan bilgilere az
dikkat edilmiştir. Aslında, bu pozisyonun desteği altında güçlü teknik argümanlar ile
DNA genomik diziliminin çok daha fazla güvenilir olduğu düşünülmektedir. EST
20 dizilimleri içerisindeki çeşitliliklerin biyolojik, analitik veya klinik olarak ilgili bilgiler
içerebileceğini tahmin ediyoruz. Gerçekte, EST veri tabanları hepsi çeşitli yöntemler
kullanan birkaç adet araştırmacı tarafından oluşturulmuştur: bu bizim her bir
metodolojik eğilimin belirli bir sayıda hataya sahip bir arka plan gürültüsüne katkıda
bulunmuş olabileceğini düşünmemize sebep olmaktadır. Ancak, eğer hatalardaki farklar
25 kutuphanenin oluşturulmasında kullanılan malzemenin kaynağından dolayı oluşsaydı,
hata oranındaki fark doğrudan altında yatan kaynak ile ilişkili olurdu.

Bunun test edilmesi için NCBI ftp sitesinde mevcut olan **est_human** veri tabanını
aldık. Bu veri tabanlarını seçtik, çünkü bu dizilimler insan veya biyo-enformatik araçları
30 tarafından açıklanmamış veya tedavi edilmemişti.

Bir EST'nin kanserli bir dokudan mı yoksa normal bir dokudan mı elde edildiğini
belirlemek üzere bir kutuphane tanımlama sistemi kullanılmıştır. Her bir kutuphane
normal veya **kanserli** olarak etiketlenmiştir. Her bir EST'nin erişim numarası ile

karşılık gelen kutuphanenin tanımlayıcısı eşleştirilerek 2.6 milyon EST kanserli dokulardan elde edilmiş olarak ve 2.8 milyon EST ise normal dokulardan elde edilmiş olarak sınıflandırılmıştır.

5 EST hizalamalarının elde edilmesi için kamuya açık olarak mevcut olan megaBLAST2.2.13 yazılımı (Basic Local Alignment Search Tool, Zheng Zhang, A greedy algorithm for-nucleotide sequence alignment search, J Comput Biol, 2000) kullanılmış ve aşağıdaki seçim parametreleri belirlenmiştir:

- 10 - d est_human: aranacak veri tabanı (dbEST'den tüm insan EST'leri),
- i sequences.fasta : bol miktarda eksprese edilen genlere (***Şekil 2***) karşılık gelen referans dizilimini içeren FASTA dosya formatı,
- D 2 : geleneksel blast çıktısı,
- q -2 : bir nukleotid yanlış eşleşmesi için skor -2,
- 15 - r 1 : tek bir nukleotid eşleşmesi için skor 1,
- b 100000 : hizalamanın rapor edildiği dizilimlerin maksimum sayısı,
- p 90 : EST ile referans dizilim arasındaki minimum yüzde tanımlaması,
- S 3 : referans dizilimleri ile eşleşen EST'leri hesaba katar,
- W 16 : hizalama uzantısı ile başlamak için en mükemmel eşleşmenin uzunluğu
- 20 - e 10 : Beklenti değeri (E-değeri), Karlin ve Altschul (1990) stokastik modeline göre verilen bir dizilim ve verilen bir veri tabanı için sadece şansla bulunması beklenen hizalama sayısı,
- F F : referans dizilimi filtrelenmemekte.
- o NonFiltre_test_90.out: megaBLAST rapor çıktı dosyası
- 25 - v 0 : tek satır açıklama için gösteren dizilimlerin maksimum sayısı,
- R T : (Doğru için T) : megaBLAST çıktısının sonundaki kayıt (log) bilgisini raporla,
- I T : GI'leri define içerisinde göster [T/F]

30 Blast için komut satırı:

megablast -d est_human -i C:\SeqRef\TPT1\sequences.fasta

- o C:\blast\NonFiltre_test_90.out -R T -D 2 -I T -q -2 -r1 -v 0 -b 100000 -p 90.00 -S 3 - W 16-e 10.0-FF

Şekil 2 (a-q) analiz için kullanılan 17 dizilimi göstermektedir; blastın bozulmasının önlenmesi için mRNA referans dizilimlerinin poliA kuyrukları sistematik olarak uzaklaştırılmıştır.

- 5 Şekil 2r dizilim varyasyonlarının oluşumunun test edilmesi için kullanılmış olan genlerin bir listesini sunmaktadır.

Örnek 3. Normal ve kanser orijinli EST'ler arasındaki dizilim varyasyonlarının tanımlanması.

10

Veri tabanı içerisindeki geniş temsillerine dayanarak 17 gen seçilmiştir. Her bir EST dizilimi daha sonra Mega BLAST kullanılarak NCBI'dan işlenmiş mRNA referans dizilimine (RefSeq) karşı hizalanmıştır. Bu verilen herhangi bir bazın bu pozisyona eşleşen EST'lerin sayısı ile tanımlandığı bir metris oluşturmaktadır. Daha sonra verilen herhangi bir pozisyonda RefSeq'ten sapan EST'lerin oranı ölçülmüştür. Doku orijinine göre hizalanmış EST dizilimlerinin karşılaştırılması kanserli veya normal grup içerisindeki her bir baz pozisyonunda oluşan dizilim varyasyonlarının belirlenmesine yol açmıştır. Şekil 4 seçilen 17 gen için normal ve kanserli setler içerisinde oluşan bu varyasyonların grafik bir temsili sunmaktadır. Verilerin görsel incelemesi dizilim varyasyonunun en sık olarak kanserli grupta meydana geldiğini ve ilaveten bu olgunun en baskın olarak spesifik mRNA alanlarında görüldüğünü ortaya çıkarmıştır. Gözlemlerin çoğunluğu mRNA diziliminin başlangıcından en az 400-500 baz sonra, yani ağırlıklı olarak genin 3' kısmında konumlanmıştır. Bu çok yüksek sayıdaki varyasyonlar SNP'ler ile açıklanamamaktadır. Varsayılan SNP'ler (□) ve biyolojik olarak doğrulanmış SNP'ler (O) grafikte gösterilmektedir; bu SNP'ler NCBI veri tabanından elde edilmiştir (dbSNP, build 126, Eylül 2006) (Sherry, S. T., ve diğerleri (2001) Nucleic Acids Res 29, 308-11). EST varyasyonlarına yol açan hem varsayılan hem de biyolojik olarak doğrulanmış SNP'ler (n=442) diğer analizlere dahil edilmemiştir (bu nedenle RNA düzenleme alanları da (yanlış SNP'ler) hariç tutulmuştur).

15

20

25

30

Bu analizin bir sonraki adımı kanserli ve normal EST'ler arasında oluşan dizilim varyasyonlarındaki farkların istatistiksel öneminin test edilmesidir. Her bir pozisyon için iki taraflı oran testi kullanılarak RefSeq bazının normal ve kanserli gruplar arasındaki

diğer uç baza oranı karşılaştırılmıştır. Aşağıdaki koşulların sağlanması koşulu ile bu test sistematik olarak uygulanmıştır: $n > 70$ ve $(n_i \cdot n_j) / n > 5$ $i=1,2$; $j=1,2$ (n = bir gen için kanserli ve normal EST'lerin sayısı), n_1 = kanser EST'lerin sayısı; n_2 = normal EST'lerin sayısı, n_1 =RefSeq'e sahip EST'lerin sayısı, n_2 = bir ikameye sahip olan EST'lerin sayısı).

- 5 Karşılık gelen P-değeri 0.05'ten düşük olduğunda istatistiksel bir testin %5 eşik seviyesinde pozitif olduğu söylenmektedir; bu durumda farksızlık hipotezi (yani her iki oran aynıdır) reddedilmektedir.

- 10 İlaveten, tek taraflı oran testini takip eden ikisi değişkenliğin daha büyük olduğu sette hassasiyeti arttırmak üzere ele alınmıştır. Birincisi istatistiksel test pozitif iken her iki grupta değişkenliklerin farklı olduğu sonucuna varılmasına olanak vermiş, sonrasında bu durumda değişkenliğin kanser seti içerisinde istatistiksel olarak daha büyük olup olmadığını olmuştur. Bunun aksine, ikinci test değişkenliğin normal set içerisinde belirgin şekilde daha yüksek olduğu önermesini doğrulamıştır. İki taraflı testlerden aynı
- 15 koşulların karşılandığı her seferinde her iki tek taraflı test gerçekleştirilmiştir.

- Şekil 3 tıpkı blast sonuçlarının bir açıklamasını sunmaktadır. Şekil 5a ve 5b'de gösterildiği üzere, temsili gen TPT1 için, gen üzerinde verilen herhangi bir pozisyonundaki EST'lerin sayısı hem kanser hem de normal gruplarda aynıdır. Şekil 5c olası 830 oran testinden
- 20 489'unun atanan kriterleri karşıladığını göstermektedir. %5 seviyesinde istatistiksel olarak önemli olan oran testleri Şekil 5d'de gösterilmektedir. Location Based Estimator (Konum Bazlı Tahmin Edici) (C.Dalmasso, P.Broet (2005) Journal de la Societe Francaise de Statistique, cilt 146, n1-2, 2005) ile tanımlanmış olan çoklu testlerden kaynaklanan tahmini bir hata hesaplanabilir. 26 oran testi şekil 5d'deki normal dokularda ($N > C$)
- 25 oluşan baz ikamelerinden dolayı pozitifdir ($n=26$; LBE=33). Bu kanser grubundaki ($C > N$) dizilim varyasyonları nedeniyle oluşan istatistiksel olarak önemli oran testlerinin toplamı ile zıtlık ortaya koymaktadır ($n=145$; LBE=15). Benzer bir analiz ikinci bir gen olan VIM için gerçekleştirilmiştir (**Şekil 5e-5h**). Yine verilen herhangi bir gen pozisyonundaki EST'lerin sayısı kanser ve normal gruplarda üst üste eklenebilmektedir. 1847 oran
- 30 testinden 752'si kriterler ile eşleşmiştir. Yine, pozitif oran testlerinin sayısında büyük bir fark gözlenmiştir: $n=78$ varyasyon normal gruptan (LBE=50) dolaydır ve $n=269$ varyasyon kanser grubundan (LBE=24) dolaydır. EST veri tabanında bolca bulunan 17 gen üzerinde aynı analiz tekrarlanmıştır. **Şekil 5i** elde edilen istatistiksel sonuçların bir özetidir. Test edilen 17 genden 15'i kanser dokularından elde edilen EST'lerde daha

buyuk dizilim varyasyonları ortaya koymaktadır (**Şekil 5j**). Bu aşamada, istatistiksel analizler istatistiksel testlerin kısıtlamalarından dolayı her bir genin sadece %9'u ıla %91'ını (ortalama %32) kapsamaktadır.

- 5 Analizlerin bu birinci aşamasının sonucu, mRNA'ların ekstrakte edildiği dokunun kaynağına göre (normale karşı kanserli) karşılaştırıldığında aynı genin EST'lerinin farklı olduğudur. EST dizilim varyasyonlarını veren teknik hata oranının normal ve kanserli orijine sahip dokulara göre farklı olmadığı tahmin edildiğinde ve test edilen 17 genden 15'inin dokunun kaynağından dolayı dizilim varyasyonları ortaya koymaları gerçeği göz
- 10 onune alınarak, bu farkların doğrudan EST'lerin üretildiği hücrelerin durumundan (normale karşı kanserli) kaynaklandığını one surmekteyiz.

- Yerleştirme ve silmelerin incelenmesi için benzer deneyler gerçekleştirilmektedir. F3 filtresi uygulandıktan sonra sonuçlar elde edilmektedir (bakınız Örnek 4). Biyolojik olmayan olayların (dizilim hataları, Megablast yanlış hizalama) önüne geçilmesi için
- 15 daha sıkı bir koşul kullanılmıştır: bir aralık veya bir yerleştirme sadece eğer - 10/+10'luk bir pencere içerisinde hiçbir diğer modifikasyon mevcut değilse düşünülmüştür. Her bir pozisyon için, yukarıda açıklandığı gibi bir iki taraflı test kullanılarak normal ve kanserli gruplar arasında silmeye (deletion) (veya yerleştirmeye
- 20 (insertion)) sahip pencerelerin diğer pencerelere oranı karşılaştırılmıştır. **Şekil 5k** elde edilen istatistiksel sonuçların bir özetidir. Test edilen 17 genden 14'u (yerleştirme için 10'u) kanserli dokulardan elde edilen EST'lerde daha büyük dizilim varyasyonları (silmeler veya yerleştirmeler) ortaya koymuştur (**Şekil 5l**).

25 **Örnek 4. Normal sette N>C karşılık kanserli sette C>N varyasyon fazlalığının doğrulanması**

- Kanser veya normal örneklerden meydana gelen kutuphaneler temelde aynı şekilde işlenmektedir. Bu nedenle kutuphanenin yapısı veya klon dizilimlerinden kaynaklanan rasgele hataların her iki sette de aynı oranda meydana gelmesi beklenmektedir ve
- 30 normal ve kanserli EST grupları arasında gözlemlenen farklar için hesaba katılamamaktadır. Matematiksel analiz de bu yorum ile tutarlıdır (Brulliard M., ve diğerleri, PNAS, Mayıs 1, 2007 cilt 104 no. 18 7522-7527 – bakınız Destekleyici materyal Şekil 7).

Daha sonra aşağıdaki mantığa dayanan filtreleme prosedurleri sırasıyla uygulanarak EST heterojenliğınin diğeri kaynakları elimine edilmeye çalışılmıştır. Başlangıçtaki gerekliliklerimiz EST'nin en az 16 ardışık bazda RefSeq ile %100 denklikte ve en az 50 bazda %90'dan büyük denklikte hizalanmış olmasıydı. Şekil 6b'de gösterildiğı üzere, tüm 17 gen için kanserli ve normal setler karşılaştırıldığında, bu sırasıyla 2281 ve 725 istatistiksel olarak önemli farklar C>N ve N>C (sütun F1) ve varsayılan veya biyolojik olarak doğrulanmış SNP'lerden ayrı vermiştir. İkinci filtre (F2) her bir EST'nin uzunluğunun %70'inden fazlasında RefSeq'e sürekli olarak hizalanmış olmasını gerektirmektedir. Üçüncü filtre (F3) paraloglar ve psodogenlere gerçek RefSeq'ten daha yakın ilişkili olan dizilimlere sahip EST'leri ayırmaktadır. Dördüncü filtre (F4) analizden her bir EST hizalamasının ilk ve son 50 bazını silmektedir. Bu filtre, MegaBLAST programı tarafından hizalamaların daha da optimize edilmesi için oluşturulan ve/veya hizalanmış EST uçlarında hata akumulasyonundan kaynaklanan, EST'nin 3' ve 5' sınırlarındaki yanlış eşleşmelerin kaldırılması için kullanılmıştır. Son filtre (F5) normal ve kanserli setler arasındaki herhangi bir uzunluk farkının ortadan kaldırmak üzere her bir gen için EST dizilim uzunluklarını normalize etmiştir. Aslında, ilk 4 filtrenin uygulanmasının ardından, ortalama kanser EST uzunluğunun normal EST'lerinkinden daha büyük olduğu fark edilmiştir (sırasıyla 640 ± 248 ve 554 ± 229 baz). Ancak, ortalama EST uzunluğunun normal ve kanserli setler arasında farklı olmadığı 5 gende belirgin ölçüde daha fazla kanser EST heterojenliğı de gözlenmiştir (TPT1, VIM, HSPA8, LDHA, CALM2).

İstatistiksel olarak önemli olan C>N testlerinin sayısı N>C testlerinin sayısından büyük kalmıştır, ancak C/N oranı 3.15 (F1)'den 2.05 (F5)'e yükselmiştir (**Şekil 6c**).

Kanser EST heterojenliğınin dizilim işlemlerinin sonundaki hataların birikiminden kaynaklanmadığından daha da emin olmak için, herhangi bir dizilim işleminin sadece ilk 50 bazından sonra ve 450 bazından önce sunulan bilgiler göz önüne alınmıştır. Bu zorlayıcı filtrelemenin ardından, tüm 17 gen için istatistiksel olarak önemli olan C>N testleri 455 (LBE=92) ve N>C testleri 292 (LBE=119) olmuştur. Bu nedenle kanser seti içerisinde artan EST heterojenliğıne neden olan dizilim varyasyonlarının kanser hücresi mRNA heterojenliğınin doğrudan bir yansıması olduğu makul olarak varsayılabilir (**Şekil 6d**).

Daha sonra kulture edilmiş kanser hücrelerinden üretilen EST'ler uzaklaştırıldıktan sonra kanser seti içerisinde daha fazla istatistiksel olarak önemli EST heterojenliğinin kaldığı bağımsız olarak doğrulanmıştır. Bu filtrelemenin ardından, tüm 17 gen için istatistiksel olarak önemli olan C>N testleri 1009 (LBE=117) ve N>C testleri 445 (LBE=193) olmuştur (**Şekil 6e**).

Örnek 5. Kanser hücrelerinde transkripsiyon infidelitesinden dolayı oluşan baz ikamesinin kodunun kırılması.

Bir sonraki hedef açıklanan transkripsiyon infidelitesinden kaynaklanan baz ikamesi olgusunun rasgele bir olgu olup olmadığının veya spesifik kuralları takip edip etmediğinin belirlenmesidir. Bunu başarmak için C>N'nin istatistiksel olarak önemli olduğu EST varyasyonları üzerine yoğunlaşmıştır. Filtreleme prosedurları ile meydana gelebilecek eğilimlerin önlenmesi için mevcut olan tüm filtrelenmemiş veriler kullanılmıştır. Transkripsiyon infidelitesinin rasgele bir süreç olmadığına dair birinci göstergesi baz ikamelerinin test edilen genlerin 5' bölgesinde nadiren meydana gelmiş olmasıdır. Test edilen bütün genler için olgun mRNA'nın ilk 400-500 bazı içerisinde baz ikamesi oluşma olgusu çok nadiren gözlenmiştir. Transkripsiyon infidelitesinin rasgele bir süreç olmadığına işaret eden ikinci bir gözlem, ikame olaylarının üst ve alt kısmındaki dizilimler (heterojen, H, n=2281) ile hiçbir ikame olayı tespit edilmeyenler (heterojen olmayan, NH, n=12273) karşılaştırılırken genomik DNA şablonu üzerinde gözlemlenen baz kompozisyonlarında farkların olduğunun görülmesinden kaynaklanmaktadır. NH alanları için kriterler %0.5'in altında ve normal setten istatistiksel olarak farklı olmayan kanser seti varyasyonlarıdır (**Şekil 7a**). Bu analizde ikameye tabi olan baz b0 olarak, pmRNA 5' ucunda konumlandırılmış olan bazlar b-n olarak ve 3' ucunda konumlandırılmış olan bazlar b+n olarak adlandırılmaktadır. Daha açık olması amacıyla, bu analizde pmRNA'nın baz kompozisyonundan bahsedilmektedir: bu DNA üzerinde şablon-olmayan kola (RNAP tarafından kopyalanmayan kola) karşılık gelmektedir. Veriler ilk olarak 4 bazının tümünün varyasyona eşit miktarda hassas olmadığını göstermektedir: b0 = A (33%) = T (32%) >> C (21%) >> G (14%). İlaveten olayın gerçekleştiği alanın 4 baz yukarısının ve 3 baz yukarısının kompozisyonları belirgin EST varyasyonu içermeyen alanlardan istatistiksel olarak farklıdır (**Şekil 7a**, baz kompozisyonu % olarak ifade edilmektedir ve Gri gölgeleme zenginleştirilmiş bazları göstermektedir; daha koyu gri eksik bazları göstermektedir). Spesifik olarak varyasyonların olduğu alanların öncesinde ve sonrasında $A \geq G > T \approx$

C daha sık meydana gelmektedir.

5 Bu nedenle kanser EST heterojenliğinin oluşumu rasgele değildir, ancak ilk olarak ikameye tabi olan bazın doğası tarafından ve ikinci olarak olayın hemen oncesinde ve sonrasındaki bazların doğası tarafından belirlenmektedir.

10 Daha sonra değiştirilen bazın rasgele seçilip seçilmediği incelenmiştir. Şekil 7b'den durumun bu olmadığı aşıkardır. Oranlardaki farkın istatistiksel onemi değiştirilen bazın rasgele seçildiği sıfır hipotezi ile hesaplanmıştır (her uç değiştirme bazı testinin düzgün dağılıma ayarlanması). A tercihen C tarafından ($p = 2.8 \times 10^{-125}$), T G ile ($p = 5.7 \times 10^{-29}$) ve G ise A ile ($p = 2.2 \times 10^{-32}$) değiştirilmiştir. C'nin ikamesi hafif bir T eksikliği ile daha eşit bir dağılım göstermiştir ($p = 0.007$).

15 Daha sonra tercihi baz değişimlerinin altında yatan nedenler aranmıştır. Bu amaçla bilgilendirici ve bilgilendirici olmayan olayların iki seti birbirinden ayrılmıştır.

20 Bilgilendirici olaylar ikame edilen bazın önceki bazdan (b-1) veya takip eden bazdan (b+1) farklı olduğu durumlardır ($n = 1676$) (**Şekil 7c**). Bilgilendirici olmayan olaylar bu kriterlere uymayan durumlardır. Bilgilendirici olaylar analiz edildiğinde iki durumla karşılaşmıştır: ikame edilen baz b-1 veya b+1 ile (%79) veya b-1 veya b+1'den farklı olan diğer bir baz ile (%21) değiştirilmiştir. 1) Birinci alt kumede değiştirilen baz b-1 ($N=799$; **Şekil 7c** panel B) veya b+1 ($N=530$; **Şekil 7c** panel C) ile özdeşdir. Değiştirilen baz b-1 olduğunda $b_0 = A$ (%36) > C (%30) >> T (%21) >> G (%13)'tür (**Şekil 7d** panel A). A tercihen C ile değiştirilmiştir (durumların %71'inde). Değiştirme 25 bazı b+1 olduğunda, $b_0 = T$ (%47) >> A (%21) > C (%19) >> G (%13)'tür (**Şekil 7a** panel B). T tercihen G ile değiştirilmiştir (%71). İlginç şekilde, çevreleyen bazların istatistiksel onemi de farklıdır (**Şekil 7d** panel A ve **7d** panel B). b-1 ikameleri için baz kompozisyonunun nispi etki paterni $b_0 > b-1 > b-2 > b+1 > b-3 > b+2$ 'dir. b+1 ikameleri için baz kompozisyonunun nispi etkisi bir $b_0 > b+1 > b-1 > b+2 > b-3 > b-2$ 30 paternini takip etmektedir. 2) Bilgilendirici olayların ikinci alt kumesinde değiştirilen baz ne b-1'e ne de b+1'e karşılık gelmemektedir ($n=347$, **Şekil 7c** panel D). Etkilenen bazlar aşağıdaki düzendedir: A (%47) > T (%29) > C (%14) > G (%10). A en yaygın olarak C ile (durumların %91'i); T, C (%50) ve A (%42) ile; C, G ile (%46) ve G ise C

(%73) ile değiştirilmektedir. Bu nedenle değiştirilen baz b-1 veya b+1'e karşılık gelmediğinde, değiştirilen baz rasgele seçilmemektedir, ancak C büyük oranda aşırıdır.

5 Daha sonra bilgilendirici olmayan olayların seti, yani 1) $b-1 = b+1$ ve 2) $b-1 = b_0 = b+1$ olduğu durumlar ele alınmıştır (**Şekil 7c**). $b-1$ ve $b+1$ özdeş olduğunda ancak b_0 'dan farklı olduğunda ($n=339$, **Şekil 7c** panel E) ikame edilen bazlar aşağıdaki düzendedir: $T (\%34.8) > G (\%23.6) > C (\%21.2) > A (\%20.4)$ ve Şekil 7b'deki ile aynı tercih paternini takip etmektedir: $T \rightarrow G, G \rightarrow A, A \rightarrow C$. Uç özdeği bazın tekrar merkez bazında oluşan ikameler ($n=266$; **Şekil 7c** panel F) aşağıdaki düzende gözlemlenmiştir: 10 $A (\%46.2) > T (\%36.9) > G (\%10.5) > C (\%6.4)$. Bu durumda en yaygın ikame olayları: $A \rightarrow C$ ve $T \rightarrow C$ ve A. Nadir GGG ikameleri en yaygın olarak GCG ile ve CCC'ler ise CAC ile değiştirilmiştir (**Şekil 7c**).

15 Bu nedenle ikameler arka arkaya uç özdeş baz içerisinde meydana geldiğinde ve ikameler ne $b-1$ ne de $b+1$ 'e karşılık gelmediğinde C en yaygın değişim bazıdır (**Şekil 7c**). Değişim bazı $b-1$ 'e karşılık geldiğinde en yaygın ikame $A \rightarrow C$ 'dir; değişim bazı $b+1$ 'e karşılık geldiğinde en yaygın ikame $T \rightarrow G$ 'dir.

20 Bu nedenle ne ikame edilen baz ne de yerine konan baz rasgele seçilmemektedir. Her iki olgu da ikame edilen baz ile bu olayın yukarısında ve aşağısında konumlandırılmış olan bazların kompozisyonları tarafından belirlenen tahmin edilebilir paternleri takip etmektedir.

25 Verilen herhangi bir dizilim içerisinde baz ikamesinin oluşumunu belirleyen motif bileşimin hassas olarak belirlenmesi için spesifik algoritmalar tanımlanabilir.

30 Daha sonra $C > N$ seti N'in kararlı olduğu (Normal sette aynı pozisyonda sapma gözlemlenmemiş) veya olmadığı iki sete ayrılmıştır. Sapma miktarı Normal setteki sapmanın ortalama yüzdesi olarak tanımlanan belirli bir eşiği aşması durumunda ele alınmaktadır. Şekil 7e -4/+3 imzasının N'in sapma yaptığı $C > N$ seti tarafından taşındığını göstermektedir. Diğer sette içeriğin uzunluğu daha az önemlidir. Şekil 7f N'in sapma yaptığı $C > N$ setinde N'in stabil olduğu $C > N$ setine göre daha önemli olan 500-1000 aralığındaki bir kırkımı göstermektedir. İkincisinde, daha erken olaylar (0-500 aralığı) görülüyor gibidir. $C > N$ alanları için değişim bazları iki set arasında benzerdir

(**Şekil 7g**).

Silme veya yerleştirme durumunda, sonuçlar göz ardı edilen bazların (398 C>N durumu) aşağıdaki düzende olduklarını göstermiştir: C (%46.0) > T (%37.9) >> A (%9.3) > G (%6.8) (**Şekil 5m**) ve yerleştirilen bazların (225 C>N durumu) aşağıdaki düzende olduğunu göstermiştir: G (%36.0) > C (%30.2) > A (%21.8) > T (%12.0) (**Şekil 5o**). Silme veya yerleştirme olaylarının sıklıkla korunan özdeş bazlar içerisinde ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu tür olayların analiz edilmesi için özel olarak dizayn edilmiş bir program silmelerin %94.7'sinin ve yerleştirmelerin ise %81'inin değişken uzunluklarının uzantılarında olduğunu etkili olarak göstermektedir. Uzantılar bipolar ve simetrik (örnek olarak AAATAA) olabilir veya olmayabilir (örnek olarak CCCGG) veya tek nükleotid tekrar edebilir (örnek olarak AAA) (**Şekil 5m-5p**'deki motiflere bakınız). Silme durumunda, durumların %84'ünde ihmal edilen bazlar b-1 veya b+1 bazına (uzantı) özdeşdir. Çoğu motif C > T > A-G'nin çifti veya uçlusudur. Yerleştirme durumunda da benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Aslında, uzantı motiflerinin C>N veya N>C arasında farklı olmadığı görülmüştür. C>N veya N>C özelliği uzantıların etrafındaki diğer bilgilerden gelebilir. Daha fazla gen üzerinde ilave analiz bu gözlemleri doğrulayacaktır.

17 genin tümü göz önüne alındığında, EST heterojenliği 100 bazın 10'u oranında gözlemlenmiştir (**Şekil 5j** ve **Şekil 8a-c**). Bu oran genomik DNA içerisinde meydana gelen açıklanmış herhangi bir mutasyon oranını aşmaktadır. Bir referans olarak, tek nükleotid polimorfizminin genom içerisinde her 300 bazda bir rasgele meydana geldiği tahmin edilebilir. Kopyalanan DNA'yı etkileyen tek nükleotid polimorfizminin oranı ise çok daha düşüktür: her 3000 bazda bir meydana geldiği tahmin edilmektedir. Kanserde DNA mutasyonlarının daha sık meydana geldiği açıktır. Ancak çalışmamızda kullanılan 17 genden 14'ünü içeren göğüs ve kolon kanseri DNA dizilimi ile ilgili derinlemesine çalışmalar 10^6 baz başına 3.1 mutasyonluk bir somatik mutasyon oranı tahmin edilmesine neden olmuştur (Sjoberg, T., ve diğerleri (2006) Science 314, 268-74). Bu nedenle bu buluşta açıklanan transkripsiyon infidelitesi DNA'yı etkileyen mutasyonlarınkinden çok daha büyük bir oranda meydana gelmektedir. Daha önemlisi, DNA üzerindeki çoğu baz ikamesi protein seviyesinde kısıtlı sonuçlara sahiptir, çünkü genomik DNA'nın %10'undan azı mRNA'ya kopyalanmaktadır. Bunun aksine transkripsiyon infidelitesinden kaynaklanan baz ikameleri genellikle protein işlevi üzerinde doğrudan sonuçlara sahiptir. Aslında, burada açıklanan 2281 ikameden 1179'u

(1548 CDS – 369 sessiz ikame) protein AA ana dizilimi üzerinde ani etkiye sahip baz ikamelerine neden olmuştur (**Sekil 8d**). En önemlisi, test edilen 17 genden 9'unda stop kodonunu etkileyen belirgin baz ikameleri gözlenmiştir. Ancak transkripsiyon infidelitesi konseptinden önce, insan proteinlerinin bu güne kadar "donuşturulmemiş bölgeler" olarak düşünülen RNA dizilimleri tarafından kodlanmış ilave kodlama dizilimleri içerdiği one surulmektaydı. Burada transkripsiyon infidelitesinden dolayı doğal stop kodonları içerisinde meydana gelen baz ikamelerinin spesifik AA'ları kodlayan özgün kodlama bölgelerini ortaya çıkardığını göstermektayız. Bu özgün kodlama bölgesi doğal açık okuma çerçevesi ile uyum içerisinde. Doğal stop kodonu bir kodlama kodonuna donuşturulmaktadır. Daha sonra bir sonraki baz uçlusu bir AA olarak okunmakta ve donuşturma işlemi yeni bir stop kodonuna erişinceye kadar özgün bir kodlama bölgesi ile devam etmektedir. Tabiki transkripsiyon infidelitesi ortaya koyan 17 genden 8'inde durumun bu olduğu doğrulanmıştır. Tüm 8'i karşılık gelen RefSeq ile çerçeve içerisinde alternatif stop kodonları içermektedir (GAPDH alternatif bir STOP kodonu içermemektedir). Bu ani bir sonuca sahiptir, çünkü her bir durumda sırasıyla TPT1, RPS6, RPL7A, VIM, RPS4X, FTH1, FTL ve TPI1 içerisinde 14, 7, 13, 15, 13, 4, 9, 55 AA özgün kodlama dizilimleri meydana getirmiştir (**Sekil 10**). Bu AA'ların ilave edilmesi kanserde büyük oranda gelişmiş olacak motiflerin yaratılması potansiyeline sahiptir; bu motifler proteinlerde özgün işlevler ile sonuçlanacak veya sonuçlanmayacaktır. Bu oluşumun tahmin edilmesi tanılama, terapötik veya diğer amaçlar için kullanılabilir faydalı araçların olası gelişimine yol açmaktadır. Bu oluşumun tahmin edilmesi ayrıca proteinin karboksî-terminal ucundaki kansere özgü dizilimleri tanıyacak spesifik antikorların olası gelişimine de yol açmaktadır. Karboksî-terminal ucunda doğrudan protein dizilimini yapabilen herhangi bir analitik yöntem mevcut durumda bulunmamaktadır. Ancak proteinlerin enzimatik olarak parçalanması ve parçalanma ürünlerini NH₂ terminal uçlarından dizmek mümkündür. Ayrıca kütle spektrometrisi kullanılarak proteoliz ile üretilen peptidlerin AA içeriğinin analiz edilmesi de mümkündür. Bu alternatif stop kodonlarının da transkripsiyon infidelitesinden etkilendiği gösterilmiştir (9 genden 7'si etkilenmiş ikinci alternatif STOP kodonuna sahiptir).

Yukarıda açıklanan aynı olgu özgün bir dizilim setinin okunmasına da genişletilebilir. Bizim yöntemimiz kullanılarak tüm protein dizilimlerinin açıklanması donuşturma makinesinin baz ikamesini doğru olarak donuşturma veya donuşturmeme kabiliyetinin yanı sıra kodon kullanımına bağlı olarak daha fazla veya daha verimli olarak kopyalanacak olan çeşitli şüphelenilmeyen kodlama mRNA dizilimi ortaya çıkaracaktır.

Aslında, baz ikameleri ribozomal okuma oranını modifiye edebilen mRNA yapısal değişikliklerine neden olabilir. Yine de baz ikamelerinin RNA yapısı değişiklikleri içermediğini varsaymaktayız. Stop kodonu değişikliklerinin oluşumu goz onune alınarak, etkilenen genlerde, kanser dokularındaki mRNA'nın %4'üne kadarının bu ilave kodlama bolgelerini içerdığını tahmin etmekteyiz.

Varsayımsal bir Post STOP Peptidinin (PSP) varlığı için tum protein dizilimlerinin açıklanmasında çeşitli filtrelelere dayanan spesifik bir program kullanılabilir. İncelenen proteine karşılık gelen nukleik dizilim elde edildikten sonra, program kanonik STOP'tan sonra eş fazlı diğer bir STOP ile eş fazlı olan bir nukleik dizilimin var olup olmadığını aramaktadır (bu alternatif STOP kodonlarını etkileyen transkripsiyon infidelitesi durumunda bir veya daha fazla STOP'un by-pas edilme olasılığı goz onune alınabilir). Potansiyel bir antijenik patern tahminine için minimal kriteri uygun olarak minimum bir uzunluk belirlenebilir (ornek olarak sadece 12'den fazla amino asidi kodlayan dizilimler, ancak sonuçta peptid uzunluğu daha küçük olabilir). Daha sonra antijenik PSP depolanmaktadır (**Sekil 18**). Kanonik STOP'un öğrenme makinesi eğitilerek açıklamaya sahip adayların doğrulanması için ilave bir adım kullanılmaktadır: aslında STOP kodonunun bir veya daha fazla kodonunun transkripsiyon infidelitesi ile ikame edilebilmesi olasılığı belirlenebilmektedir. Ayrıca kutle spektrometrisi kullanılarak proteoliz ile oluşturulan peptidlerin AA içerenlerinin analiz edilmesi de mümkündür.

Ozgun protein dizilimlerinin dönüştürülmesine olanak veren durumların yaratılmasının yanında transkripsiyon infidelitesinin mRNA'da premature durmalar meydana getirebileceği de gösterilmiştir. Kanonik açık okuma çerçevesi içerisinde meydana gelen yirmi dört ozgun stop kodonu 17 genin 13'ü içerisinde belirlenmiştir. Bu durum transkripsiyon infidelitesinin spesifik alanları eksik olan daha kısa proteinlerin üretimine neden olabileceğini göstermiştir. Bu kısaltılmış proteinler bir işlevin artmasına veya kaybına neden oluyor olabilir. Proteinin 3-D yapısı da büyük ihtimalle etkilenmekte ve bu nedenle bağışıklık sistemi tarafından tanınabilecek ozgun varlıklar meydana getirmektedir.

Nihai olarak, test edilen 17 gendeki transkripsiyon infidelitesi tanımlanan tum C>N ikamelerinin %50'sinin AA değişikliklerine neden olduğunu ortaya koymuştur. %17'si AA'nın aynı aileden bir diğeri ile değişimine karşılık gelmekte ve %33'ü ise AA'nın farklı

bir AA sınıfı ile ikame edilmesine karşılık gelmektedir. Bu nedenle transkripsiyon infidelitesi potansiyel olarak modifiye edilmiş işlevler veya faaliyetlere sahip özgün AA dizilimleri içeren proteinlerin üretilmesi kabiliyetine sahiptir. Yukarıda açıklanan kurallar kullanılarak transkripsiyon infidelitesinin tahmin edilmesi protein davranışındaki değişikliklerin ve proteomik deneylerin sonuçlarının rasyonel olarak tahmin edilmesine olanak verecektir.

Örnek 6. Biyolojik doğrulamalar

Biyolojik doğrulamalar iki seviyede icra edilmiştir: mRNA ve proteinler.

10

İlk olarak, ilgilenilen 17 genin mRNA ikameleri kanserli insan dokularında tespit edilecektir. Dizilim mutasyonlarının tespit edilmesi için geniş ölçekli bir kromatografik yöntem olan DHPLC (Denature Edici Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) kullanılmıştır. Deneyin prensibi Şekil 11a-c'de açıklanmaktadır. İlk olarak, örnek içerisinde heterodubleks formasyon ve teşhis için yeterli olan mutasyona uğramış DNA yuzdesini tahmin etmek üzere *Transgenomik DHPLC* eşliğini test etmek için bir yöntem geliştirilmiştir. Aslında, 1 ve 3 baz ikamelerine sahip 300 bp PCR parçaları kullanılmıştır. Bu parçaların farklı oranları hazırlanmıştır: %0, %2.5, %5, %7.5, %10, %20 veya %50. DHPLC, örnek %2.5 ile %5 arasında mutasyona uğramış DNA içerir içermek [normal] ve [normal artı mutasyona uğramış] DNA'ları ayırt etmemize musaade etmektedir (**Şekil 11d**). Bu sonuçlar ilgilenilen genler için normal ve kanserli dokulardan mRNA'yı ayırt edebildiğimizi göstermektedir. Uç genin test edilmesi için normal ve kanserli bitişik dokulardan (*Biochain Inc.*) ekstrakte edilen mRNA'lar kullanılmıştır: GAPDH, EN01 ve TMSB4X. DHPLC DNA üzerinde çalışırken ters transkriptaz kullanılarak mRNA örnekleri cDNA'ya dönüştürülmüştür. Normal dokulardan gelen EST'lerdekine göre kanser dokularından gelen EST'ler içerisinde çok daha belirgin ikameler ortaya koyan bölgeler seçilmiştir. Amplifikasyon için kullanılan primerler Şekil 12'de gösterilmiştir.

15

20

25

30

Bir birinci deney setinde, kanserli ve bitişikteki normal dokulardan (karaciğer, bobrek, göğüs ve kolon) alınan çeşitli cDNA'lar bahsedilen primerler ile PCR ile amplifiye edilmiş ve DHPLC sistemine enjekte edilmiştir. Fırının sıcaklığı Navigator yazılımı (Transgenomic) ile seçilmiştir. Yukarıda açıklanan genler için profiller elde edilmiş ve ENR01, GAPDH ve TMSB+X genleri için temsili bir deney Şekil 15'te sunulmuştur. Şekil 15a-15c'de

gosterildiği üzere, GAPDH ve EN01 genleri için kanser profilleri normal profillerden açık şekilde farklıdır. TMSB4X geni için beklenildiği gibi hiçbir fark gözlenmemiştir (çok daha az transkripsiyon infidelite alanı). Aynı PCR ürününün ve diğer 2 PCR ürününün enjeksiyonu uçlu olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 15b ve 15c) ve profiller aynı deney içerisinde yüksek seviyede yeniden üretilebilir olmuştur. Ancak bu farkın nedeni bu deney ile açıklanamamaktadır.

Sonuç olarak mRNA'ya dayalı bu biyolojik doğrulamanın devamı gerçekleştirilmektedir. Gerçekten, kanserli dokulardan oluşturulan PCR ürünlerinin dizilimi çoğu bol miktarda bulunan mutasyonların hassas şekilde tespit edilmesine olanak verebilmektedir.

Ters kopyalanmış PCR ile amplifiye edilmiş mRNA'ların Klasik Sanger dizilim yöntemi belirli bir pozisyonda %15-30'un altındaki oranlarda meydana gelen dizilim değişimlerini tespit etmemektedir (**Şekil 16**). Aslında, bilinen mutasyona uğramış ve uğramamış dizilimlerden amplifikasyon ürünlerinin karışımlarının dizilmesi ile elde edilen mutasyona uğramış baz davetleri %50-50 karışımları için elde edilmekte ve minor tepeler %15'ten tespit edilmektedir. Payro-dizilim ve Emülsiyon PCR, cDNA heterojenliğinin tespit edilmesine olanak veren daha hassas yöntemlerdir ve bu nedenle kanserli ve normal hücrelerden elde edilen RT-PCR ürünlerinin analizi mümkün olmaktadır (Thomas, R. K, ve diğerleri (2006) Nat Med 12, 852-5).

Transkripsiyon infidelitesinden etkilenen bir genin tümü veya transkripsiyon infidelite alanını içeren veya içermeyen bir kısmı klonlanmıştır. Kanonik stop kodonu ile veya olmadan yapı, neomisin direncini kodlayan gen ile çerçeve içerisinde bağlanmıştır. Kanserli ve normal hücreler bu kimerik yapı ile ilk başta geçici olarak daha sonra kararlı olarak transfekte edilmiştir. Transkripsiyon infidelitesinin kanonik stop kodonunda değişikliğe neden olduğu ve bu sayede neomisin geninin dönüşümüne olanak verdiği ve neomisine dirençli hücre oluştuğu tahmin edilmektedir. Neomisin direncine sahip olan hücrelerin daha hızlı büyüyeceği ve bu hücrelerin şekillerinin normal hücrelerinkine göre belirgin farklılık göstereceği tahmin edilmektedir. İlaveten, bu hücrelerin daha istilacı (invazif) oldukları ve kanser ilerlemesinin ilerideki bir aşamasında hücreler ile karşılaştırılabileceği de tahmin edilmektedir. Bu nedenle bu teknik bireysel bir hastadan alınan farklı hücrelerin kanser aşamalarının belirlenmesinde kullanılabilir.

Neomisin direncinin transkripsiyon infidelitesinin bir sonucu olarak meydana geldiğinin son delili, genomik DNA'dan amplifiye edilen yerleştirilmiş yapının dizilmesi ve genomik bilginin değişmeden kaldığının gösterilmesi ile elde edilecektir. Ayrıca neomisin dirençli hücredeki mRNA'ların transkripsiyon infidelitesinden dolayı mutasyona uğramış bir stop kodonu içerdiği de doğrulanacaktır.

Transkripsiyon infidelite alanlarının tespit edilmesine musaade eden bir teknik cDNA kutuphanelerinin oluşturulmasıdır ve kanserli ve normal hasta dokularından ekstrakte edilen RNA'dan ters-kopyalanan cDNA'ların kopyalanmasını içermektedir. Spesifik bir genden amplifiye edilen veya edilmeyen her bir cDNA *Escherichia coli* içerisinde donuşturulmuş ayrı plazmidler içerisinde klonlanmaktadır. Farklı *E. coli* kolonileri toplanmış ve dizilmişlerdir. Dizilmesi gereken klon sayısı klonlanmış cDNA parçası içerisindeki ikamelerin yüzdesine bağlıdır. İstatistiksel bir analiz transkripsiyon infidelite alanları içerisindeki dizilim varyasyonlarını verecektir. Bu teknik geliştirilebilir. Aslında, spesifik primerler ile ters-transkripsiyon ve amplifikasyonun ardından cDNA bir raportor gen, örnek olarak *lacZ* geni taşıyan bir plazmid içerisinde klonlanabilir. cDNA ve raportor geni eş fazlı olarak klonlanmaktadır. mRNA'nın STOP kodon diziliminde bir ikame görüldüğünde raportor gen eksprese edilir. *E. coli* hücreleri bu yapı ile donuşturulduğunda, cDNA'nın stop kodonu içerisinde mutasyona uğratıldığı plazmid taşıyan koloniler raportor genin ekspresyonu ile seçilmektedir. Bunun ardından, stop kodonunun ikamesi'nin mevcut olup olmadığının doğrulanması için plazmid sıralanabilir (sekanslanabilir).

Transkripsiyon infidelite alanlarının tespit edilmesi için spesifik primerler ile gerçek-zamanlı PCR'a dayalı diğer bir teknik kullanılmaktadır. Bu primerler istatistiksel analizlere dayalı dizilim varyasyon(lar)ına sahip cDNA ile eşleşmek üzere dizayn edilmişlerdir. İkinci bir primer ise dizilim varyasyonuna sahip olmayan (referans) cDNA ile eşleşmek için dizayn edilmiştir. Primer dizilim içerisindeki varyasyon(lar)ın sayısı çok önemlidir ve bilinen dizilim varyasyonu üzerinde bir test deneyinde spesifik bir floresan sinyali elde etmek için incelenen pozisyonların dışında 2 mutasyonun gerekli olduğu belirlenmiştir. Primer bir dizilim ikamesine sahip olmayan (referans) cDNA ile tümleyen olduğunda, floresan sinyali belirli bir amplifikasyon çevrimi sayısında tespit edilmektedir. Dizilim ikamesi taşıyan primer ile amplifiye edilmiş aynı cDNA daha fazla sayıda amplifikasyon çevrimi ile ortaya çıkan bir floresan sinyaline neden olmaktadır. 2 primer ile

amplifikasyon çevrimlerinin sayıları arasındaki fark dizilim ikamesine sahip bir cDNA'nın varlığının doğrudan tahminidir. İlaveten, yöntemin bilinen dizilimlerin bir karışımı içerisinde mutasyona uğratılmış dizilimlerin %1'ini tespit edecek kadar hassas olduğu da doğrulanmıştır.

5

Tıpkı bir denemede, kanserli ve normal hasta dokularından ekstrakte edilen RNA'lar ters-kopyalanmakta ve bahsedilen spesifik primerlerin her biri ile amplifiye edilmektedir. Daha sonra her iki primer ile amplifikasyon çevrimleri arasındaki fark ölçülmektedir.

10 Son olarak, doğal stop kodonu etkilendiğinde harekete geçen özgün proteinler üzerine yoğunlaşabiliriz. İlgilenilen 17 genden 9'u için stop kodonunun büyük oranda etkilendiği gösterilmiştir. Bu karboksı-terminal ucunda özgün bir dizilime sahip ayrı spesifik protein popülasyonlarına neden olmaktadır. Etkilenen genler için kanserli dokuların normal genlerden daha uzun olan %4 protein içerdiği tahmin edilmektedir.

15

Bu hipotezin ışığında, bol miktarda bulunan 60 plazma proteinini (***Şekil 13***) analiz edilmiş ve olası PSP'ler için aranmıştır. Bir PSP'nin yeteri kadar uzun ve antijenik olduğu 22 gen bulunmuştur (***Şekil 18***). Daha sonra oluşan daha uzun varsayımsal protein dizilimleri aranmıştır (***Şekil 18b-c***). Sonrasında normal ve kanserli bireylerden elde edilen plazmalar içerisindeki varsayılan yeni peptidler aranmıştır (***Şekil 18***). Bu 22 ilginç proteinden 3'ü seçilmiştir: APOAI, APOAII ve APOCII. Yukarıdaki analize dayanarak kanserli hastaların plazması içerisinde daha uzun proteinlerin bulunması beklenmektedir (13, 16 ve 177 AA daha uzun). Bu transkripsiyon infidelitesi peptid dizilimlerinin immunojenik olmaları beklenmektedir ve bu özgün dizilimlere yönelik antikorlar transkripsiyon infidelitesinin ölçülmesi için spesifik ligandları temsil etmektedirler (***Şekil 14***). Kyte-Doolittle analizi bu dizilimlerin hidrofobik olduğunu belirttiğinden, bu üç özgün proteinin sirkülasyon içerisine salgılanması beklenilmektedir (aşağıya bakınız).

20

25

Kanonik stop kodonu içerisindeki ikame nedeniyle ApoAII ve ApoCII'nin post-stop-peptidinin (PSP) tanımlanması

30

Kanonik stop kodonları içerisindeki baz ikamelerinden kaynaklanan PSP'ler aşağıdaki şekilde tanımlanabilir ve karakterize edilebilir. İlgili PSP'lerin immunojenik kısım(lar)ını tanıyan tavşan poliklonal antikorları hazırlanır. Bu anti-peptid antikorları gerçekten

PSP'leri tanıdıklarının doğrulanması için saflaştırılmış peptid kullanılarak nokta lekeleme ile kontrol edilebilirler. Daha sonra PSP'ye karşı yönlendirilmiş antikorlar kullanılarak kanser hastalarından elde edilen plazma örnekleri üzerinde Western lekeleri (blot) gerçekleştirilebilir. Şekil 17a (sağ panel) anti-PSP ApoAII antikorunun prostat kanseri hastalarından elde edilen plazma örnekleri üzerinde gerçekleştirilen Western lekelemesi içerisinde bir bandı tanıdığını göstermektedir ve bu durum negatif kontrol olarak tavşan pre-immun serumu kullanıldığında gözlenmemektedir (Şekil 17a, sol panel). Ayrıca metastatik fazdaki kanser hastalarında da ApoAII bandı gözlenmektedir (Şekil 17b, sağ panel). Bu bant ApoAII'nın doğal monomer formununki ile karşılaştırıldığında biraz daha fazla molekul kutlesine (11.4 kDa) sahiptir (Şekil 17a, orta panel, 17b, sol panel). Bu molekul kutlesi ilave peptid dizilimine dayanarak tahmin edilene karşılık gelmektedir. Bu bandın daha da karakterize edilmesi için iki-boyutlu jeller de gerçekleştirilebilir.

Anti-PSP antikoru kullanılarak ApoAII'nın PSP formunun izole edilmesi için afinite kromatografisi deneyleri gerçekleştirilebilir (**Şekil 17e**). Anti-PSP antikorları matris tanecikleri üzerinde hareketsiz hale getirilmekte ve takip eden kolon, plazma veya delipide edilmiş HDL'nin varlığında inkube edilmekte, sonrasında spesifik olmadan bağlanan proteinlerin uzaklaştırılması için sırasıyla yıkanmakta ve son olarak deterjan veya kaotropik reaktifler ile ayrıştırılmaktadır. Ayrıştırılan kısım hem anti-PSP hem de ticari anti-ApoAII antikorları kullanılarak Western blot ile analiz edilmektedir. Ticari anti-apoAII antikoru ile 9 kDa ve 11.4 kDa'da iki bant tanınmakta ve anti-PSP antikoru ile ise sadece 11.4 kDa bandı tanınmaktadır. Bu nedenle 9 kDa bandı doğal ApoAII formuna ve 11.4 kDa ise ApoAII'nın PSP formuna karşılık gelmektedir. Ayrıştırılan kısımdaki doğal ApoAII'nın varlığı PSP ApoAII proteininin doğal indirgeyici olmayan koşullar altında doğal ApoAII proteini ile dimerler oluşturabileceğini göstermektedir. Aslında, ApoAII plazma içerisinde normalde tek bir disulfid koprusu tarafından bağlanmış 2 monomerin bir dimeri olarak bulunmaktadır.

ApoAII temel olarak plazma içerisinde HDL kısmında konumlandırılmaktadır ve sıralı ultra-santrifugasyon ile izole edilebilmektedir. Western blot PSP ApoAII'nın VLDL ve LDL içeren $d < 1.07$ g/ml kısmı içerisinde tespit edilmediğini, ancak HDL ve plazma proteinleri içeren $d > 1.07$ g/ml kısmı içerisinde tespit edildiklerini göstermektedir (**Şekil 17c**). HDL'nin saflaştırılması ve yıkanması ($d 1.07-1.21$ g/ml) için ilave ultra-santrifugasyon adımlarının ardından, Western blot PSP ApoAII'nın lipoprotein eksik serum (LPDS) olarak da

adlandırılan $d > 1.21$ g/ml kısmından ziyade HDL kısmı ile ilişkili kaldığını ortaya koymaktadır. Bu durumun saflaştırma adımları esnasında $d > 1.21$ g/ml kısmının seyrelmesinden dolayı olmadığı göstermek üzere karşılık gelen miktarda bir plazma Western blot üzerinde gösterilmektedir. Lipoproteinlerin plazmadan Superose 6B (Amersham, GE Healthcare) kullanılarak jel filtrasyonu ile ayrılması PSP ApoAII'nin de HDL ile ilişkili ApoAII ile benzer şekilde ayrıştığını göstermektedir.

PSP ApoAII ile HDL'nin ilişkisi ApoAII'nin PSP formunun ApoAII'ninkine benzer şekilde saflaştırılmasına olanak vermiştir. İlk olarak tüm lipidlerin uzaklaştırılması için HDL delipide edilmiştir. Sonuçta ortaya çıkan lipid-içermeyen protein topağı daha sonra bir indirgeme ajanının varlığında veya yokluğunda ure organidin içeren 10 mM Tris tamponu içerisinde yeniden askıya alınmış ve bir jel filtreleme kolonuna (örnek olarak, Superdex 200, Amersham-GE Healthcare) uygulanmıştır. Western blot (Şekil 17d) ApoAII'nin PSP formunun delipide edilmiş HDL içerisinde hala mevcut olduğunu göstermektedir. Hazırlayıcı (preparatif) elektroporoz ile ilave saflaştırma elde edilmiştir (örnek: DE52). ApoAII'nin PSP formu Western blot ile takip edilmiştir. ApoAII'nin saflaştırılmış PSP formu daha sonra enzimatik olarak (tripsin) parçalanmış ve sonuçta ortaya çıkan peptidler tam AA dizilimi için MS-MS üzerinde analiz edilmiştir. Sonuçlar kanonik STOP'un tercihen ya (U'dan C'ye) ya da (U'dan A'ya) ikame ile Arginin vasıtası ile değiştirildiğini ve bunu Serin, Valin, Glutamik asit, Threonin, İzolozin, Valin, Fenilalanin, Glutamik asit, Prolin, Glutamik asit, Losin, Alanin, Serin, Arginin'in takip ettiğini göstermektedir. Bu ApoAII kanonik STOP'un by-pasını muteakip oluşması belenen amino asit diziliminin birebir aynısıdır. Bu nedenle ApoAII'nin kanonik UGASTOP'u Arginine yol açan AGA veya CGA ile ikame edilmektedir. Henüz incelenmemiş olan bir hipotez ise UGA'nın Glisin'e yol açan GGA'ya dönüştürülmesidir. Ancak bu varyantın kütle spektrometrisi ile tespit edilmesi mevcut durumda teknolojik limitlerin ötesindedir.

Diğer bir örnek ApoCII'nin PSP ile gösterilmektedir. Şekil 17f, Western'lerin ticari olarak mevcut anti-ApoCII veya anti PSP ApoCII antikolları ile gerçekleştirilmesi haricinde Şekil 17a'ninkine benzer bir deneyi göstermektedir. ApoAII'nin PSP'sı için olanlara benzer bir prosedür ApoCII için de takip edilebilir. Ancak apoCII plazma içerisinde daha az bulunmaktadır. Bu nedenle MS-MS üzerinde analiz için yeterli miktarın elde edilmesi için PSP ApoCII içeren çok daha fazla miktarda plazma gerekmektedir.

Sonuçlar

- 5 Burada çoğunlukla kodlama diziliminin 3' ucunda ve mRNA'nın donuşturulmemiş bolgesinde meydana gelen baz ikamelerine yol ačan ozgun bir mekanizma açıklanmaktadır. Bu baz ikameleri AA tanımının değişmesinden dolayı protein AA dizilimlerinde değişikliklere, premature stop kodonlarının ortaya çıkmasına ve ozgun kodlama bolgelerinin sunulmasından kaynaklanan doğal oluşan stop kodonlarında
- 10 modifikasyonlara neden olmaktadır. Bu transkripsiyon infidelitesi olgusu ayrıca ncRNA dunyasını da etkileyebilir ve bu RNA'lar tarafından aracılık edilen duzenlemeleri de bozabilir. Bu durum çoęu gen iğerisinde DNA mutasyonuna yol ačan herhangi bir açıklanan olguyu ařan bir oranda meydana gelmektedir. Transkripsiyon infidelitesi kanser hucreleri iğerisinde buyuk oranda artmaktadır. Transkripsiyon infidelitesi kanser
- 15 patoloğisinin, hastalığın şiddetının ve hastalığın ilerlemesinin anlaşılması içi ozgun bir model sunmaktadır. Sadece ozgun transkriptomik ve proteomik deneylerin dizayn edilmesi için değil, spesifik tanıların ve terapötiklerin geliştirilmesi için de onemli uygulamalara sahiptir.

20

25

30

DİZİLİM LİSTESİ

[0180]

<110> TRANSMEDI SA

<120> Transkripsiyon İnfidelitesi. Tespit Edilmesi ve Kullanımları

<130> B0478WO

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Met Trp Gln Leu Phe Trp Ile Tyr His Leu Ser Ser
 1 5 10

<210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Lys Leu His Thr Leu Ser Ala Ala Ile Tyr Tyr Gln Gln Glu
 1 5 10

<210> 3
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Asp Phe Leu Ser Asn Lys
 1 5

<210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Met Tyr Thr Val Glu Phe Ser Val His Lys Asn Asn
 1 5 10

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

Asn Gly Ser Leu Gly Asp Met Ser Asp Leu Cys Thr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Ala Ser Gly
1

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Pro Ser Glu Pro Ser Asp Phe
1 5

<210> 8
<211> 54
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Pro Ser Ile Phe Pro Thr Leu Pro Ala Lys Pro Gly Thr Lys Gln
1 5 10 15

Pro Arg Ser Pro Val Thr Ala Leu Ser Leu His Met Leu Leu Met Val
20 25 30

Ser Ser Ala Pro Ser Cys Gly Leu Ile Gln Thr Val Ser Ser Phe Thr
35 40 45

Val Tyr Ile Phe Thr Leu
50

<210> 9
<211> 69
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Ala Arg His Gly Arg Asp Glu Glu Val Trp His Arg Lys His Ser His
1 5 10 15

His Phe Val Gln Ala Trp Ala Trp Val Gly Gly Leu Val Cys Trp Pro
 20 25 30
 Arg Lys Cys His Met Arg Ser Thr Leu Ile Ser Ser Leu Asp Ser Leu
 35 40 45
 Leu Pro Val Ile Pro His Arg Thr Glu Ala Glu Trp Val Val Val Met
 50 55 60
 Phe Asp Arg Arg His
 65

<210> 10
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Arg Ser Lys Ala Tyr Ser Ser Val Phe Leu Phe Arg Trp Cys Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn Thr Leu Ser Lys Lys His Lys Phe Leu
 20 25

<210> 11
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11

Gly Leu Asp Ser Thr Arg Ala Leu Glu Asn Glu Met Thr Val
 1 5 10

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

Gly Ala Arg Arg Arg Pro Pro Ser Arg Cys Ser Glu
 1 5 10

<210> 13
 <211> 20

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

Ser	Val	Gln	Thr	Ile	Val	Phe	Gln	Pro	Gln	Leu	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro
1				5					10					15	

Thr	Gly	Gln	Ser
			20

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

Ile	Val	Phe	Gln	Pro	Gln	Leu	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Thr	Gly	Gln	Ser
1				5					10					15	

<210> 15
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

Gln	Pro	Asp	Pro	Pro	Ser	Val	Asp	Lys	Gly	Arg	Val	Pro	Tyr	Ser	Pro
1				5					10					15	

Asp	Pro	Pro	Gly	Ser	Asp
					20

<210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

Asp	Pro	Pro	Ser	Val	Asp	Lys	Gly	Arg	Val	Pro	Tyr	Ser	Pro	Asp
1				5					10					15

<210> 17
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Leu Asn Thr Pro Ser Pro Pro Ala Tyr Pro Ser Cys Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Ser Cys Asn Leu Gln Gly Cys Pro Cys Arg Leu Leu Lys Arg Asp
20 25 30

Ser Ile Leu Ser Ala Leu Leu Pro His Leu Met Pro Gly Pro Pro Pro

35

40

45

Gly Met Leu Ala Ser Gln
50

<210> 18

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Pro Gly Ser Thr Gly Arg Leu His Pro Leu His Val Thr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Leu Ser Pro Thr Pro Pro Pro Pro His Lys Asp Lys Pro Ile Asn His
20 25 30

Asp Lys Gly Ser
35

<210> 19

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Thr Pro Lys Pro Ala Ala Met Arg Pro His Ala Thr Pro Cys Leu Leu
1 5 10 15

Pro Pro Arg Ser Leu Gln Arg Glu Thr Leu Ser Pro Pro Gln Pro Ser
20 25 30

Ser Trp Gly Gly Pro
35

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Ala Arg Val Gly Gly Asn Val Gly Ser Gln Thr Gln
1 5 10

<210> 21
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Pro Ser Val Leu His Thr Ala Arg Gly Pro Arg Met Pro Arg Pro Pro
1 5 10 15

Leu Ala Pro Ala Gly Arg Glu Pro Asp His Leu Pro Cys
20 25

<210> 22
<211> 72
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Val Asp Val Ala Phe Ala Pro Thr Gly Ala Ser Glu Ser Ser Ser
1 5 10 15

Pro Gln Asp Glu Leu Gln Pro Pro Arg Glu Ser Ser Ala Arg His Gln
20 25 30

Val Thr Arg Pro Gln Pro Pro Gly Pro Gln Leu Arg Pro Ala Ser Pro
35 40 45

Arg Ser Gly Ser Cys Thr Leu Thr Leu Asp Ser Ala Ala His Gly Lys
50 55 60

Asn Arg Ile Ala Pro Ala Cys Asn
65 70

<210> 23
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 23

Asn Val Ile Pro Leu Lys Arg Lys Met Asn Asn Thr Leu Asn
1 5 10

<210> 24
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 24

Thr Pro Ala Ala Arg Leu Met Trp Ser Ser Asn Met Pro Tyr Phe Ala
1 5 10 15

Gln Lys Thr Ala Lys Asp Met Thr Ser Ser Trp Leu Gln Pro Arg Phe
20 25 30

Ile Phe Leu Phe Val Val Asn
35

<210> 25
<211> 53
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Gly Trp Gly Val Phe Leu Leu Asn Pro Met Ala Gly Gly His Ala Pro
1 5 10 15

Thr Ile Ile Ser Trp Glu Glu Arg Gln Ser Trp Glu Ile Asp Gly Ser
20 25 30

His Ser Ser Leu Leu Ser Leu Leu Cys Leu Trp Ala Thr Leu Pro Thr
35 40 45

Pro Leu Leu Ser Gln
50

<210> 26

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Gly Pro Thr His His Ser Pro Ser Pro Ser Ile Ser Thr Trp Cys
1 5 10 15

Leu Val Pro Val His Ser Val Asn Lys Lys Pro
20 25

<210> 27

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Trp Thr Pro Glu Pro Leu Leu Gln Pro Leu Ser His Pro Leu Pro Pro
1 5 10 15

Ala His Pro Leu Gly Gln Gln Arg Leu
20 25

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Leu Asp Gly Arg Gln Ser Asp Ala Leu Thr His Leu Glu Ala Gly Thr
 1 5 10 15

Trp Val Gly Ile
 20

<210> 29
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29

Ser Leu Pro Ser Ser Ser Gly Ala Leu Ser Lys Glu Leu Gly Met Gln
 1 5 10 15

Ala Gly Cys Leu Gly Leu Trp Ala Gln Pro Gly Pro Cys Ala Pro Ser
 20 25 30

Gly His Gly Met Cys Gly Pro Val Cys Leu Ser Leu Glu Gly Asp Ser
 35 40 45

Asp Ser Leu Cys Ser Ser His Met His Arg Gly Pro Trp Thr Leu Gln
 50 55 60

Ser Gly Gly Ser Trp Ala Ser
 65 70

<210> 30
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30

Asn Leu Arg Gly Arg Ala Ala Thr Lys Val Lys Met Gly Thr Gln Met
 1 5 10 15

Ile His Glu Phe Ala Leu Val Ser Leu Ala Gln Val Val Cys Ala Asn
 20 25 30

His Val Cys Leu His Ser Ser Val Leu Pro Cys Val Leu Asn Lys Lys
 35 40 45

<210> 31
 <211> 100

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31

```

Gly Pro Ala Pro Pro Arg Pro Ala Pro Ala Gly Pro Ala Pro Pro Arg
1           5           10           15

Pro Ala Pro Ala Ala Leu Pro Met Gly Ala Val Phe Lys Asp Thr Arg
          20           25           30

Ala Pro Ser Pro Pro Gly Ala Pro Leu Lys Met Glu Arg Gly Leu Arg
          35           40           45

Ile Ser Val Ser Leu Gly Ala Cys Leu Gly Ser Pro Ser Leu Thr Phe
50           55           60

Pro His Ser His Ser Leu Ser Leu Pro Leu Cys Leu Leu Leu Pro Val
65           70           75           80

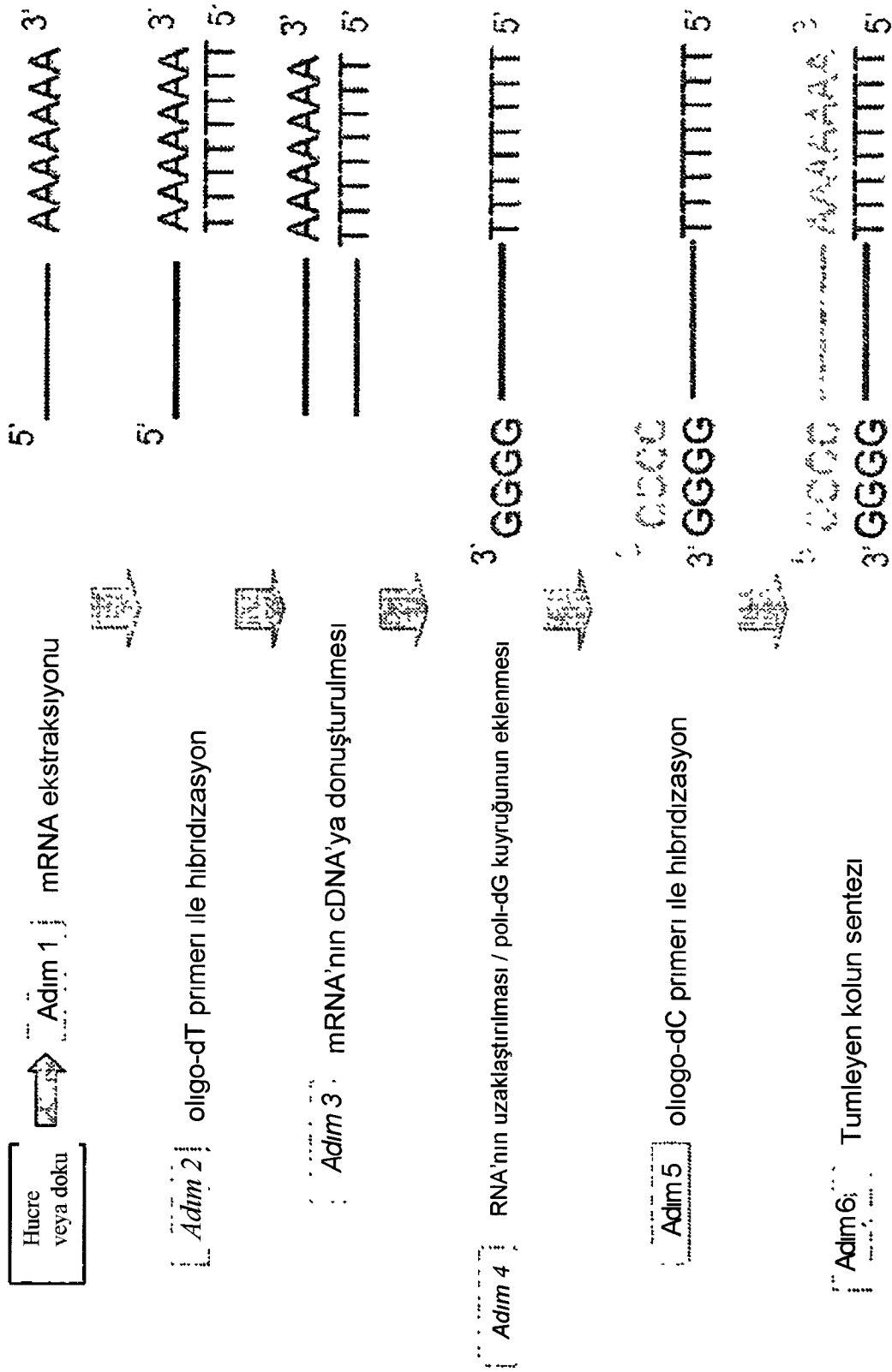
Cys Thr Ile Pro Leu Pro Gly Ile Lys Ala Gln Gly Thr Ser Gly Glu
          85           90           95

His Tyr Cys Ser
          100
  
```

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 32

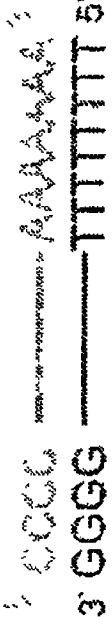
```

Gly Thr Ser Pro Pro Val Asp Leu Lys Asp Glu Gly Trp Asp Phe Met
1           5           10           15
  
```



Şekil 1a

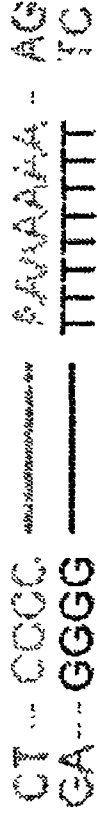
Adım 6: Tümleyen kolun sentezi



Adım 7: cDNA'nın bağlayıcılara ligasyonu



Adım 8: Kısıtlama enzimi ile parçalama



Adım 9: Klonlama vektörüne ligasyon



Adım 10: Dizilim



Şekil 1b

>gi|165Q7965|ref|NM_001428.2| Homo sapiens enolaz 1 (alfa) (EN01) mRNA

TAGCTAGGCAGGAAGTCGGCGTGGGGCGCGGACAGTATCTGTGGGTAACCGSAGCACGGAGATCTCGCGGCTTTACGTTCAACCTCGG
 TGTCTGCAGCACCCCTCCGGTTCCTCTCTAGGAGGAGAGACCCAGTGGCTAGAAAGCTCACCAAGTCTATTTCTCAAHATCCATGCCAAGGGA
 GATCTTTGACTCTTGGCGGAATCCCACTGTTGAGGTTGATCTCTTCACTCAAAAGGCTCTTTAGAGAGCTGCTGCGCCAGGTTGCTTC
 AACTGGTATCTAAGAGGCCCTAGAGCTCAGGACCAATGATAGACTGCTATATGCGAAGGCTGTCTCAAGCTTCTTGAACACATCAAA
 TAAACUATTTGCGCTGCCCTGGTTAGCAAGAAACTGAACGTCACAGAACAGAGAAAGATTGACAAACTGATGATCGAGATGATGAAAC
 AGAAATAAATCTAAGTTGGTGTGAACGCCATTCTGGGGTGTCCCTTGGGTCAGCAAGCTGTGCTGCTTGAAGGTTGAAGGTTCCGCT
 GTACCGCCATATCTGTGACTTGGCTGGCAACTCTGAAGTCACTGCGAGTCCCGGCTGCTCAATGTGTCATCAATGGGCTTCTCATGTTGG
 CAACAAGCTTGGCATGCAAGGAGTTCATGATCCTCCCAATGGGTGCAGCAAACTTCAGGGAAGCCATGCGCATGCGAGGAGGTTTACCA
 CAACCTGAAGAAAGTCAATCAAGSAGAAATATGGGAAGATGCCACCAATTTGGGGGATGAGAGCGGGTTTGCCTCAACATCTCTGGAGGA
 TAAAGAGGCTCTGAGCTGCTGAAGACTGCTATTTGGAAGCTGGCTACACTGATAGGTTGTTATATCGGCTATGGACGTAGCGGCTTCGGA
 GTTCTTCAGGTCAGGGAAGTATGACCTGGATTCAGAGTCTCCCGATGACCCCAAGGAGTACATCTCGGCTGACCCAGCTGAGCTGACCTGTA
 CAGTCTCTCATCAAGGACTACCCAGTGGTGTATATGGAAGATCCCTTTGACCAAGATGATCTGGGAGCTTGGCAGAGTTCTCAACCTGCTT
 TGCAGGAATCCAGGTATGTGGGATGATCTCAGGTGACCAACCCAAAGAGGATCGCCAGGCGCTGAGAGGATGAGTCTGCAACCTGCTT
 CCGTCTCAAGSTCAATCAGATTGGCTCGGTGACCGAGTCTCTCAGGCTGTCAAGCTGGCCAGGCTCATGAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 TCACTGGTCTGGGAGAGCTGAGATACCTTTCATCTCTGAGCTGGTTGTGGGCTGTGACCTGAGGAGATGAGGCTTGGGCTGGGCTTGGGCT
 ATCTGAGCGCTTGGGCAAGTAAACAGCTCTCAGATTTGAGAGGAGGCTTGGGAGCAAGGCTAAGTTTGGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT
 CCGCTTGGGCAAGTAAAGCTTGGGAGGGAAGTCTTGGTCACTGTTGGCTACAGAGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
 GAGGCGCCCGAGCAACACTTGCAGGCT
 GCGAAGCTCTGAGGCT
 AGTGTCTAGAGTCAATGTGAATCTGCT
 GTGACCCCATGAG

Şekil 2a

>gi|56682958|ref|NM_002032.2| Homo sapiens ferritin, ağır polipeptid 1 (FTH1), mRNA

AFAAGAGACACACAGCGAGCCCGCAAGGCCAGAAAGTCTCTTCTCCGAGAGTCTGCGGCTTCCCTGCTTCACACATATGCTTGACCGAAG
 CGGGCGCTCGTTCCTCCACATCGGGCGCGGCGGCCCATAGCCAGCCCTCCGGTCACCTCTTCACATGACCTCTGACATGCCCCAAGGTCC
 CGCGCGCGCTCCCGCGCGCGGACGCAAGCGCGCGCGCGCTCTCTCTAGTCGCGCGCATGACGAGCTTGGTCCACCTCTCGGAGGT
 GCGCCAGAACTACACCCAGGACTCAGAGGCGGCCATCAACCGCGGAGATCAAGCTGGAGCTCTAGGCTCTCTACGCTCTCTACGTTTACCTGTCCAT
 GTCTTACTACTTTTGACCGCGGATGATGTGGCTTTTGAAGAACTTTTGGCCAAATAGCTTTCTTCAACCAATCTCATGAGGAGAGGGGAACATGC
 TGAGAAACTGATGAAGCTGCAGAAACCAAGAGGTGGCGGAATCTTCCCTTCAGGATATCAAGAAACCTAGACTCTGTATGACTGGGAGAG
 'CGGCTGAATGCCAATGGAJTGTCATTACATTTGGAAAAAATATGTGAATCAGTCACTACTGGAACCTGCCACAACTGGCCACTGACAA
 AATGAA'CCCCATTGTGTGACTTCATTGAGACACATTAACCTGAAAGAGCAGGTCAAGCCATCAAGAAATTTGGGTGACCAATGCTGAC
 CAACCTTSCGCAAGATCGGAGCGCCCGAATCTGGCTTGGCGGANTATCTCTTTGACAGCAGACACCTTGGGAGACATGTGATATGAAG
 CTAAGCCTCGGGCTAATTTCGCCCATAGCCCGTGGGTGGCTGGTCAACCAAGSCAGTGCATGTAATGTGGGTGGGTGGGTGGGTGGGT
 TTTCTATAAATGTGTAACAAACATCCACTTAATTTCTTTGATTTGTAATATTCCTTCAAAATAAATTAATTTGGTACCCATGCTGTGT
 CTTTGAGGTCTTTGGGACGATCAAGAAATCTATCCAGGCTATCTCCAGATCTCTTAAATGCGGCTTTTCAGTCTCTATCAATCAATCAAT
 CAAAAAGAAACGAGTATTGTATTTATTAATCTATAGTTTGGGAGTATACATAGGTGTGGCTGTCTTTGGATTCAGATAGAACTA
 AAGGTTCCCGACTCTGAAATCCAGAGTCTGAGTTAAATGTTTCCCAATGGTTCAGTCTAGCTTTTACAGTCTTTTATGAAATAAAGGCAAT
 TAAAGGCTGA

Şekil 2b

>gl|39812410|reflNM_001007 3| Homo sapiens ribosomal protein S4, X-bağlı (RPS4X), mRNA

```

GGGCTGAGCAGCTGAARATCCGGCGCGCGCAGICTCCAGCTCCAAATTTCCTATCCSCACCCGGGAAGACGGAGGTCCTCTTTCCTTCTCT
AACCCAGCCATGGCTCGTGGTCTCCAGAGAACCAATCTGAGCGGCTGGCAGCTCCAAAGCTATCTGGATGCTGGATATAAATTGACCGGCTGTG
TTTGGTCTCTGGTCTATCCCGCGGCTCCCGCAGAGCTTAPAGAGTCTCTCCCGCTCATCAATTTCTCTGAGGAGACAGACITTAAGTATCTGCT
CTGACAGGAGATGAAGTAAAGATTTTGGATGCGAGCGGCTTCATTAAATCGATCTCAGGCTCCGAACTGATATAAACCTACCCCTGCT
GGATTCTATGATCTCATCTSCATTGACAGACGGGAGAAATTTCTCTGATCTATGACACCAAGGGTCTCTTTGCTGTATCATCTCT
ATTACACCTGAGGAGGCGCAAGTACAACTGTGCAAAAGTGAAGAACTCTTCTGTGGCACAAGAGGAATCCCTCATCTCIGGTGACTCAT
GATGGCCGCAACCATCCGGTACCCCGATCCCTCATCTCAGGGTGAATGATACCATTCAGATTTGATTTGGAGACTGGCAAGATTTACTGAT
TTCACTCAGATTCGACACTGATGTAACCTGTGTATGGTGACTGGAGGTGCTAACTAGAGAAATTTGGTGTGATCAACCAACAGAGAGAGG
CAGCTCTGATCTTTTGACGTGGTTCACCTGAAGATCTCCAAATGGCAGCAGCTTTGCCACTCGACTTTTCCACATTTTCTGTTATTTGGC
AAAGGCAACAAACCATGGATTTCTCTCTCCCGGAGGAAAATGATATCCGCTCACCAATGCTGAGAGAGAGAGACAAAGACTGATCTGCT
AAACAGGCGCAGTGGGTGAATGATCTCTGGTACCACTGACAGATCTCTTGAAGTAAATTAATAATATTTCTGACAGGATTAATATAC

```

Şekil 2g

>gi|17158043|ref|NM_001010102| Homo sapiens ribosomal protein S6 (RPS6) mRNA

CCTTTTTCCTGTCGGGCGCTCGAGGCGTTCCAGCTGCTTCAATGAACTGGAACAATCTCTCCACAGCACTGGTTGCCAGAAACTTA
TTCAGAGTGGACGATGAACACCAACTTCGTACTTTCTATGAGAAAGCGTATGACCAACAGAAAGTTGCTGCTGACCGCTTGGSTGAAGAATG
GAAGGGTTATGTGGCCGGAATCAGTGGTGGGAACGACAAACAAGGTTTCCCAATGAATGACAGGCTGTTGACCCCATGGCCATGTCCTG
CTCTTACTGAGTAAGGGGCATTCTGTTACAGAACCAAGGAGAACTGAGAAAGAAAGHGAATCAAGTTTGGTGTGGCATTTGTTGGATG
CAATCTGAGCGTTCTCAACTTGGTTATTGTAAATAAAGSAGAGAGGATATTCTTACTGACTGATACCTACAGTGGCTTGGGCTGCTT
GGTCCCAAAAGAGCTAGCAGAAATCCGCAACTTTTCATCTCTTAAAGAAAGAIGATGTCGCCAGTATCTTAAAGAAAGCCCTTA
AACAAAGAAATTAAGAAACCTAGGACCAAAACCAACCAAGATTTCAGCTGTTGTTCTCCAGCTGCTGACAGCAAAACGGCCGGCTA
TTGCTCTGAGAGAGCAGCTATACCAAGAAATAAAGAAATGCTGAGAAATATGCTAAACTTTTGGCCAAAGAGATGAAGTAACCTAA
GSAGAAAGCGCCAGGACAAATTGCGGAAGAGACGACACTTCTCTCTGGSAGCTTCTACTTCTAAGTCTGAATCCCASTCAGAAATAA
GATTTTTCAGTAACAATAAATAGATCAGACTCTG

Şekil 2h

>gl|4507668|reflNM_003295.1| Homo sapiens tumor protein, donuşumsel-kontrollu 1 (TP1), mRNA

```

CCUCCCGGAGGCGCGCTCGGCTCGACCGCGCTCGCTCGAGTTTCAGGCTCTGTGCTAAGCTAGCGCCCTGCTGCTCTCCAGT
CGCTTATCATGATTATCTTACCGGGAATCTCATCAGGACCGAIGAGAGATGTTCTCCGACATCTACAGATCCGGGAGATCGCGGACGASTT
GTGCTTGAGGCTGGAGGGGAGATGGTCAGTAGGAGAGAGGTAACTGGATGATGGCTGATTTGATGGAAATGCTCCGCTGAGGG
CCCCGGCGGAGGAGGTACCGGAAAGCACATCACTGGTGTCCGATATTGTGATGAACGATACCTGGAGGAAACAAAGTTTCAGAAA
AGAAAGCCTACAGAAAGTACAAGAAAGATTACAGAAATCAATCAAGGGGAACTTGAAGAACTAGAGCCAGAAAGAGTAAACCTTT
TATGACAGGGGCTGAGAACAAATGAAGCACAAATGAAGCACATCTGTCTAATTTCAAAACTACGCTTCTTTATTTCTGAAACATGAATCAGAA
TGCAATGGTTCCTTATTTGGACTACCGTGAGGAGTGGTGTGACCCATATAATGATTTCTTTAAGGATGCTTTAGAAATGGAAATATG
TTACCAATTTGGCAATTAATTTGGATCTATCACCCTGTATCATAACTAGCTTCTGCTTCTTTCAICACAGAACACACAGGACTTAAAG
CAAAATGGGACTGATGTGATCTTGAGCTCTTCAATTTATTTTGAATTTATTTGGAGTGGAGGAACTTGTCTTTTAAGAAACATG
TCATGTAGGCTGTAAATGAATGCAATTAACCTCAATTTGAGAG

```

Şekil 2j

>gij34577108refNM_000034.2|Homo sapiens aldolaz A, fruktoz-bisfosfat (ALDOA), transkript varyanti 1, mRNA

[illegible]

Şekil 2m

>g|20428653|ref|NM_001743.3| Homo sapiens kalmodulin 2 (fosforilaz kinaz, delta) (CALM2), mRNA

AGTCTGAGCTGAGAGAGACGCGCTGAGTGGTTGGTGGTGGGGTACCGGTAGCGCTTGTGACGATCGCTGACACCAACTGACTGAAACA
GCAGATTGCCAGAAATTCAGAGAGCTTTTCACCTATTGTGCAAGAGATGGTGAATGGAACTATACACACCAAGAGAAATTTGGGAACTGTAAATGAGA
TCTCTTGGGACAGAAATCCACACAGAAAGCGAGAGTTACAGSSACATGATTAATGAAGTAGATGCTGATGAGGTAAATGCGACAACTTCCCTGCAAT
TTCTGACAAATGATGGCAAGAAATATGAAGACACAGACACGCTGAAGAAATTAGAAGACCATTTCCGTGTCTTTGAAAGAGATGAAATCT
CTATATTAGTGTGCAGAACTTCCGCAATGTCGATGACAAACCTTGGACAGAAATTAACAGATGAAGAAATTTGATGAATGATCATCAGGAAAGCA
GATATTGATGGTGAATGATCAAGTAAACTATGAAGAGTTTGTACAAATGATGACAGCCAAAGTGAAGACCTTTACCAAAATGTCTTAAATTTT
TTGTACAAAAATTTGTTTATTTGCTTTTCTTTTGTGTTGTTTCTTTGTTGTTTCTTTGTTGTTTCTTTGTTGTTTCTTTGTTGTTTCTTTGTTGTTT
ATTAGGACCTTCATTCTCCATGTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
CATSTGGCTTACTCTGACATATATCTAAGCCTTTCTTSCACATCTAATCTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTT
TTTAAAGTAAATTTCTTAAAGTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTT
GTTCTTAAAGTTGCACTATTTCGAAACCGGTTGTTATATCCAGTTACTCTTACACTATTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
TTTCTTTTATTTGTTTACTTCTTTTCTTTTAAATTTGTTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTT
ATATTGTTTCTTCCACACAAATATACAAATTTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTTAACTT

Şekil 20

>gi|5031856|ref|NM_005566.1| Homo sapiens laktat dehidrogenaz A (LDHA), mRNA

TGTTGACGCGGCTGGCGCGGATTCGGGATCTCATTTGCCAAGGCGCGCCCGCGAAGACCGCGCGGCGATTCGCGATTCCTTTGGTTCTGAAG
TCCAAATATGCGCACTCTAAGAGATCAGCTGATTTATAATCTCTTAAGGAGAGAACAGAGACCCGCCAGGATTAAGATTAACAGTTGTTGGGCTTG
GTGCTGTGGCCATAGCCCTGTGGCATCTCAATATCTTAAGAGAGCTTGGCGAGATGAACCTGGTCTTGTGTGATGTCATCGAAGACAAATAGAA
GGGAGAGATGATGATGATCTCCAAACATGGCGAGCTTTTCCTTAGAAGACCGPAGATTTGTGTCTGGCAAGAGCTATATAATGTAATCTGCGAACTCC
AAGCTGATCATTAICAGGCTGGCGACGTCGCGAGAGGGGAGAAAGCCCTCTTAATTTGCTCCAGCCTAAGCTGAGACATATTTTAAATTC
TCATTCCTAATGTTGTAAATACAGCCCGGAATCCAAAGTTGCTTATTGTTTCAATTCAGTGGATATCTTGACCTACCTAGCTGGCTTGGAAGAT
AAGTGGTTTTCCTCAAAAACGCTGTTATTGGAGGTGGTTGCAATCTGGATTCAGCCCTGATTCGGTACCTGATGGGGGAAAGCTGGGAGTT
CACTCATTAAGCTGTCAATGGCTGGGTCTCTGGCGAAGCTGGGACATTCCTCACTGTGGCTTATAGAGTGGATGAATGTTGGCTGGTGTCTCTC
TGAAGACTCTGCACCCAGATTAGGGACTGATAAGATAGGAAAGAGTGGAAAGAGGCTTCACAAGCAGCTGTTGAGAGATGCTTATGAGGT
GATCAAGCTCAAGGCTACACATCTCTGGCTATTGSAATCTCTGTAGCAATTTGGCAGAGAGTATATAAGAGAAATCTTAGCGGGCTGGCAC
CCAGTTTCCACCATGATTAAGAGCTCTTTACGGGATTAAGAGATGATGCTCTCTCTTAGTGTTCTCTTGCATTTTGGGACAGAAATGGAATCTCAG
ACCTTGTGAAGGTSACTCTGACTCTCTGAGGAGAGAGCCCGTTGAAGAGAGTGGAGATACACTTTGGGGATCCAAAGAGAGCTGCAAT
TTAAGTCTTCTGTTGTCATATCATTTTCACTCTCTAGCTTACACAGGATTTCTAGCTGGAGGTTTGGCATGTTTGTCTTTTATCTGATCT
GIGATTAPAGCAGTAAATATTTAAGAIGGACCTGGAAAGACATCAACTCTGAAGTTAGAAATAGAAATGTTTGTAAATCTCACAGCTAT
ATCCTGAIGCTGGATTAATCTTTGTGTAGTCTCTCAACTGGTTAGTGTGAAGATGTTCTGCCACCTCTGAAGAGAGGATCTTATTTTCT
GTACGTACTGACATTTGGCCCTTTSAGCCAGGCTAATGTTTACCGTGTGTTATATAACTCTCTGGCTCTCTCACTGAACATCTCTAGTCCAAAC
ATTTTTCCTCCAGTSACTCACATCTCTGATCCAGTGTATAAATCCAAATATCATGCTTGTGTCATAAATCTCTCTGAAGGATCTTATTTTCTG
AACATATACATATGCTACATTCCTCATATTAAGTAAAGATCTACATCAACCAATGCAACCACTATCCAAAGTGTCTATGCCACATAA
TCCCGCAATAAAGCTTGAACAGTG

Şekil 2p

>gi52851446|reflNM_000365.4| Homo sapiens trosefosfat izomeraz 1 (TPI1), mRNA

```

CCITCAGCGCCTCGGCTCCCRSCGCAIGGGGCTCCCTCCAGGAAATTCCTTGTGGGGGAAACTGGGAAATTAACGAGGCGGAGCAGAGTCIG
GGGGAGCTCATCGGCACCTGTGAAGGCTGGCAAGGTGGTGTCTTGTCTCCCTTACTGCTCCCTATAATCGACCTTCGGCTT
GGCAGAAAGCTAGATCCCAAGATTGCTGTGGCTGGCCAGAACTGCTTAAGATGACTAATGSGGCTTTTACISGGGAGATCCGCTTGGTCTAT
GATCAAGAGACTGGGGAGCCACGTGGGGIGGTCCGAGGGCACTCAAFAGAGAAAGGCACTGTCTTTGGGAGTCAAGATGAGCTGATTGGGCAAGAA
GTGCCCCATGCTCTTGGTAAGGGACTGGAGATATGCGCTGCAATGSGGAGAACTAGATGAAGGGGAAAGCTGGCTTCACTGAGAAAGGTTG
TTTTGAGCGAGCAAAAGGTTCATCGCAGATTAACGTGAAGGACTGGAAGAAAGGTGAAAGTGTCTGSCCIATGAGCCGTGTGAGGCAATTGGTACIGS
CAGAACTGCANACTCCCAACAGGCCCGGAGGAACTACACGAGAAAGTCTGAGGATGAGCTGAAGTCCAAAGCTCTTATGAGGATGCTTCAATGATC
AGCCGTATCATTTAAGGATGCTGTGTAATGAGGCTGCAAGGAGCTGGCCAGCCAGGCTGAGTGTGATGAGCTTCCCTGGGTGGTGGTGGTGGT
CTTCCCTCAAGCCGAAATTTGTGATCATCATGATGATGAGCCCATGCTCCATCTTCCCTACCCCTTCCCTGCGCAATCATAATGAGTGTGATC
GATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TCCTTTACIGTTTAAATCTTCAAGCTGTAATGTTGGGAGCAATGCTTCCACTTACTATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
AGGTGGCTTCTCTCTTGGCTGAGAGATGGAAGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCT
CTCTCTCTCTTACAGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
TGAACCAACCCCATGTGAGGGGAAATTAACCTTGGCAGTAGG

```

Şekil 2q

TPT1 = Tümör proteini, dönüşümsel olarak kontrollü, 1, 830bp, chr 13 q12-q14.

VIM = Vimentin, 1847bp, chr 10 p13.

FTH1 = Ferritin, ağır polipeptid 1, 1228bp, chr 11 q13,

RPS4X = Ribozomal protein S4, X-bağı, 955bp, chr X q13.1.

RPL7A = Ribozomal protein L7a, 890bp, chr 9 q34.

EN01 = Enolaz 1, 1812bp, chr 1 p36.3-p36.2.

HSPA8 = Isı şoku 70kDa protein 8, 2260bp, chr 11 q24.1.

GAPDH = Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz, 1310bp, chr 12p13.

TMSB4X = Tiymosin, beta 4, X bağlı, 627bp, chr X q21.3-q22.

RPS6 = Ribozomal protein S6, 829bp, chr 9 p21.

FTL = Ferritin, hafif polipeptid, 870bp, chr 19 q 13.3-q13.4.

ALB = Albümin, 2215bp, chr 4 q11-q13.

ALDOA = Aldolaz A, fruktoz-bisfosfat, 2303bp, chr 16q22-q24.

ATP5A1 = ATP sentaz, H⁺ taşıyıcı, mitokondriyal F1 kompleksi, alfa alt ünitesi 1, kardiyak kasi, 1945bp; chr 18q12-q21.

CALM2 = Kalmodulin 2 (fosforilaz kinaz, delta), 1128bp, chr 2p21.

LDHA = Laktat dehidrojenaz A, 1661bp, chr 11p15.4.

TP11 = Triosefosfat izomeraz 1, 1220bp, chr 12p13.

Şekil 2r

>gi147009767|emb|BX437546.2| BX437546 Homo sapiens THYMUS Homo sapiens cDNA clone C50CAP007YK06
5-PRIME, mRNA sequence.

Length = 868

Score = 1531 bits (829), Expect = 0.0

Identities = 829/829 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 2 cccccgagcgcgcgtccggctgcaccgctcctccgagttccaggctcgtgctaagc 61
|||||
Sbjct: 12 cccccgagcgcgcgtccggctgcaccgctcctccgagttccaggctcgtgctaagc 71

Query: 62 taagcgcgcgcgcgcgtcctcccttcctccgctccatcctccatccaccggaccctccatcagc 121
|||||
Sbjct: 72 taagcgcgcgcgcgcgtcctcccttcctccgctccatcctccatccaccggaccctccatcagc 131

Query: 122 caccgatgagatgttctctccgacatctacaaagatccgggagatccgggacgggtctgtgctctg 181
|||||
Sbjct: 132 caccgatgagatgttctctccgacatctacaaagatccgggagatccgggacgggtctgtgctctg 191

Query: 182 gaggctggaggggagagatggtcagtcaggacagaggtcaccttgatgactcgctccattggt 241
|||||
Sbjct: 192 gaggctggaggggagagatggtcagtcaggacagaggtcaccttgatgactcgctccattggt 251

Query: 242 ggaatatgctctccgcttgaaagcccccagggccgagggacacagacacagacactggt 301
|||||
Sbjct: 252 ggaatatgctctccgcttgaaagcccccagggccgagggacacagacacagacactggt 311

Query: 302 gtcgatatgtgcacgaccatcacctgcaggaaacaaagcttcacaaaagagagcctcacag 361
|||||
Sbjct: 312 gtcgatatgtgcacgaccatcacctgcaggaaacaaagcttcacaaaagagagcctcacag 371

Şekil 3 a

Query: 362 aagtcacatcaaaagattcacatgaaatccatccaaagggaaaccttgaaagaaacagagaccagaa 421
 |||
 Sbjct: 372 aagtcacatcaaaagattcacatgaaatccatccaaagggaaaccttgaaagaaacagagaccagaa 431

Query: 422 agagtataaacccttttatgacagggggtcgcagaaacaaatcagacacatcccttgctaatctc 481
 |||
 Sbjct: 432 agagtataaacccttttatgacagggggtcgcagaaacaaatcagacacatcccttgctaatctc 491

Query: 482 aaaaactaccagttctttattgggtgaaaaacacatgaaatccagatggcatggctctctattg 541
 |||
 Sbjct: 492 aaaaactaccagttctttattgggtgaaaaacacatgaaatccagatggcatggctctctattg 551

Query: 542 gaccaccgtgaggaatgggtgtgaccccatatataatgtttctttaaggatggcttcagaaatg 601
 |||
 Sbjct: 552 gactaccgtgaggaatgggtgtgaccccatatataatgtttctttaaggatggcttcagaaatg 611

Query: 602 gaaaaaatgttaacaaaatgtggcaatttatcttggaacctatccaccctgcccacatgaactggct 661
 |||
 Sbjct: 612 gaaaaatgtttaacaaaatgtggcaatttatcttggaacctatccaccctgcccacatgaactggct 671

Query: 662 tctgctctgctatccacacaaacaccaggaacttaagacaaaatgggaactgaatgctcttgaag 721
 |||
 Sbjct: 672 tctgctctgctatccacacaaacaccaggaacttaagacaaaatgggaactgaatgctcttgaag 731

Query: 722 cctctccattttattcttgactgtgtattctattctggagggcattgtcttccaaagaaaaaca 781
 |||
 Sbjct: 732 cctctccattttattcttgactgtgtattctattctggagggcattgtcttccaaagaaaaaca 791

Query: 782 tgtcatgtcaggtctctaaaaataaaaatgcattcaaacctcattctgagag 830
 |||
 Sbjct: 792 tgtcatgtcaggtctctaaaaataaaaatgcattcaaacctcattctgagag 840

Şekil 3b

```
>gi145716222|emb|AL540618.3| AL540618 Homo sapiens PLACENTA MONO sapiens CDMA clone C50DE002YF23
S-PRIME, mRNA sequence.
Length = 952
```

```
Score = 1531 bits (829), Expect = 0.0
Identities = 829/829 (100%)
Strand = Plus / Plus
```

```
Query: 2   cccccgagcgcgcgtccggctgcaccgcgcctccgccttcaggttcgctcctcagc 61
          |||||
Sbjct: 18   cccccgagcgcgcgtccggctgcaccgcgcctccgccttcaggttcgctcctcagc 77
```

```
Query: 62   tagcgcgcgtcgtcgtctctcccttcagtcgcctcatcattatctaccgggacctcaccagc 121
          |||||
Sbjct: 78   tagcgcgcgtcgtcgtctctcccttcagtcgcctcatcattatctaccgggacctcaccagc 137
```

```
Query: 122  caccgacgagatgctctctccgacatctcaccagatctcgggagatcgcggacgggtgctgcctg 181
          |||||
Sbjct: 138  caccgacgagatgctctctccgacatctcaccagatctcgggagatcgcggacgggtgctgcctg 197
```

```
Query: 182  gaggtcggaggggagagatcggctcagtaggacagaaaggtaacattcgtatgactcgtctcactcgt 241
          |||||
Sbjct: 198  gaggtcggaggggagagatcggctcagtaggacagaaaggtaacattcgtatgactcgtctcactcgt 257
```

```
Query: 242  ggaatcgcctctccgctgaaaggcccccgaagggtaccgaaagcacagtaactcactcgt 301
          |||||
Sbjct: 258  ggaatcgcctctccgctgaaaggcccccgaagggtaccgaaagcacagtaactcactcgt 317
```

```
Query: 302  gtcgacatctgtcctgaaccattcctcgcaggaaacaaagtcttcacaaagaaagccttaccag 361
          |||||
Sbjct: 318  gtcgacatctgtcctgaaccattcctcgcaggaaacaaagtcttcacaaagaaagccttaccag 377
```

```
Query: 362  agtcacatcagaagattacatgaaatcaatcaaggggaaacttcgaagacagagaccagaa 421
          |||||
Sbjct: 378  agtcacatcagaagattacatgaaatcaatcaaggggaaacttcgaagacagagaccagaa 437
```

Şekil 3c

Query: 482 aaaaactaccagttcttctatttggtgaaatacatgaatccagatggcatggctctctattg 541
 |||||
 Subject: 498 aaaaactaccagttcttctatttggtgaaatacatgaatccagatggcatggctctctattg 557

Query: 542 gacttaccgttgaggatgggtgtgacccccatcatatgtatcttcttcaaggatggcttctagaaatg 601
 |||||
 Subject: 558 gacttaccgttgaggatgggtgtgacccccatcatatgtatcttcttcaaggatggcttctagaaatg 617

Query: 602 gaaaaaatgttcaacaaatgtgtgcaattatcttggatcttatcattctgtctcatatatttggct 661
 |||||
 Subject: 618 gaaaaaatgttcaacaaatgtgtgcaattatcttggatcttatcattctgtctcatatatttggct 677

Query: 662 tctgcttctcatccacacacacaccaggacattcagacaaatcgggacctgactgctcttgag 721
 |||||
 Subject: 678 tctgcttctcatccacacacacaccaggacattcagacaaatcgggacctgactgctcttgag 737

Query: 722 ctctctccattctattctgactgttgattctattcttgagctggagggcatctgtcttctaaagaaaaaca 781
 |||||
 Subject: 738 ctctctccattctattctgactgttgattctattcttgagctggagggcatctgtcttctaaagaaaaaca 797

Query: 782 tgtcatgtaggttgcctaaaaataaaaatgcatttcaactctattcttgagag 830
 |||||
 Subject: 798 tgtcatgtaggttgcctaaaaataaaaatgcatttcaactctattcttgagag 846

Şekil 3d

>0145696213|emb1AL520698.3| AL520698 Homo sapiens NEUROBLASTOMA COT 10-NORMALIZED Homo sapiens
 CNA Clone C500802YF24 5-PRIME, mRNA sequence.
 Length = 909

Score = 1530 bits (828), Expect = 0.0

Identities = 828/829 (99%)

Strand = Plus / Plus

Query: 2 cccctcgagcgccgctccggctgcaccgcgcctccgctccgagctctcagggctcctgctcaagc 61
 |||||
 Sbjct: 18 cccctcgagcgccgctccggctgcaccgcgcctccgctccgagctctcagggctcctgctcaagc 77

Query: 62 cagcgccgctcgtcgtctccctccagtcgccaccatcgatcatctaccggggaccctccatccagc 121
 |||||
 Sbjct: 76 cagcgccgctcgtcgtctccctccagtcgccaccatcgatcatctaccggggaccctccatccagc 137

Query: 122 caccgatgagatgtctctccgacatctctacagatcccgggagatcccgggacgggctcgctgctctg 181
 |||||
 Sbjct: 136 caccgatgagatgtctctccgacatctctacagatcccgggagatcccgggacgggctcgctgctctg 197

Query: 182 gaggctggaggggaaagatcggtccagtaggacagaaaggtaacatctgacgactccgctccatctggt 241
 |||||
 Sbjct: 198 gaggctggaggggaaagatcggtccagtaggacagaaaggtaacatctgacgactccgctccatctggt 257

Query: 242 ggaatgcctccgctgaaagcccccgaaggctaccgaaagcacagtcgatcactctggt 301
 |||||
 Sbjct: 258 ggaatgcctccgctgaaagcccccgaaggctaccgaaagcacagtcgatcactctggt 317

Query: 302 gtcgatatctgtcatgaaccatcaccttcgagggaaacaggtctccacaaaagaagcctacaaag 361
 |||||
 Sbjct: 316 gtcgatatctgtcatgaaccatcaccttcgagggaaacaggtctccacaaaagaagcctacaaag 377

Query: 362 aagtcacatcacaagattacatgaaatcgaatcgaagggaaactctgaaagaaacagagaccagaa 421
 |||||
 Sbjct: 376 aagtcacatcacaagattacatgaaatcgaatcgaagggaaactctgaaagaaacagagaccagaa 437

Şekil 3e

Query: 422 agagtaaaaccccttctatgacaggggctgcagaaacaaatcaagcacatcccttgctaatctc 481
 |||||
 Sbjct: 438 agagtaaaaccccttctatgacaggggctgcagaaacaaatcaagcacatcccttgctaatctc 497

Query: 482 aaaaactaccagttcttctattggtgaaaaacatgaatccagatggcatggttgctctattg 541
 |||||
 Sbjct: 498 aaaaactaccagttcttctattggtgaaaaacatgaatccagatggcatggttgctctattg 557

Query: 542 gactaccgtgaggatggctgaccccatatatgatcttctttaaggatggctcttagaatac 601
 |||||
 Sbjct: 558 gactaccgtgaggatggctgaccccatatatgatcttctttaaggatggctcttagaatac 617

Query: 602 gaaaaatgcttaacaaatgtggaattcttctggatcttctcacctgtcatcatcaactggct 661
 |||||
 Sbjct: 618 gaaaaatgcttaacaaatgtggaattcttctggatcttctcacctgtcatcatcaactggct 677

Query: 662 tctgcttctctatccacacacaccaggacttaagacaaatgggactgatgtcatcttgag 721
 |||||
 Sbjct: 678 tctgcttctctatccacacacaccaggacttaagacaaatgggactgatgtcatcttgag 737

Query: 722 ctcttcatcttcttctgactctgtgattcttctggagtggaggcattgtctttaaagaaaaaca 781
 |||||
 Sbjct: 738 ctcttcatcttcttctgactctgtgattcttctggagtggaggcattgtctttaaagaaaaaca 797

Query: 782 tgtcatgtaggcttctctaaaaataaaatgcattctaaactcatcttgagag 830
 |||||
 Sbjct: 798 tgtcatgtaggcttctctaaaaataaaatgcattctaaactcatcttgagag 846

Şekil 3f

>gi|10224966|gb|BE71308.1| QV1-FT0082-710600-249-612 FT0082 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence
Length = 338

Score = 562 bits (304), Expect = e-157
Identities = 316/321 (98%), Gaps = 3/321 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 346 aaaaagaaagccctacacagaa-gtaccatca-aagatccacatgaaatccaatcacaagggaaacttc 403
|||||
Sbjct: 6 aaaaagaaagccctacacagaaacgtracatcagttgacacacg-aaccacacaaagggaaacttc 64

Query: 404 gaagaaacagagaccagaaagagagtaaaacccctcttatgacaggggctgcagaaacaaatccaag 463
|||||
Sbjct: 65 gaagaaacagagaccagaaagagtaaaacccctcttatgacaggggctgcagaaacaaatccaag 124

Query: 464 cacatcccttgttcaatttcacaaactaccagttctcttattggtagaaacatgaatccagatc 523
|||||
Sbjct: 125 cacatcccttgtcraatttcacaaactaccagttctcttattggtagaaacatgaatccagatc 184

Query: 524 ggcattggttgcctctctattggactaccgttgaggatggctgtgacccccatataatgatttctctt 583
|||||
Sbjct: 185 ggcattggttgcctctctattggactaccgttgaggatggctgtgacccccatataatgatttctctt 244

Query: 584 aaggatggtttragaataaggaaaaatgttaacaaatgttggaattattcttggaatctatccac 643
|||||
Sbjct: 245 aaggatggtttragaataaggaaaaatgttaacaaatgttggaattattcttggaatctatccac 304

Query: 644 ctgtcatcataactggctcttc 664
|||||
Sbjct: 305 ctgtcatcataactggctcttc 325

Sekil 3h

>g110246033|gb|BE814599.1| MRO-BN0070-070800-033-b04_1 BN0070 Homo sapiens cDNA, mRNA
 sequence.
 Length = 140

Score = 259 bits (140), Expect = 2e-066
 Identities = 140/140 (100%)
 Strand = Plus / Plus

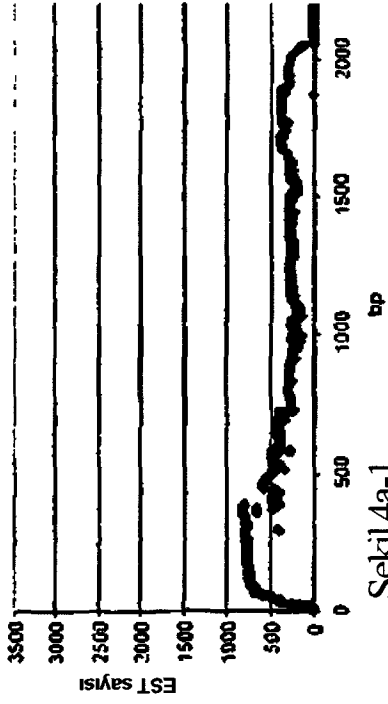
Query: 451 agaaccaaatcaagcacatccttgcctaatccaaaaactaccagtcctcttattggtcgaaaa 510
 |||||
 Sbjct: 1 agaaccaaatcaagcacatccttgcctaatccaaaaactaccagtcctcttattggtcgaaaa 60

Query: 511 catgaatcccagatgggcacatggctctattggactaccctgaggatggctgaccccata 570
 |||||
 Sbjct: 61 catgaatcccagatgggcacatggctctattggactaccctgaggatggctgaccccata 120

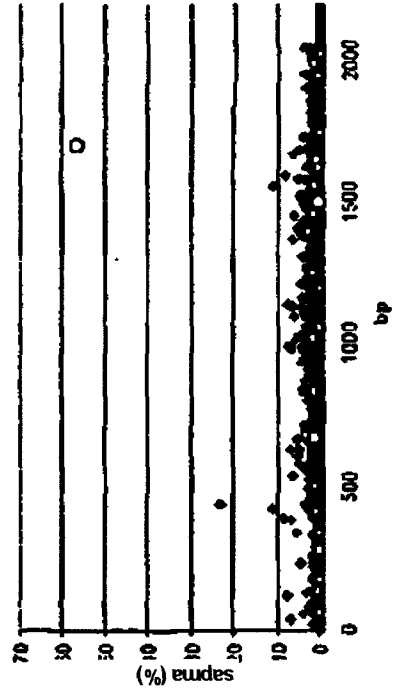
Query: 571 catgattctctcttcaaggatg 590
 |||||
 Sbjct: 121 catgattctcttcaaggatg 140

Şekil 3i

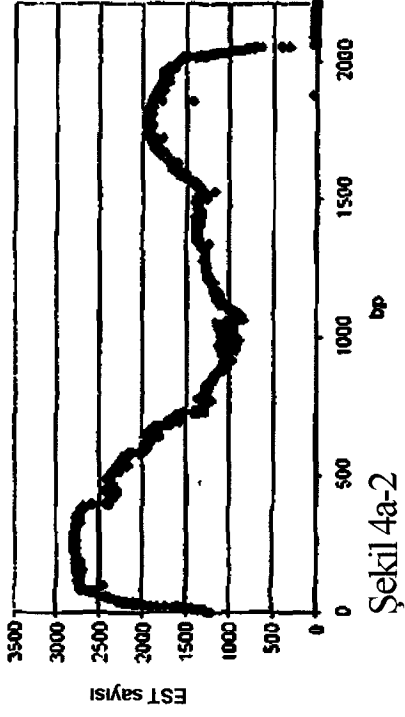
ALB, kanserli EST'lerin sayısı



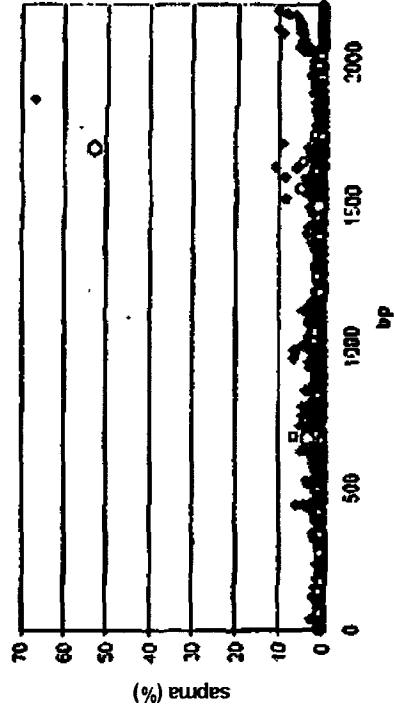
ALB, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

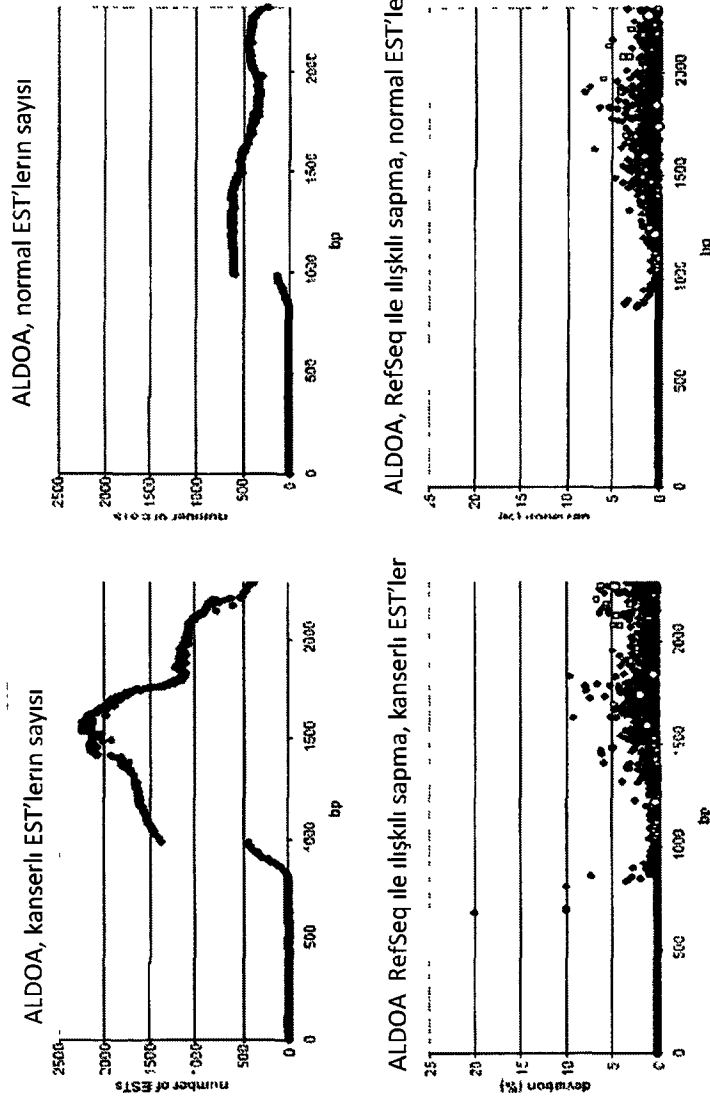


ALB, normal EST'lerin sayısı



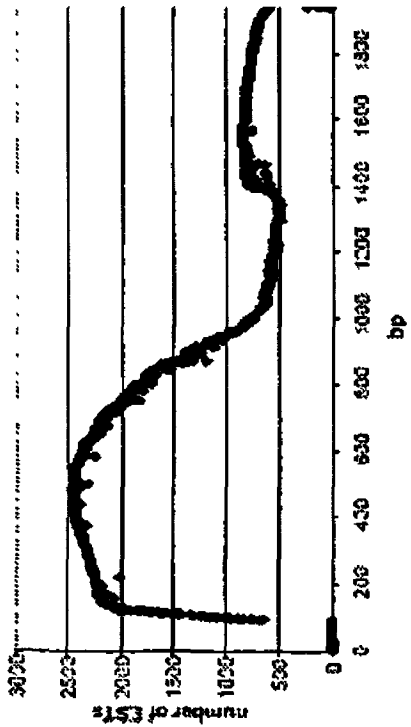
ALB, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler



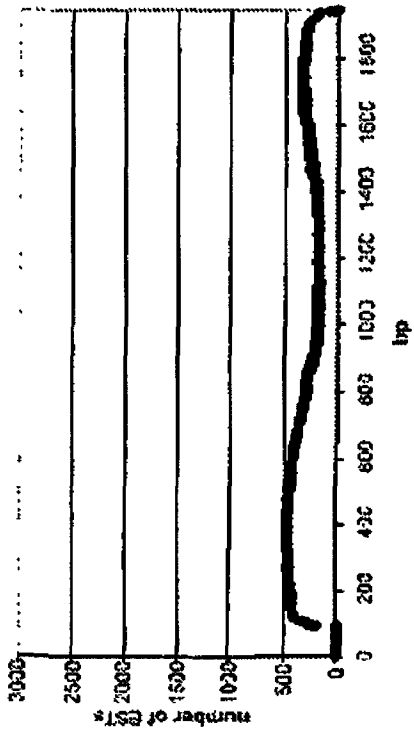


Şekil 4 a (devamı)

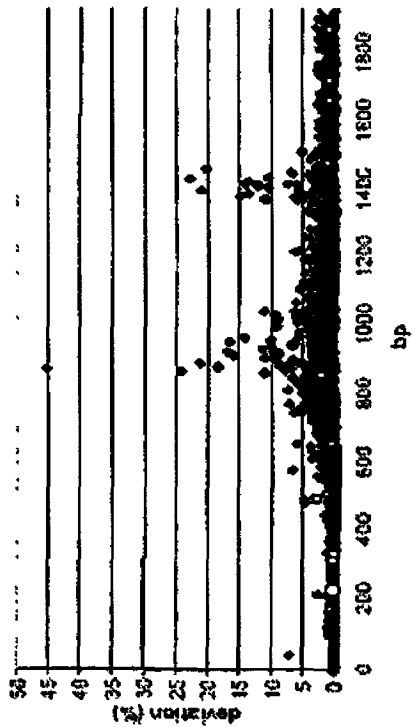
ATP5A1 kanserli EST'lerin sayısı



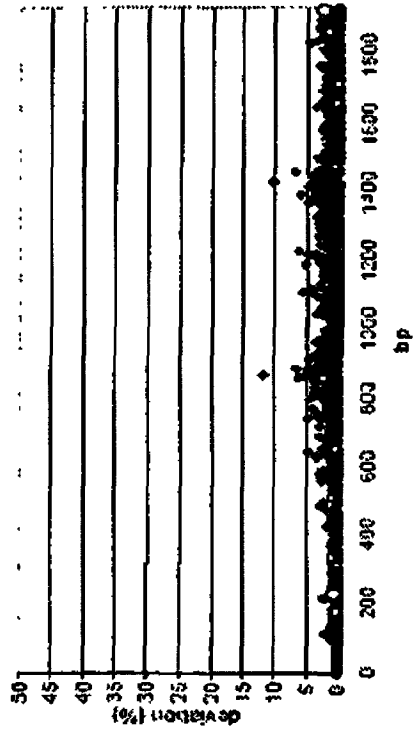
ATP5A1, normal EST'lerin sayısı



ATP5A1 RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

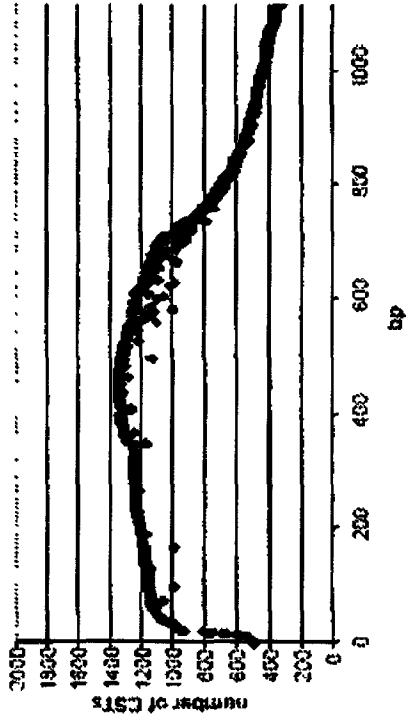


ATP5A1, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

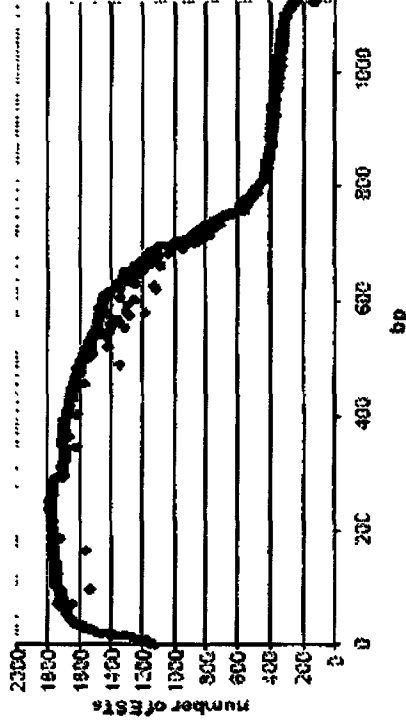


Şekil 4a (devamı)

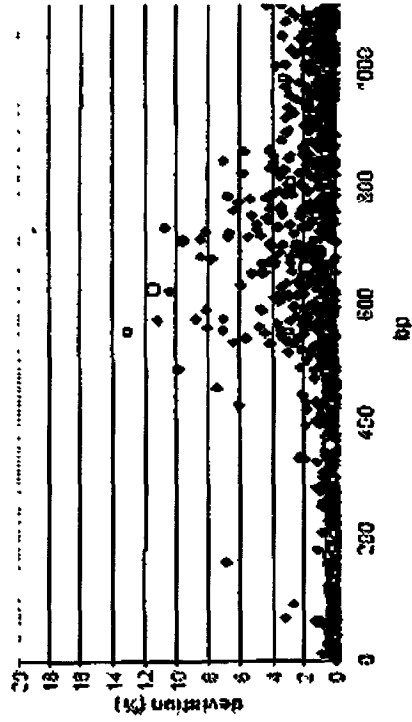
CALM2, kanserli EST'lerin sayısı



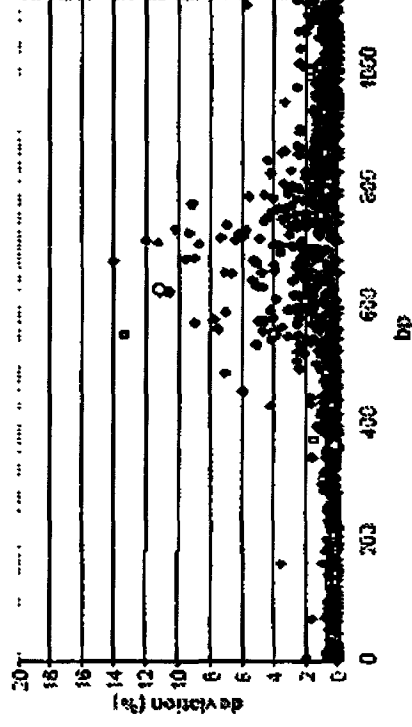
CALM2, normal EST'lerin sayısı



CALM2, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

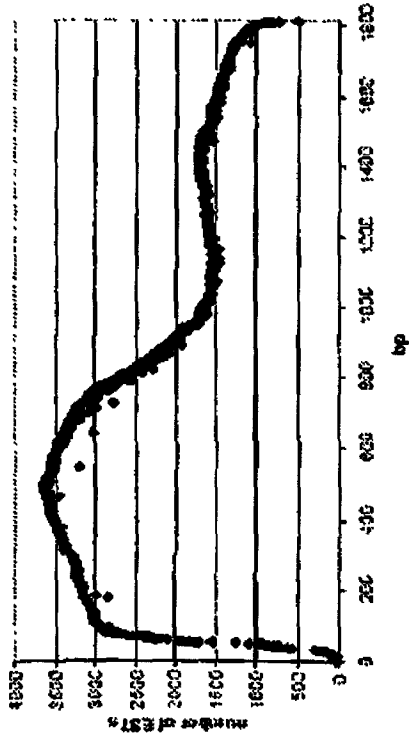


CALM2, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

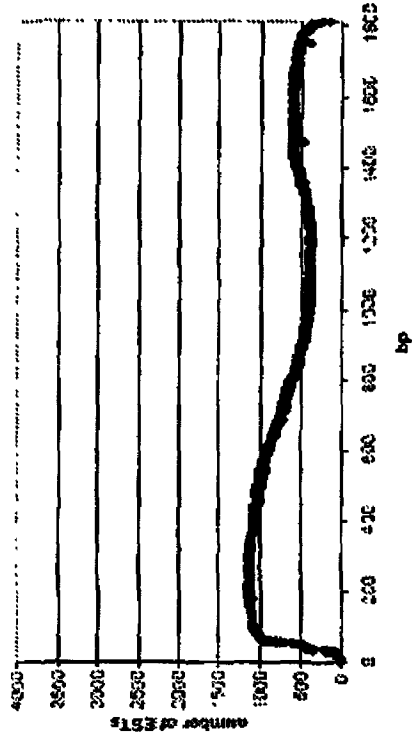


Şekil 4a (devamı)

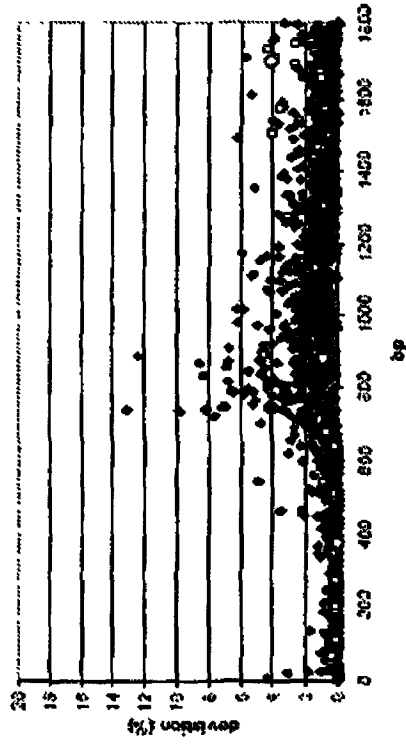
ENO1, kanserli EST'lerin sayısı



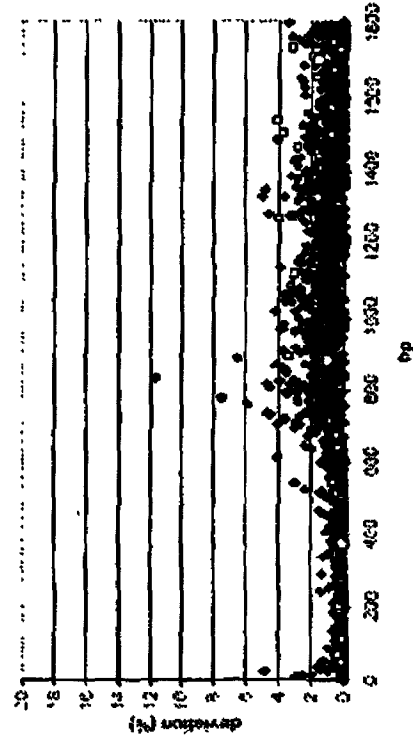
ENO1, normal EST'lerin sayısı



ENO1, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

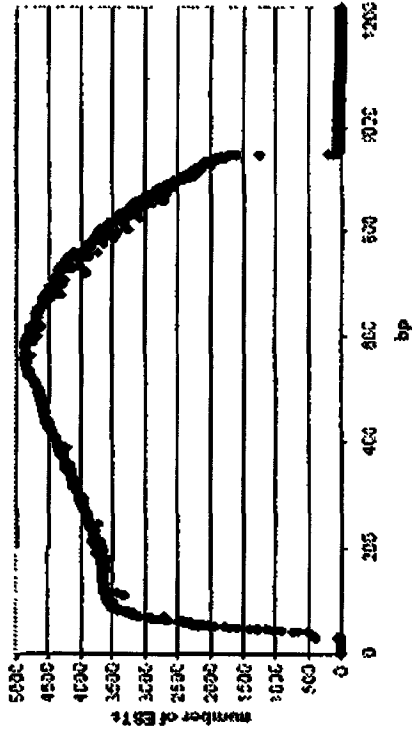


ENO1, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

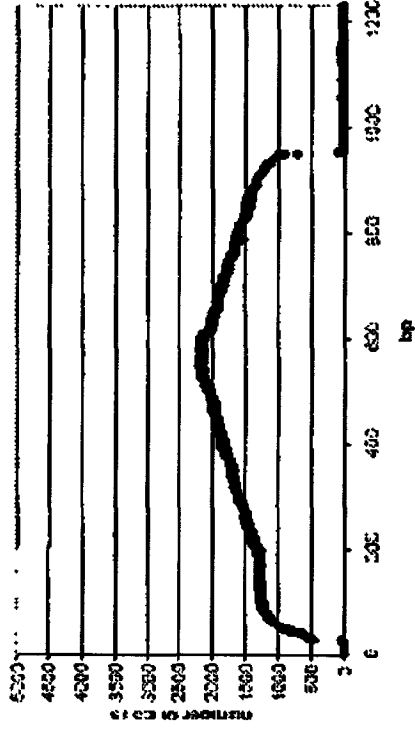


Şekil 4b

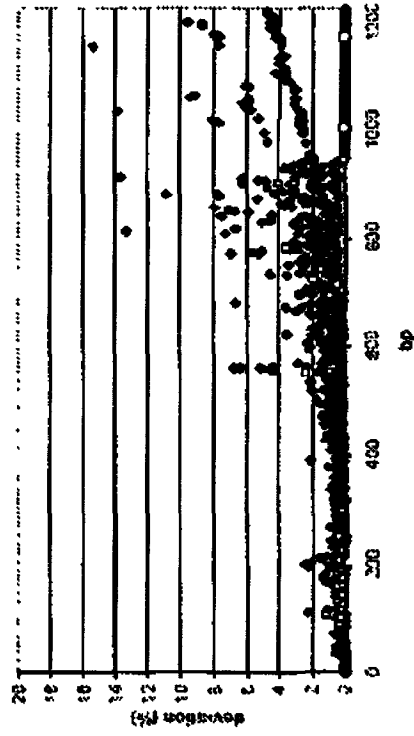
FTH1, kanserli EST'lerin sayısı



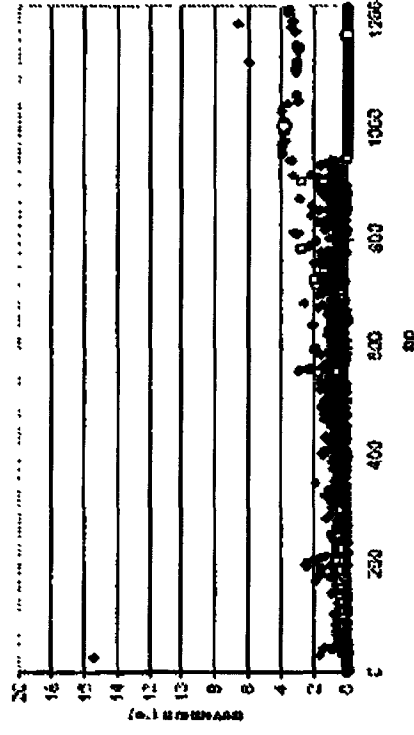
FTH1, normal EST'lerin sayısı



FTH1, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

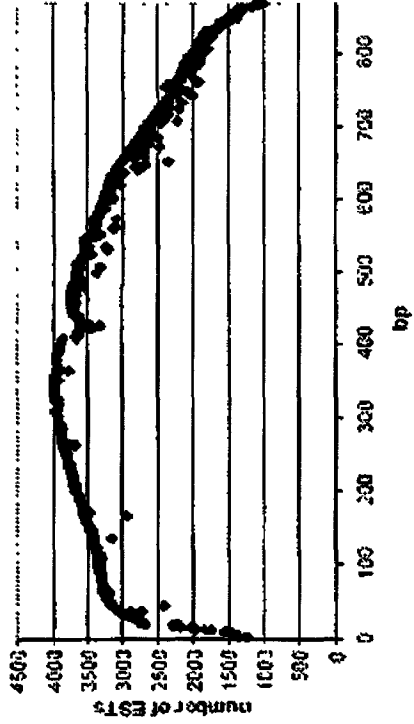


FTH1, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

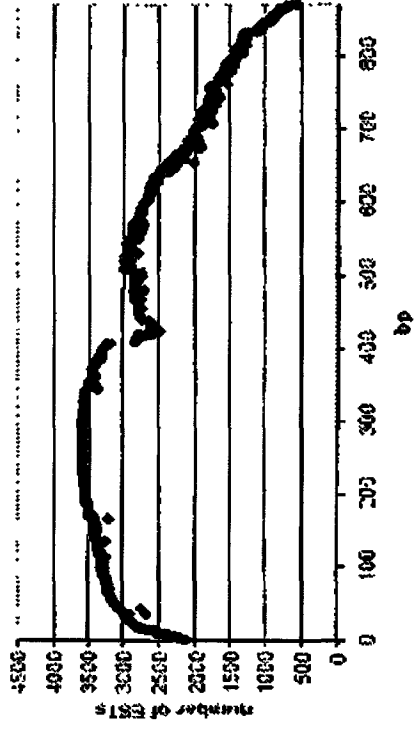


Şekil 4b (devamı)

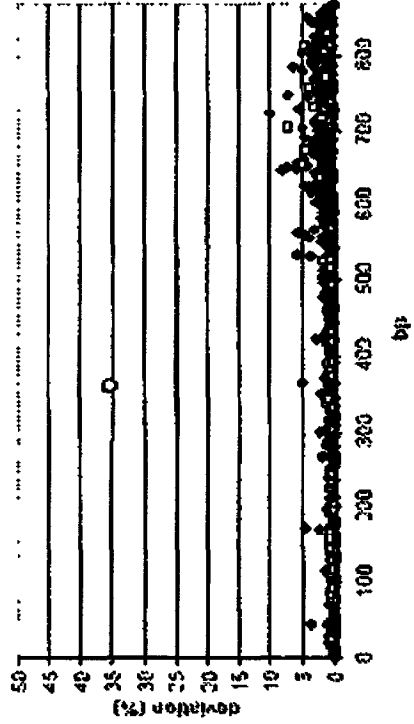
FTL Kanserli EST'lerin sayısı



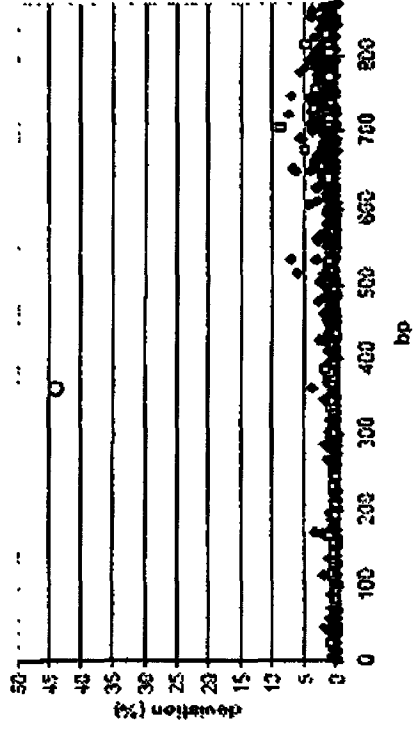
FTL Normal EST'lerin sayısı



FTL, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

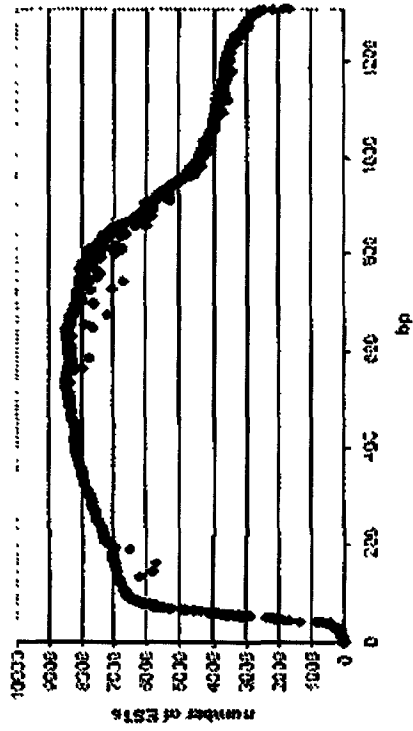


FTL, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

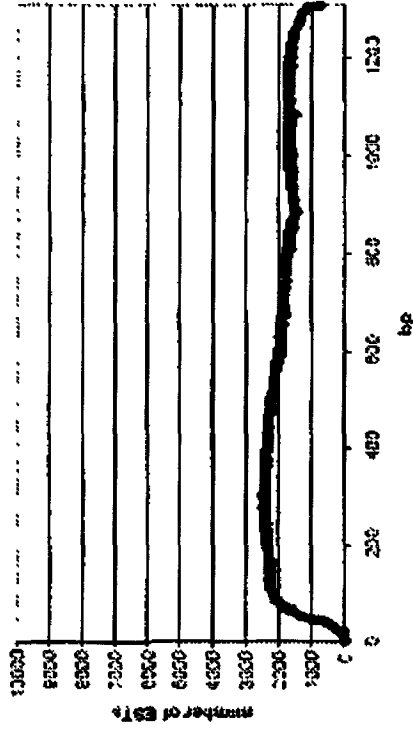


Şekil 4b (devamı)

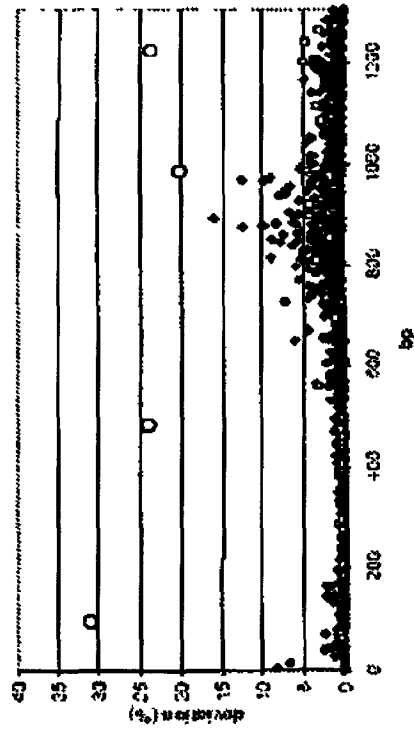
GAPDH, kanserli EST'lerin sayısı



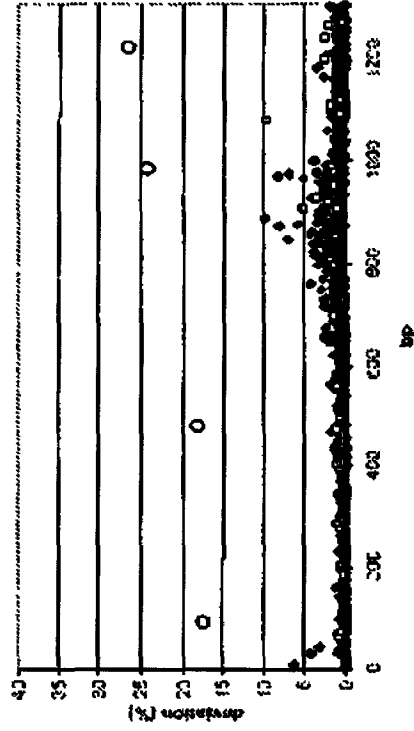
GAPDH, normal EST'lerin sayısı



GAPDH, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

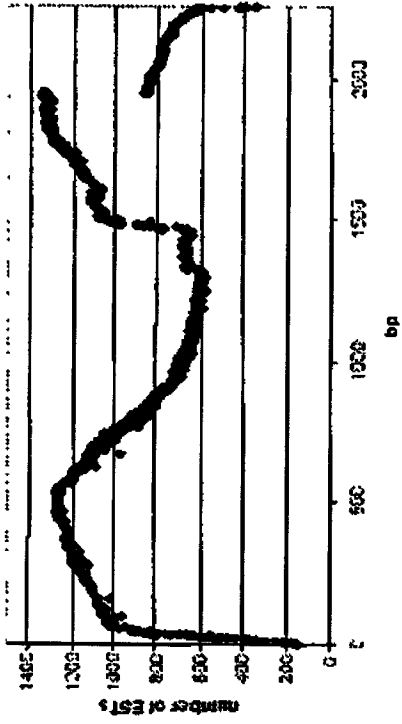


GAPDH RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

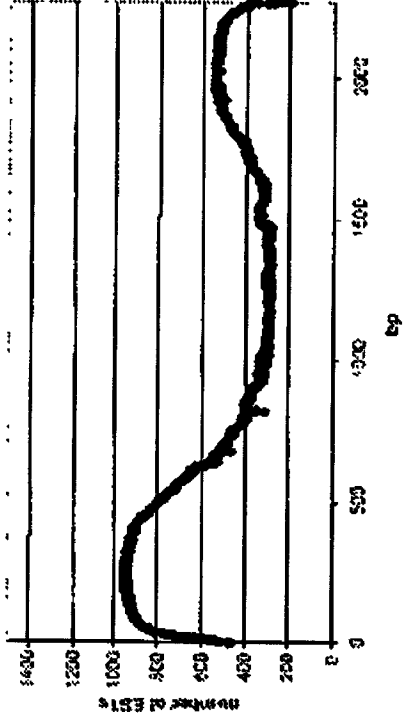


Şekil 4b (devamı)

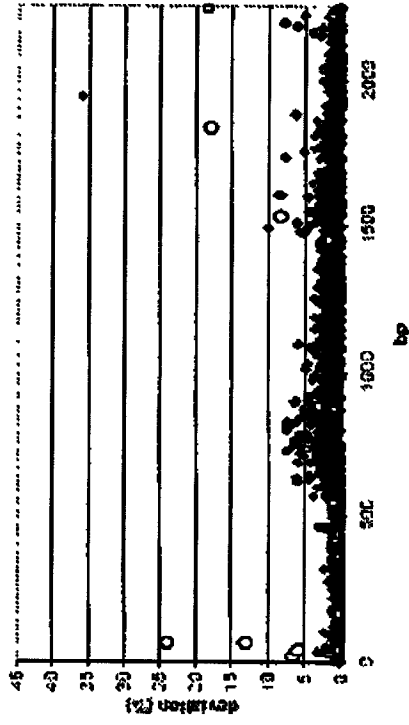
HSPA8. kanserli EST'lerin sayısı



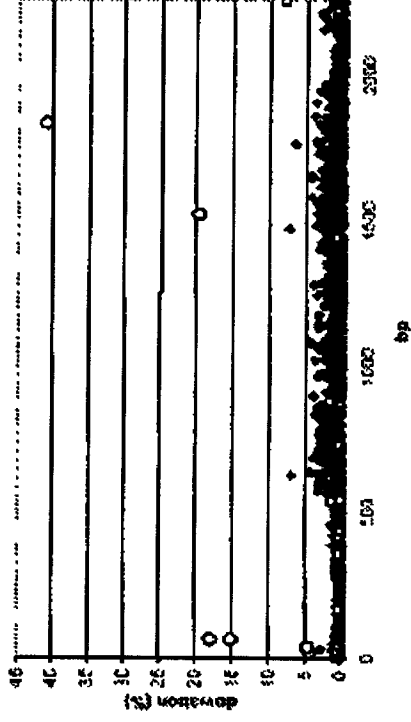
HSPA8. normal EST'lerin sayısı



HSPA8. RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

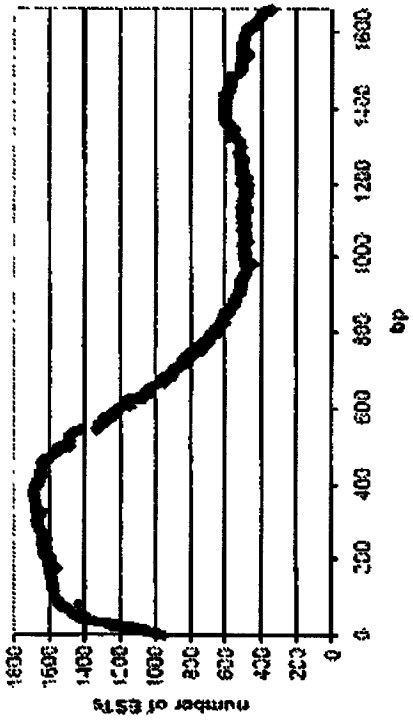


HSPA8. RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

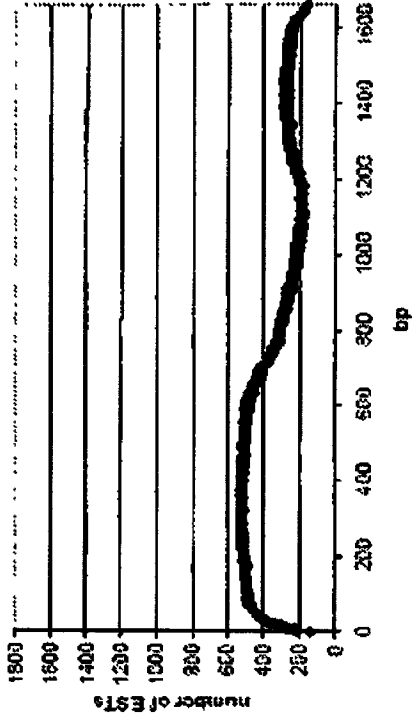


Şekil 4c

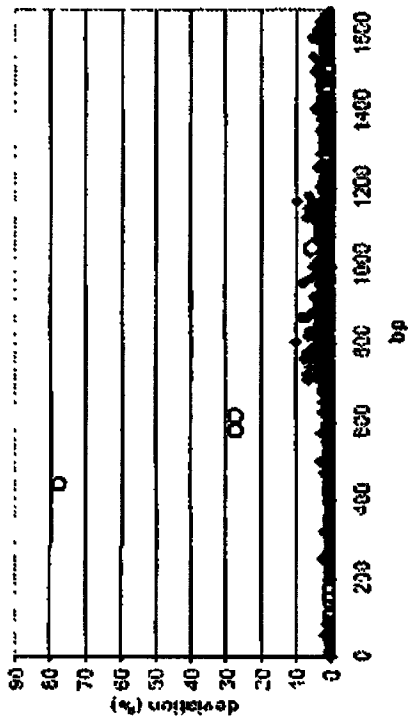
LDHA, kanserli EST'lerin sayısı



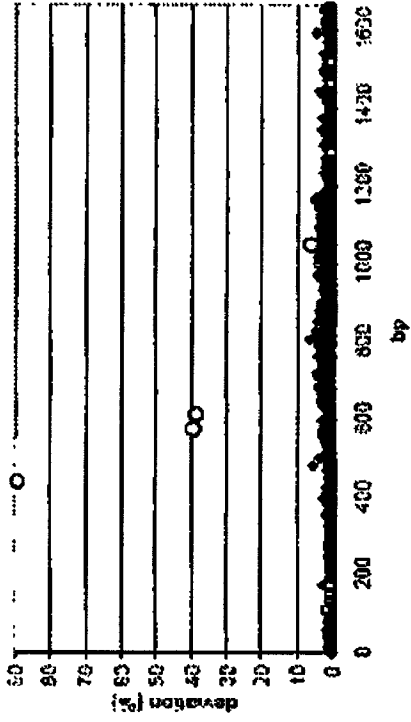
LDHA, normal EST'lerin sayısı



LDHA RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

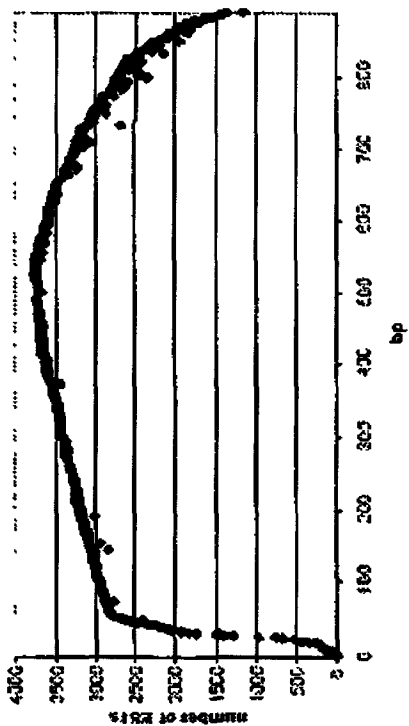


LDHA, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

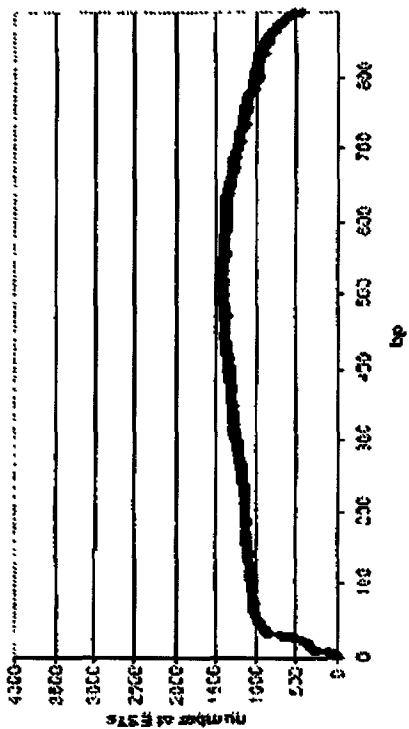


Şekil 4c (devamı)

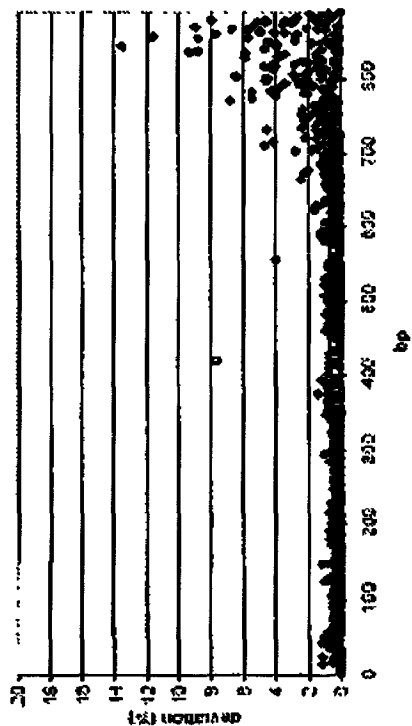
RPL7A kanserli EST'lerin sayısı



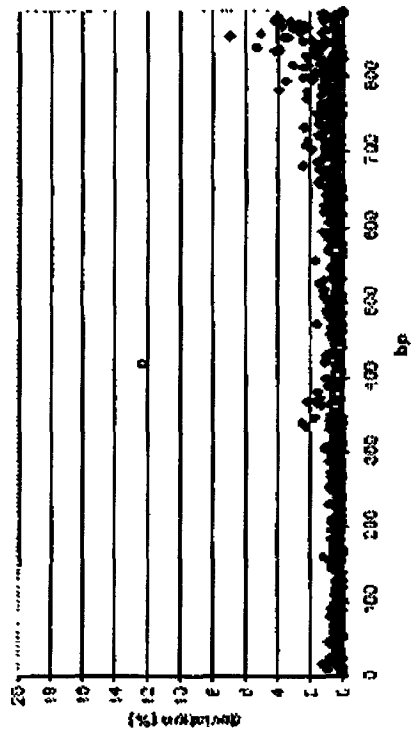
RPL7A, normal EST'lerin sayısı



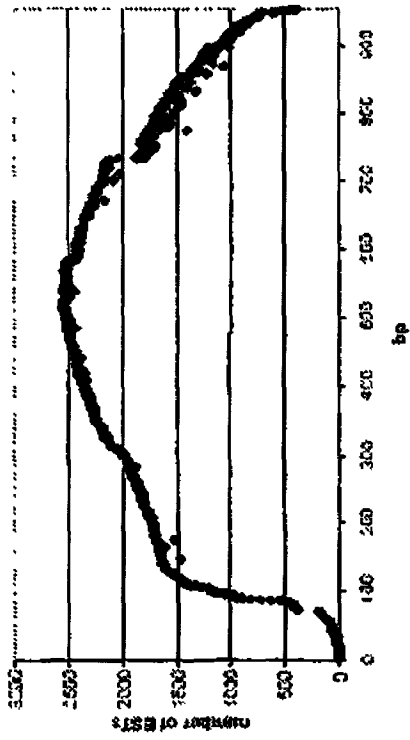
RPL7A, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler



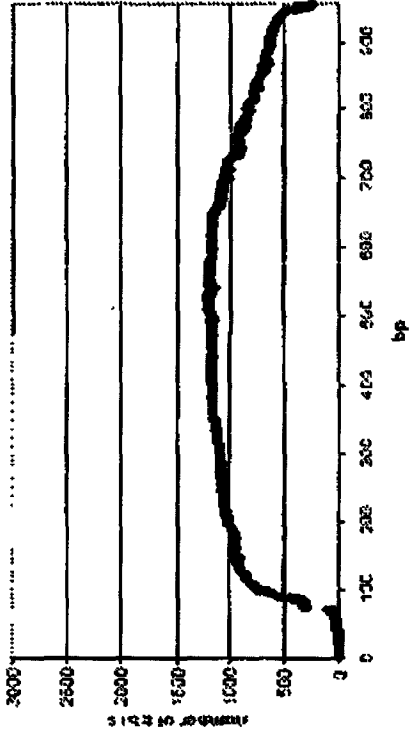
RPL7A, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler



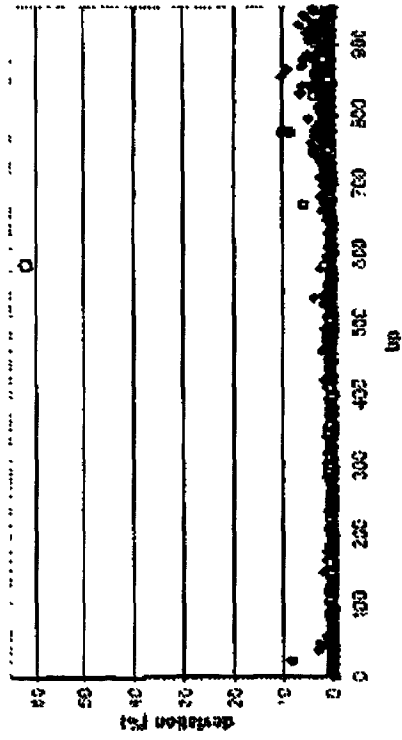
RPS4X, kanserli EST'lerin sayısı



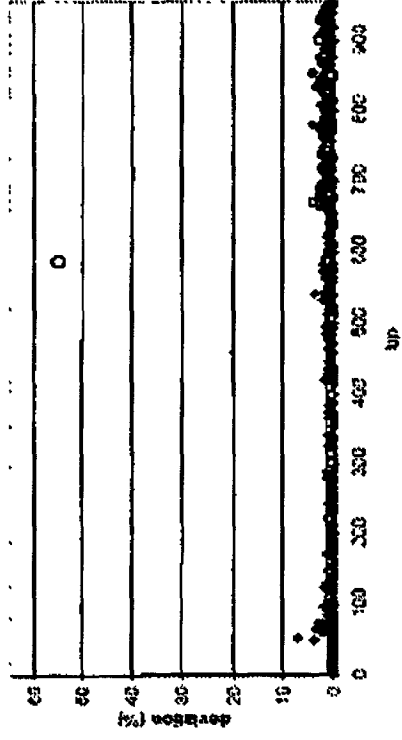
RPS4X, normal EST'lerin sayısı



RPS4X, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

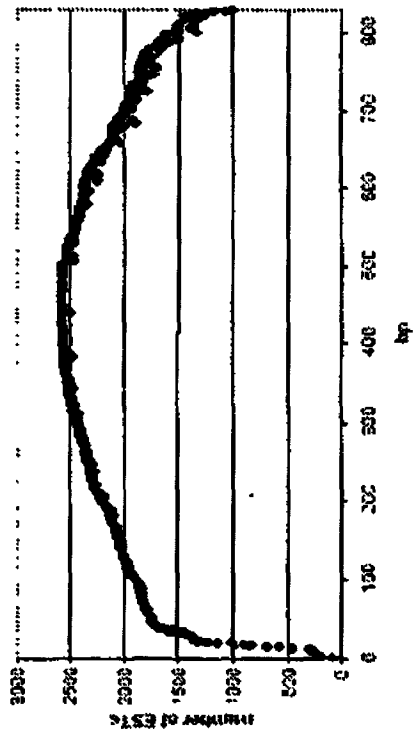


RPS4X RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

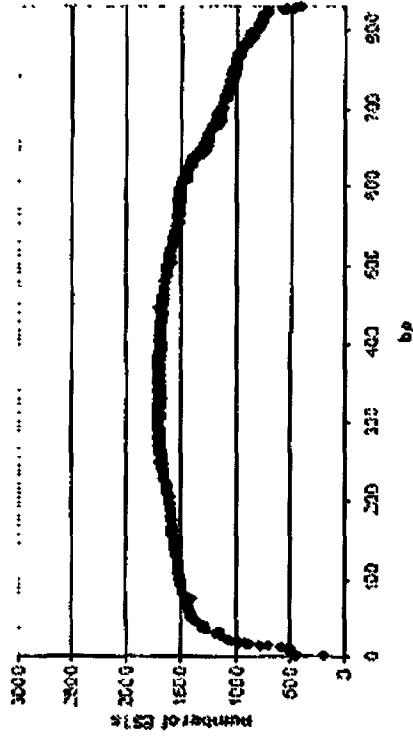


Şekil 4c (devamı)

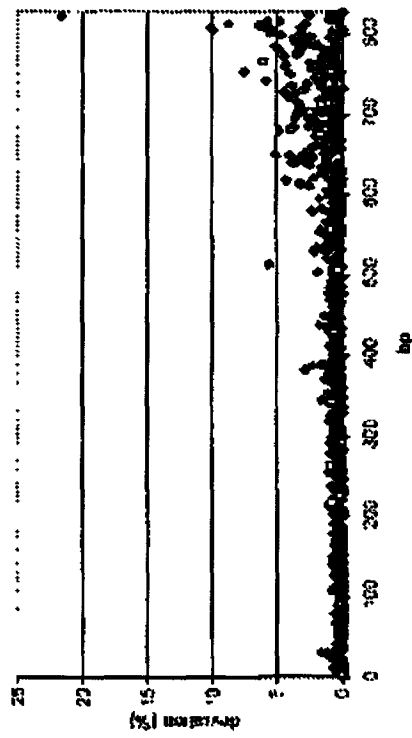
RPS6 kanserli EST'lerin sayısı



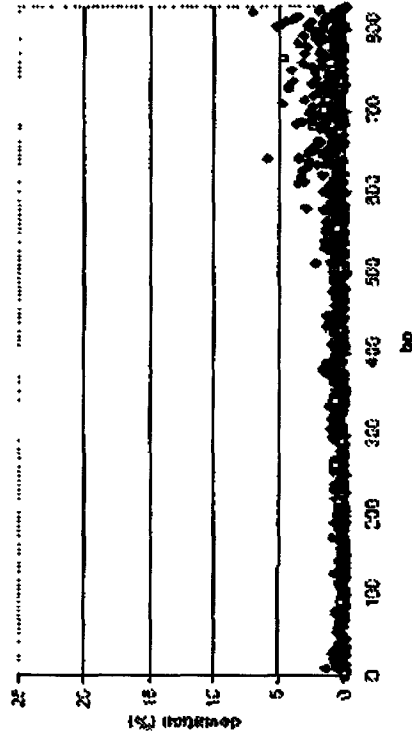
RPS6, normal EST'lerin sayısı



RPS6, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

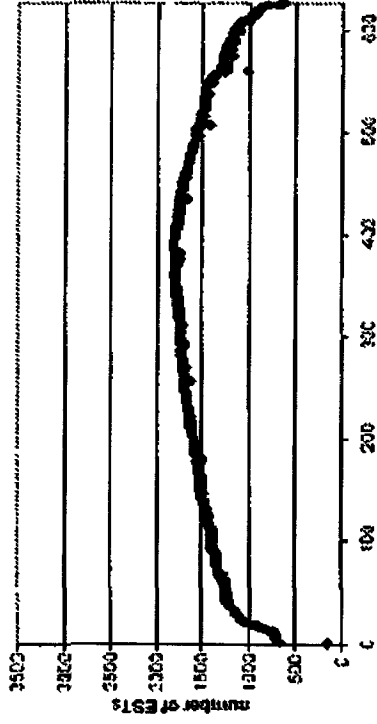


RPS6 RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

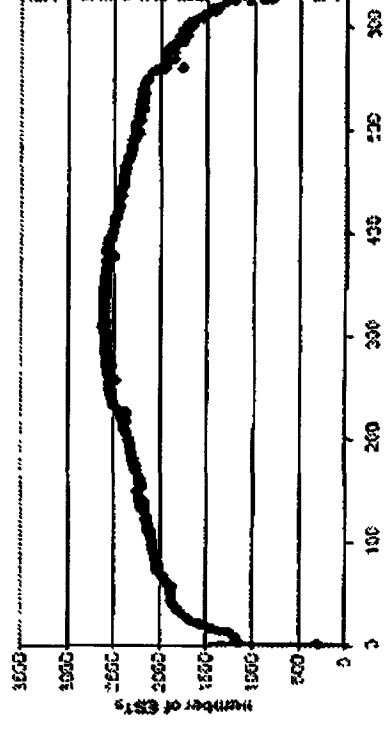


Sekil 4d

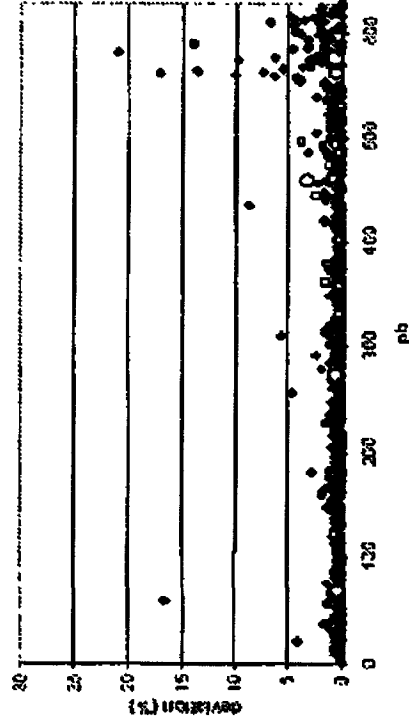
TMSB4X, kanserli EST'lerin sayısı



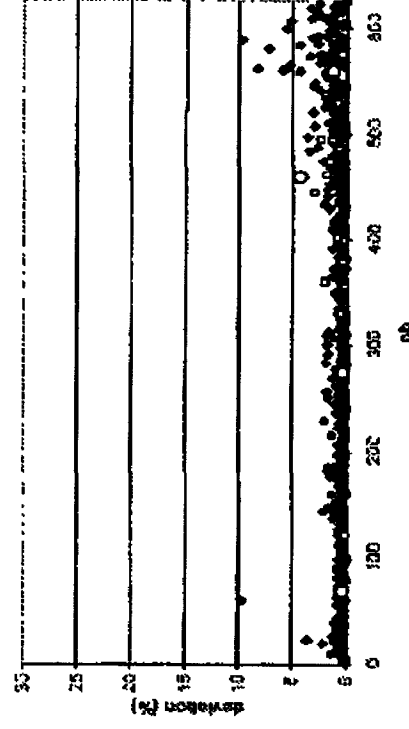
TMSB4X, normal EST'lerin sayısı



TMSB4X, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

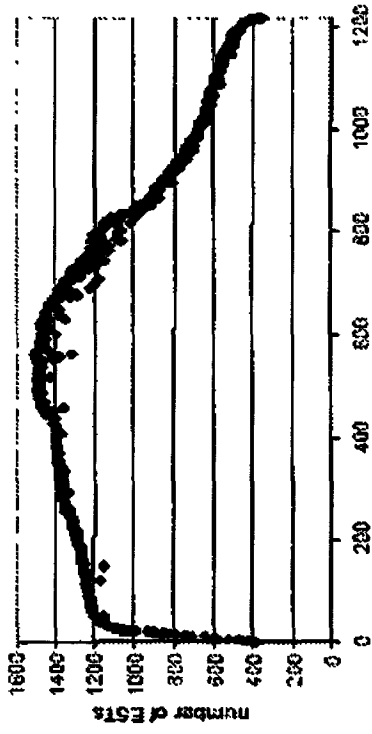


TMSB4X, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

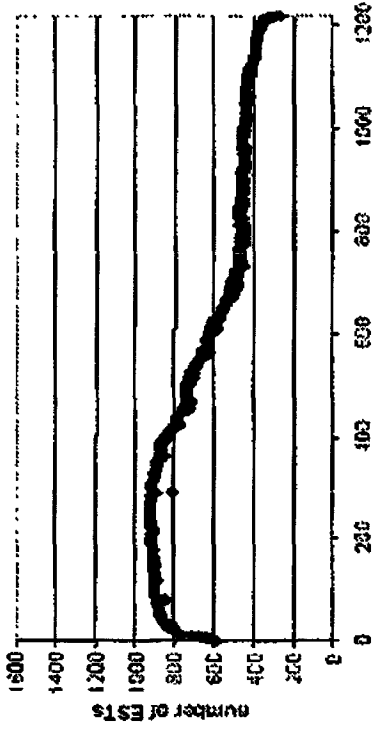


Şekil 4d (devamı)

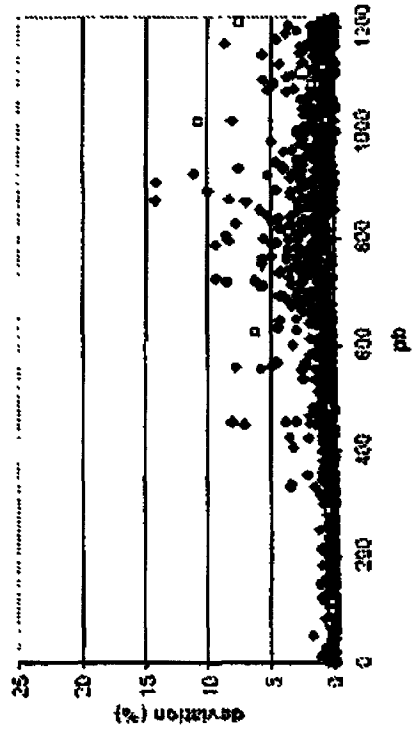
TPI1 kanserli EST'lerin sayısı



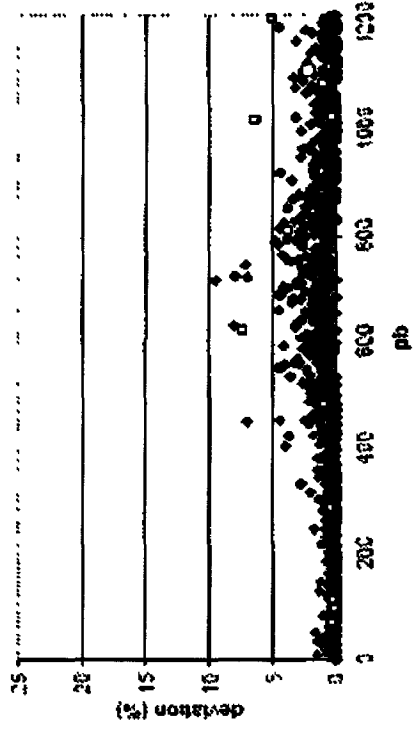
TPI1, normal EST'lerin sayısı



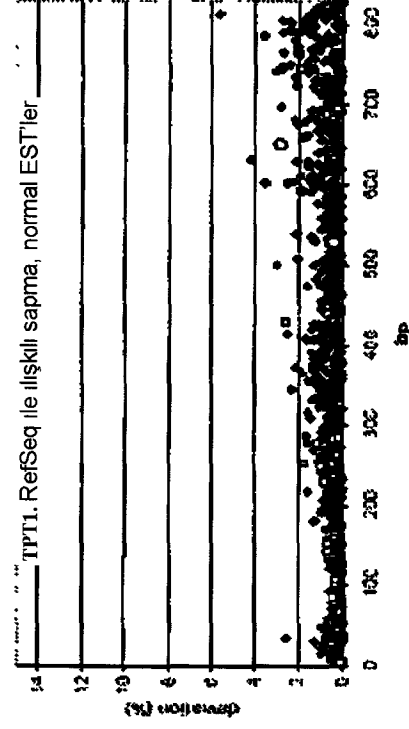
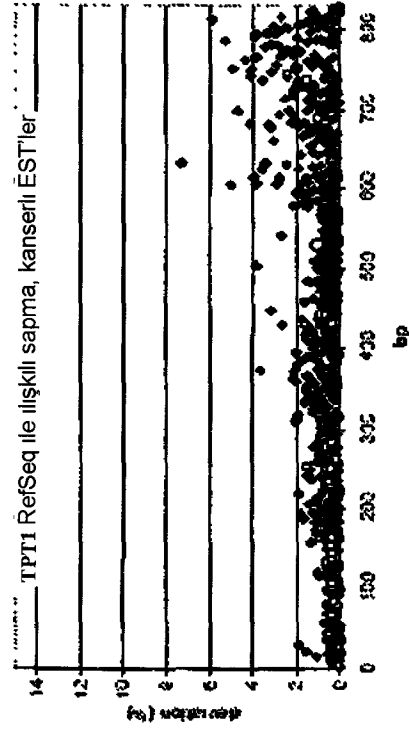
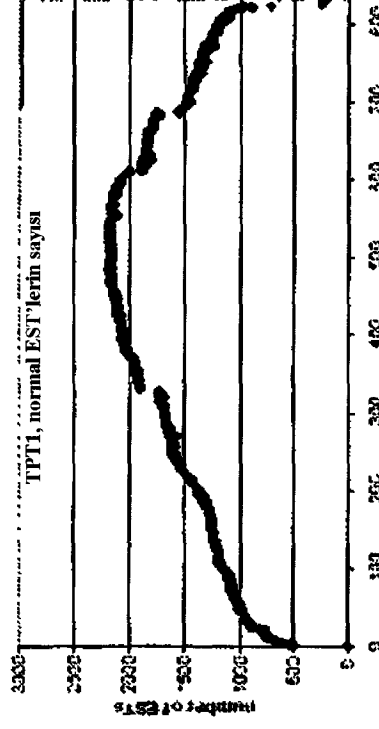
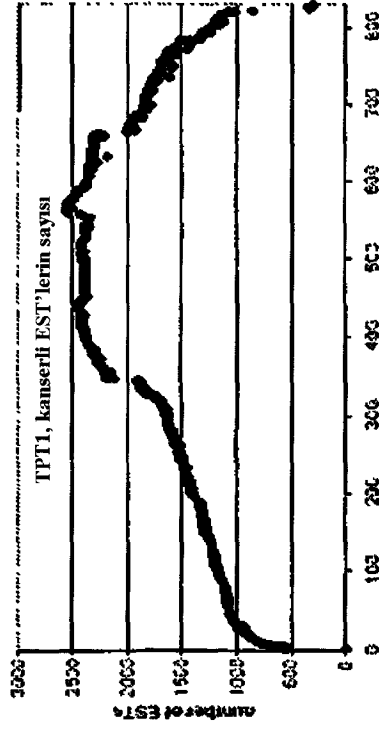
TPI1, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler



TPI1, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler

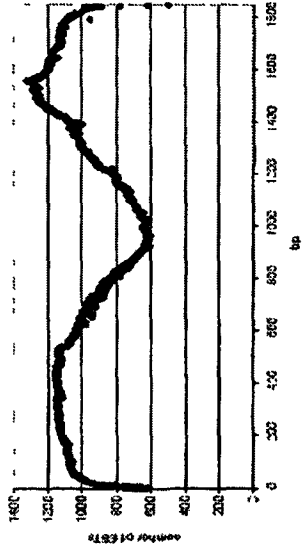


Şekil 4d (devamı)

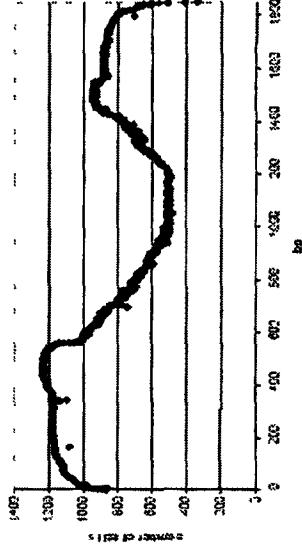


Şekil 4d (devamı)

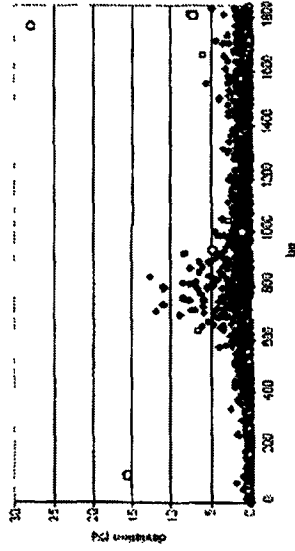
VIM, kanserli EST'lerin sayısı



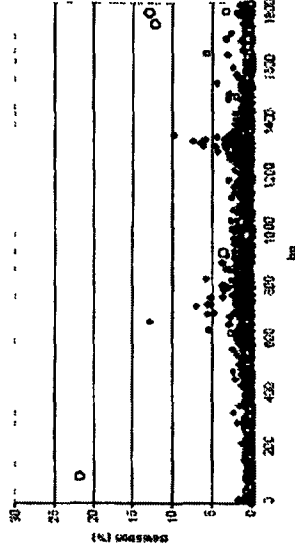
VIM, normal EST'lerin sayısı



VIM, RefSeq ile ilişkili sapma, kanserli EST'ler

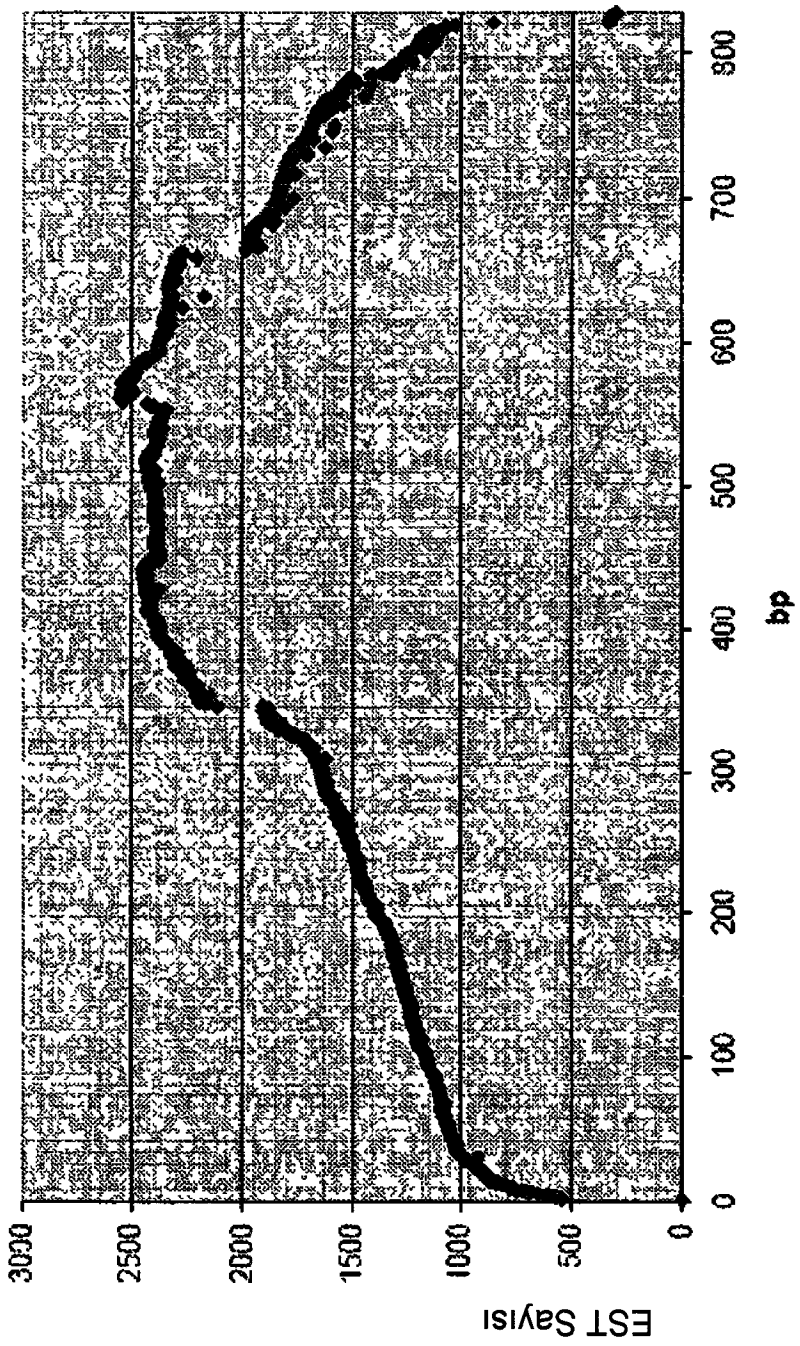


VIM, RefSeq ile ilişkili sapma, normal EST'ler



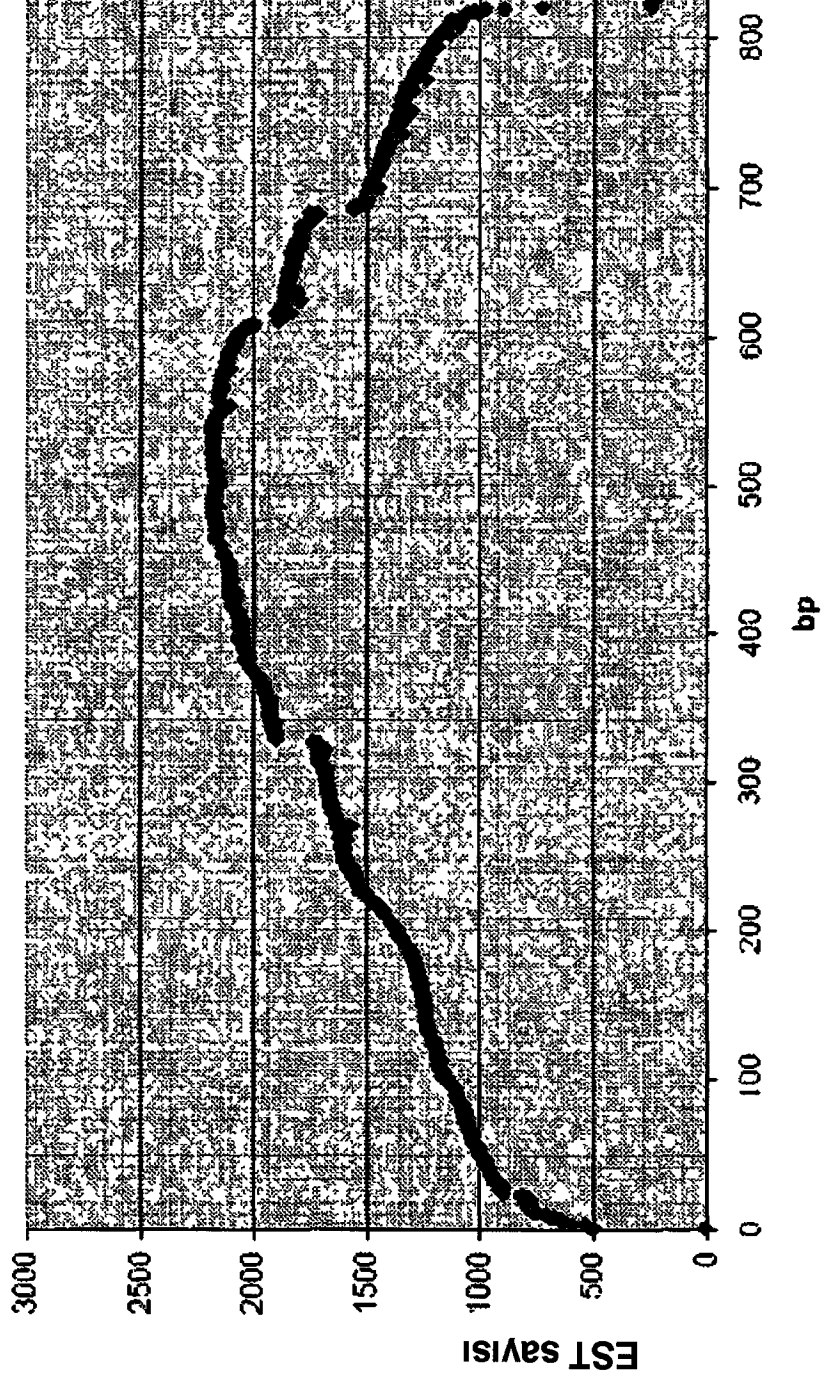
Şekil 4d devamı

TPT1 : Kanser grubundan verilen herhangi bir RefSeq pozisyonundaki EST sayısı



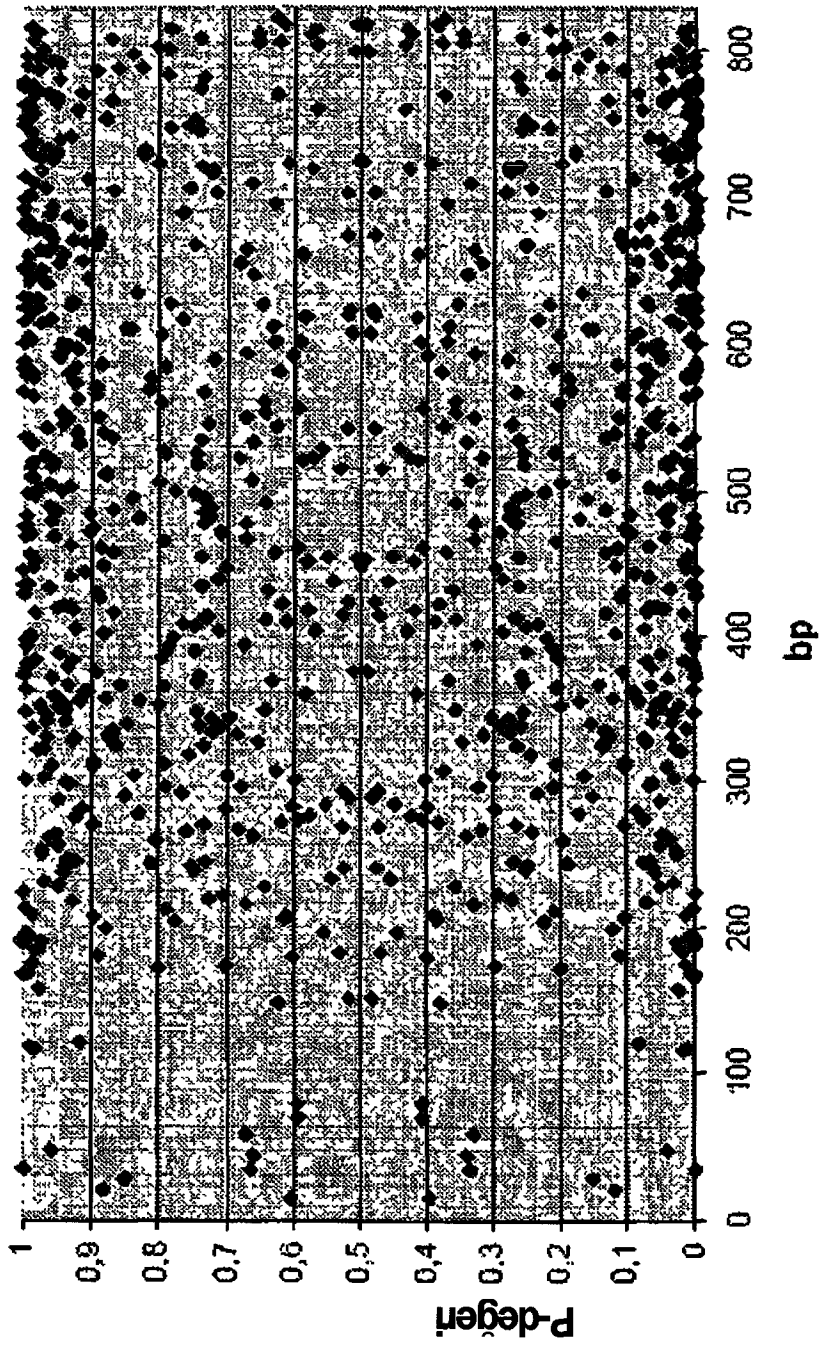
Şekil 5a

TPT1 : Normal grubundan verilen herhangi bir RefSeq pozisyonundaki EST sayısı



Şekil 5b

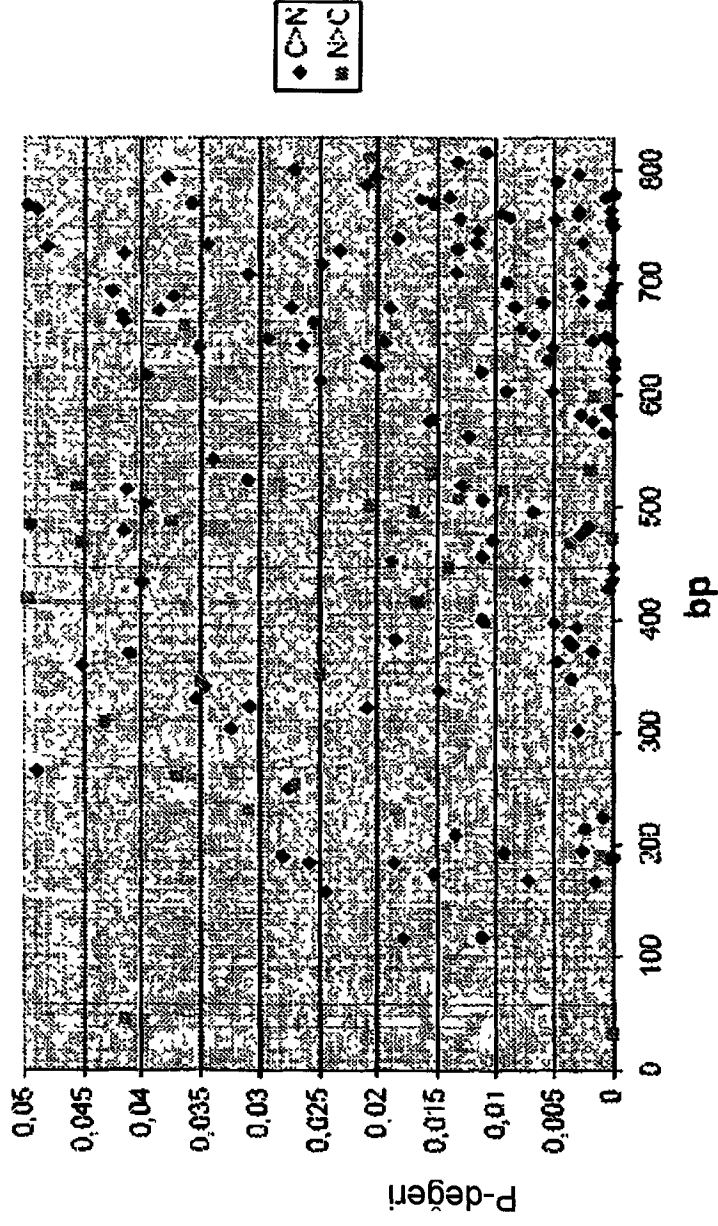
TPT1 : 830 pozisyonundan 489'unda gerçekleştirilen oran testleri



Şekil 5 c

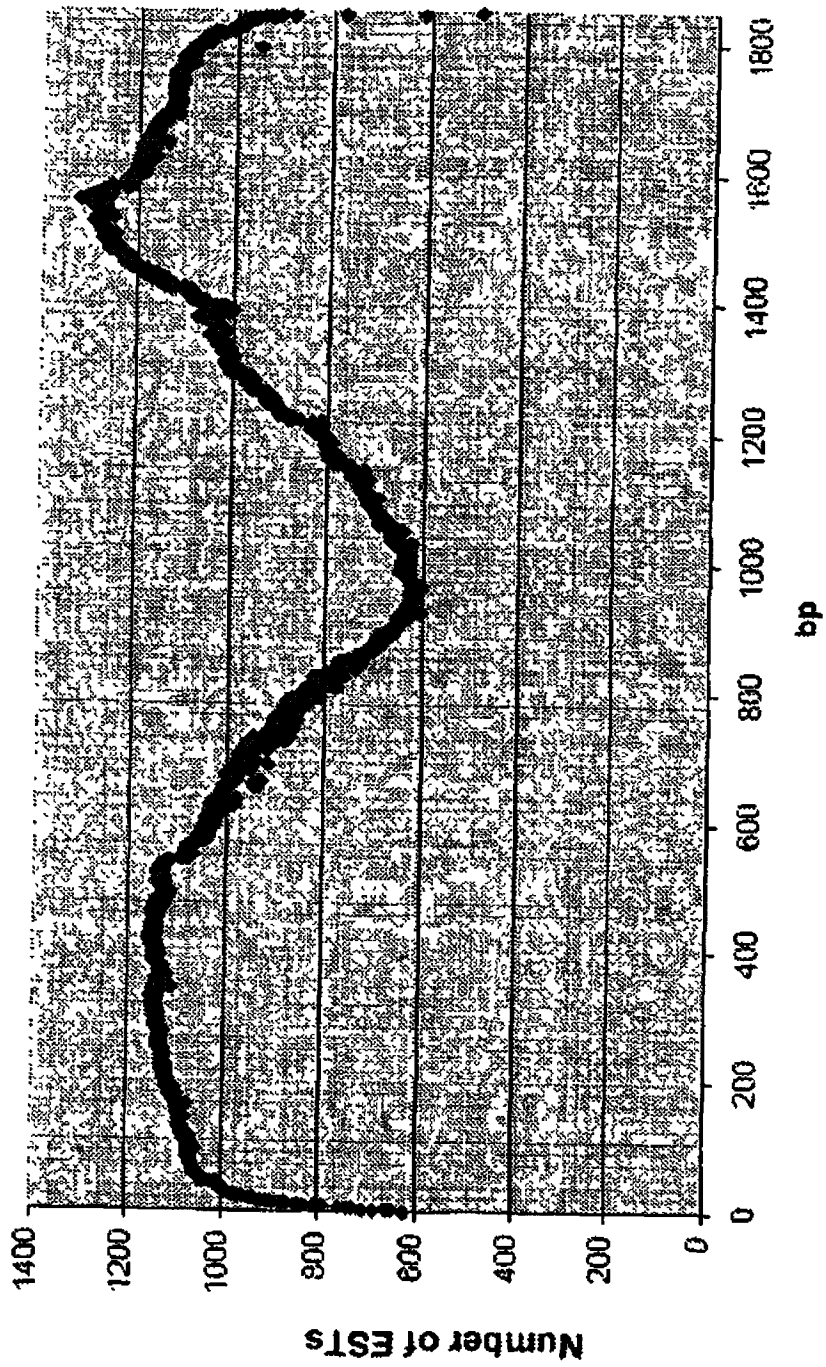
TPT1

- Kanserli dokudaki daha büyük sapmadan dolayı oran testi pozitif: C>N (n=145, LBE=15)
- Normal dokudaki daha büyük sapmadan dolayı oran testi pozitif: N>C (n=26, LBE=33)



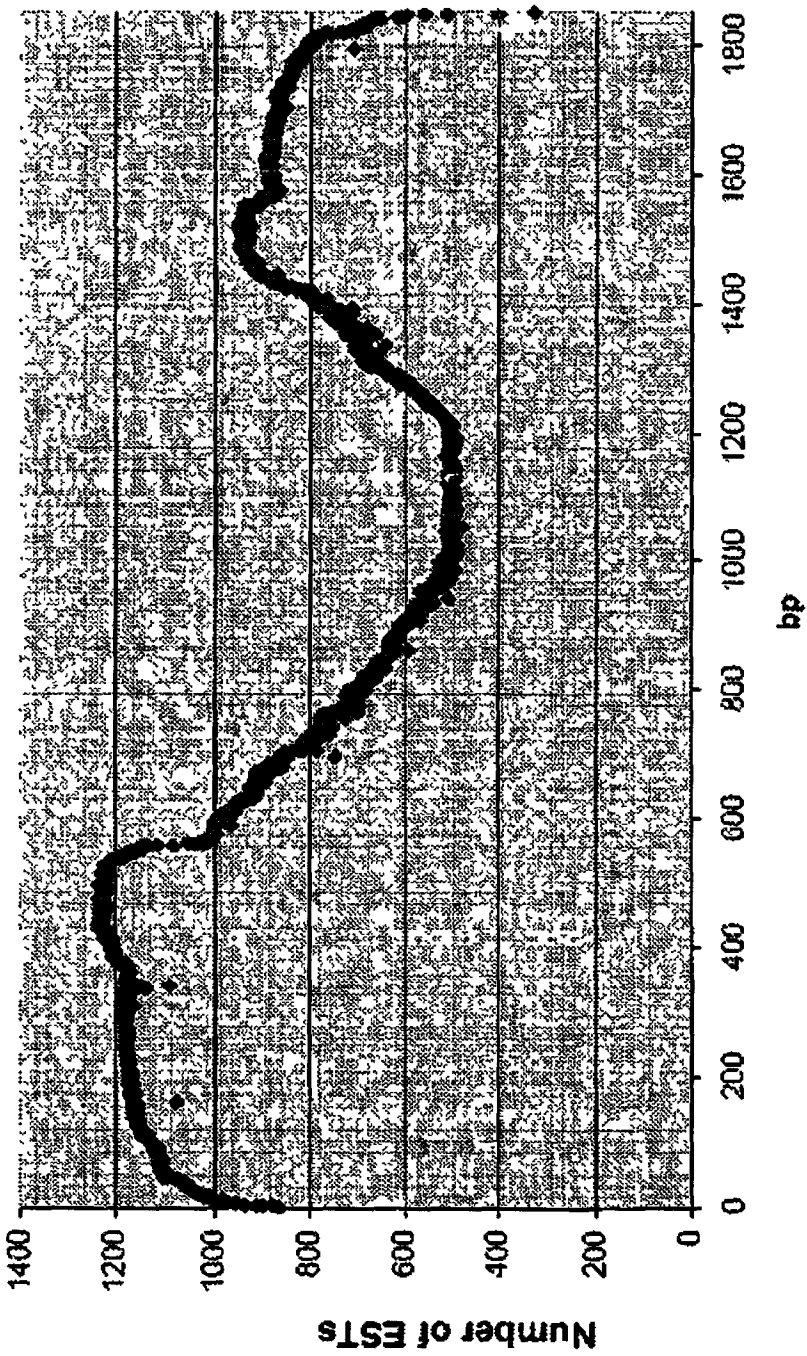
Şekil 5d

VIM : Kanser grubundan verilen herhangi bir RefSeq pozisyonundaki EST sayısı



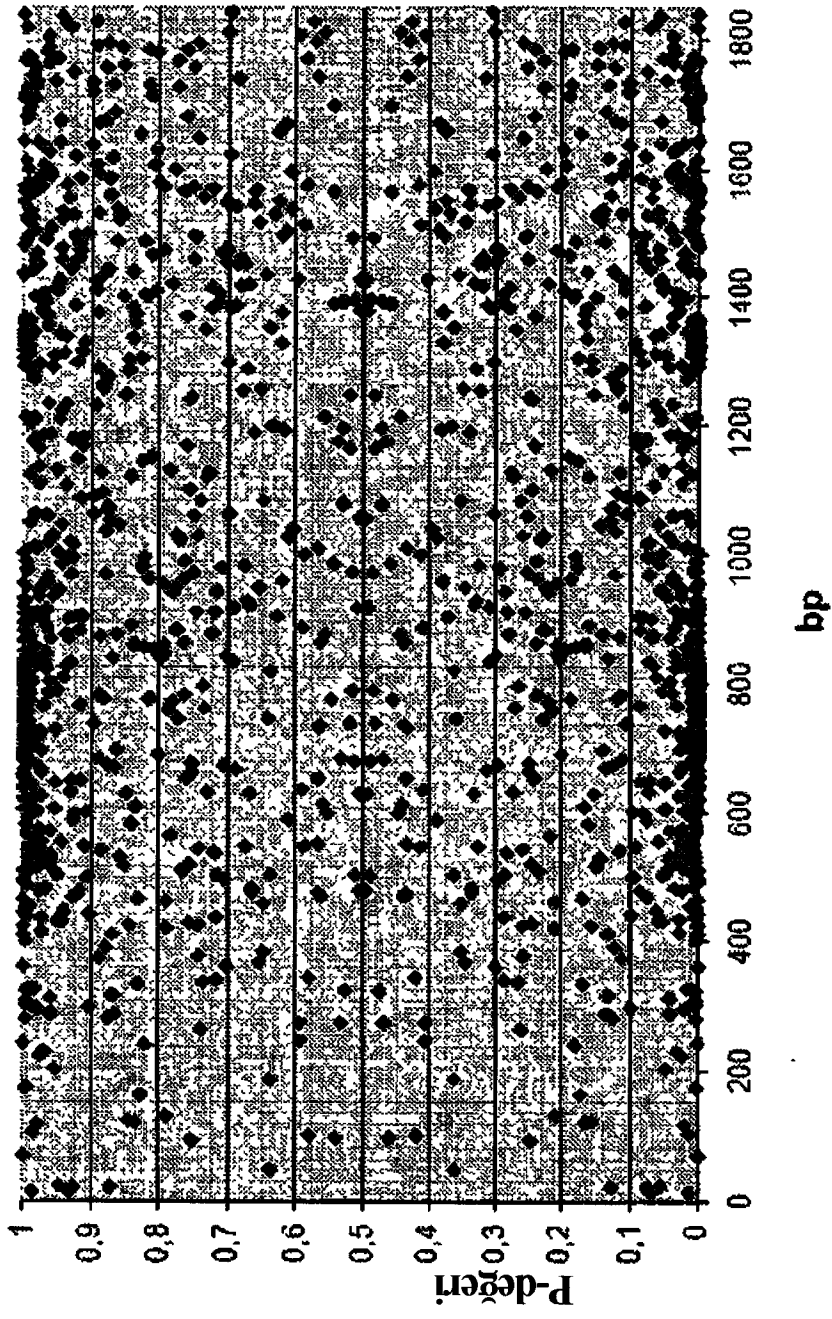
Şekil 5e

VIM : Normal grubundan verilen herhangi bir RefSeq pozisyonundaki EST sayısı



Şekil 5f

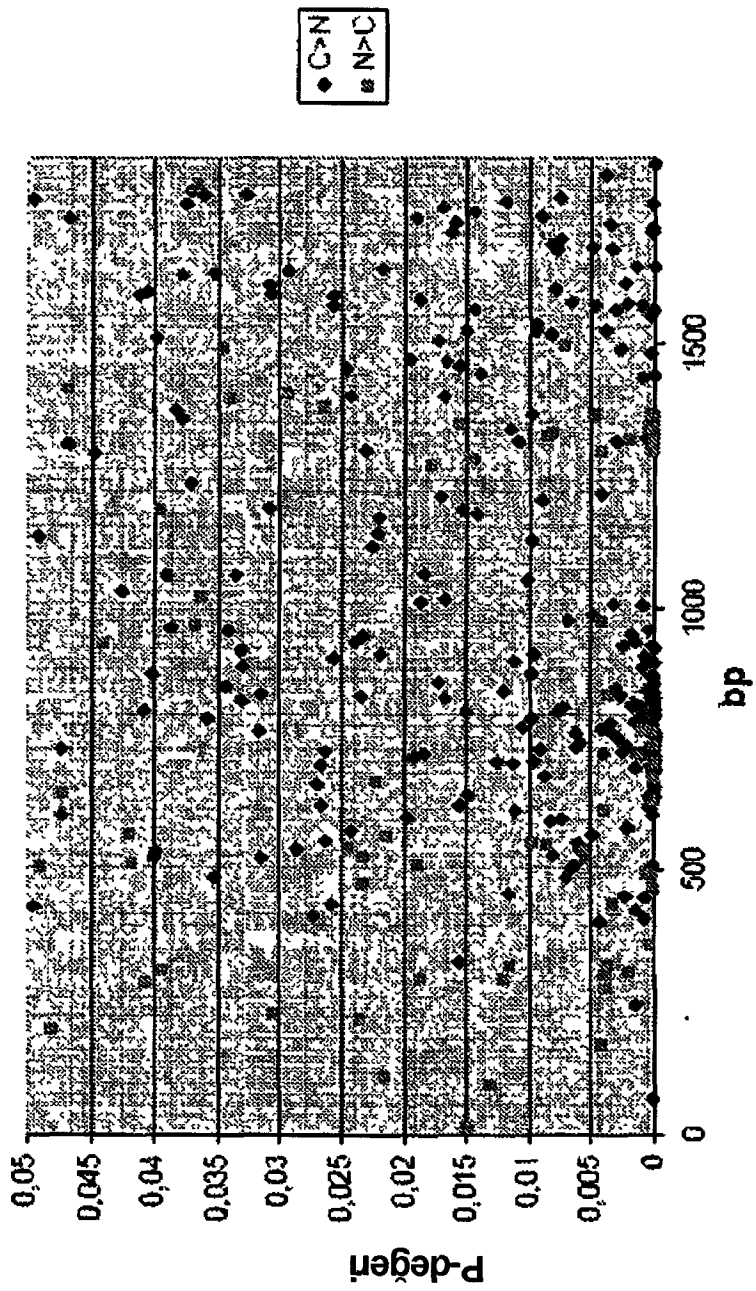
VIM : 1847 pozisyon dan 752' sinde gerçekleştirilen oran testleri



şekil 5g

VIM

- Kanserli dokudaki daha büyük sapmadan dolayı oran testi pozitif: C>N (n=269, LBE=24)
- Normal dokudaki daha büyük sapmadan dolayı oran testi pozitif: N>C (n=78, LBE=50)

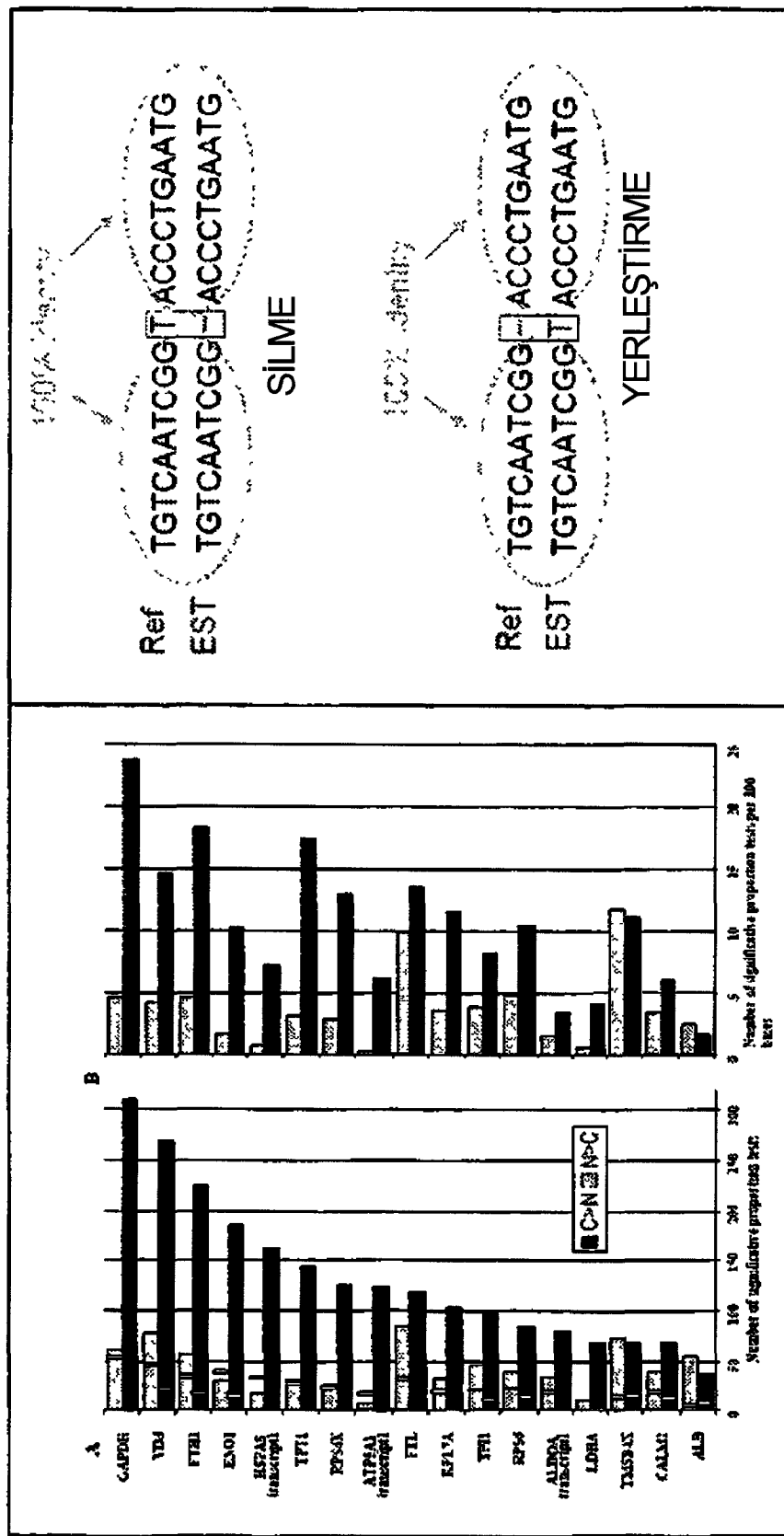


Şekil 5h

Oran testi analizi : sonuçlar

Gen	Oran testlerinin sayısı	Kapsama %	C>N	LBE	N>C	LBE
ALB	194	9	38	10	56	8
ALDOA transcript1	336	30	81	11	35	21
ATP5A1 transcript1	238	38	123	3	6	20
CALM2	374	23	69	16	40	21
ENO1	614	27	186	18	31	42
FTH1	592	71	226	20	67	38
FTL	678	56	118	31	86	36
GAPDH	812	91	311	23	61	57
HSPA8 transcript1	513	59	163	13	18	37
LDHA	181	9	70	4	10	13
RPL7A	337	35	103	11	33	22
RPS4X	371	45	124	11	27	25
RPS6	432	19	86	17	40	25
TMSB4X	352	19	70	18	74	17
TP11	379	31	99	14	47	23
TPT1	489	26	145	15	26	33
VIM	752	57	269	24	78	50

Şekil 5i



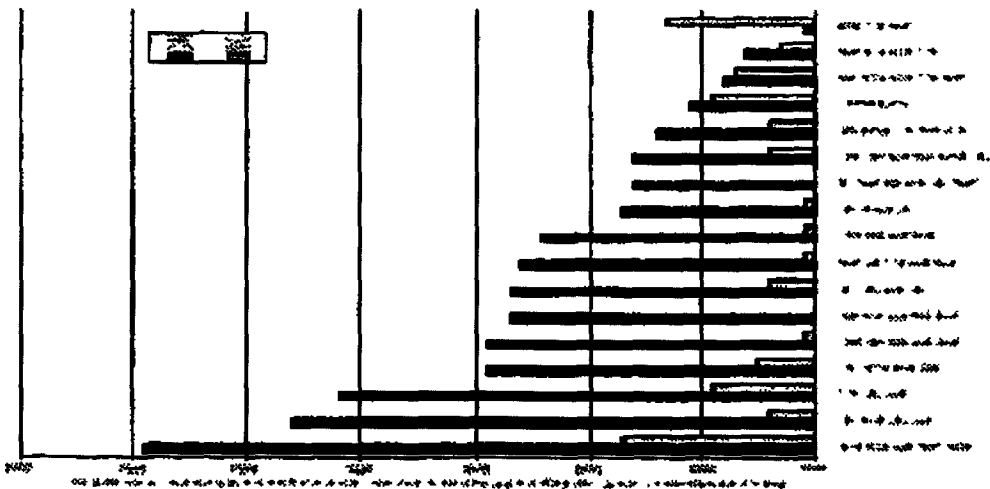
Şekil 5j

Oran testi analizleri : sonuçlar (silmeler ve yerleştirmeler)

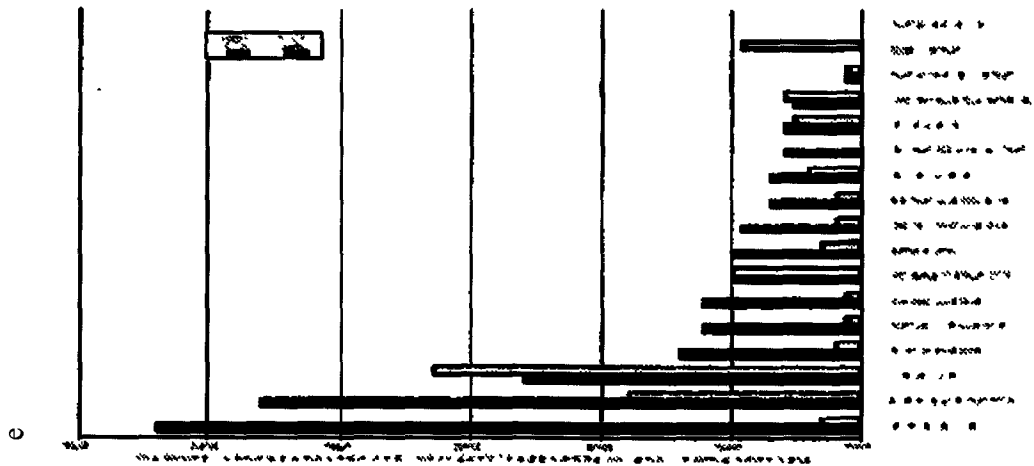
DELETIONS						INSERTIONS					
Genler	Oran testlerinin sayısı	C>N	LB E	N>C	LB E	C>N / N>C	Genler	Oran testlerinin sayısı	C>N	LB E	N>C
ALB	1	T	13	0	0	0 1	ALB	9	0	0	0 0
ALOOA	34	S	1	7	1	1 1	ALDOA	5	1	0	1 0
ATPSA1	2A	16	0	0	2		ATPSA1	3	5	0	0
CALM2	5G	14	2	4	2	3 5	CALM2	72	10	3	10 3
END1	41	29	11	5	3	5 3	EH01	40	4	0	2 3
FTH1	67	46	0	4	5	11,5	RH1	114	54	1	3 9
RL	100	42	2	9	7	4 7	FTL	188	26	9	33 9
GAPDH	99	55	2	17	7	3 5	GAPDH	137	46	4	18 9
HSPA8	3D	2	0	0	2		HSPA8	14	7	0	2 1
LDHA	14	6	0	3	0	2 0	Lb^A	1	0	0	0
RPL7A	45	26	0	3	3	26 0	RPL7A	56	12	1	3 12 0
RPS4X	35	29	6	1	3	25 0	RPS4X	29	9	1	1 4 5
RPS6	45	24	0	1	3	24 0	RPSS	44	12	3	3 12 0
TMSB4X	28	16	0	4	1	4 0	TMSB4X	22	5	8	a 0 8
TPI1	30	17	a	1	2	17 0	TPI1	26	5	1	5 1 1 2
TPT1	43	27	0	4	3	5 8	TPT1	41	7	1	4 2 1 8
VIM	26	11	1	9	1	1 2	VIM	27	10	3	1 3 3
Toplam		39	9	83	45	4 8	total	835	22	24	10 45 2 3

Şekil 5k

Silme



Yerleşim



Şekil 51

	Test Numbers						CME						LBE			
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F1	F2	F3	F4
ENO1	614	800	557	351	220	217	189	156	151	72	46	37	37	18	34	19
FTM1	592	508	632	385	335	283	279	276	232	182	142	37	25	19	19	19
GAPDH	812	752	745	534	440	372	367	365	232	182	142	37	25	19	19	19
HSP40	513	423	415	197	150	121	101	100	75	56	31	20	20	11	10	10
RPL7A	337	294	281	175	164	138	129	127	78	65	16	14	14	9	9	9
RP61X	371	340	338	183	170	161	122	135	84	76	21	12	12	10	10	10
RP38	433	357	357	230	225	171	164	165	32	32	31	25	25	17	16	16
TPT1	485	452	455	350	330	317	305	250	174	174	174	36	36	15	15	15
VIM	752	644	595	337	337	347	305	250	174	174	174	36	36	15	15	15
ALB	194	117	117	49	49	34	36	36	32	32	32	9	4	1	1	1
FTL	678	544	544	464	444	204	213	212	139	139	139	45	45	25	25	25
TMSB4X	352	302	302	163	163	144	124	124	80	80	80	30	19	8	8	8
ALDOA	328	297	297	174	174	118	102	102	61	61	61	21	12	10	10	10
ATP6A1	238	211	211	109	109	124	114	114	82	82	82	30	19	8	4	4
CALM2	374	295	335	245	245	160	163	163	92	92	92	26	23	16	16	16
LDHA	191	180	180	75	75	33	30	30	33	33	33	9	7	4	4	4
TPH	375	331	330	285	180	146	142	142	83	83	83	47	20	10	10	10
AT6MS	7646	6782	6701	4149	3759	3032	2787	2759	1914	1914	1914	448	231	230	230	230

F1: 2020X 817 signed letter
 F2: 2020X 817 signed letter
 F3: 2020X 817 signed letter
 F4: 2020X 817 signed letter
 F5: 2020X 817 signed letter
 F6: 2020X 817 signed letter

Şekil 6a

	CIN				LBE				NAC				LBE			
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
ENO1	160	137	155	84	22	19	17	9	7	31	31	17	42	39	33	21
FTM1	229	226	238	55	102	20	12	12	13	57	72	48	38	23	33	20
GAPDH	311	332	389	206	85	23	22	14	22	81	86	28	57	52	52	38
HSPA8	163	136	130	66	61	12	11	7	6	14	21	9	37	30	20	14
RPL7A	103	94	64	27	47	11	6	8	6	23	34	21	18	16	12	11
RPS3X	124	150	112	71	83	11	11	5	6	27	22	13	25	22	22	13
RP88	86	77	76	42	32	17	15	10	10	40	43	23	26	23	23	13
TPT1	145	130	137	72	73	15	16	9	8	26	26	14	33	30	20	20
VIM	240	230	232	146	145	24	21	16	8	76	76	43	50	43	42	26
ALB	38	24	24	10	10	13	6	5	3	56	41	42	23	4	4	1
FTL	116	121	121	77	67	31	26	26	23	86	92	61	30	34	24	20
TNFR2X	70	56	56	34	24	18	16	15	8	74	58	68	17	14	14	8
ALDOA	81	73	73	50	50	11	10	10	5	56	29	26	21	16	16	11
ATP5A1	123	111	111	83	23	9	2	2	1	6	3	0	20	15	15	8
CALM2	59	57	57	53	23	10	13	13	9	40	36	23	21	19	14	14
LDHA	73	51	50	31	31	4	3	3	1	10	6	3	12	12	12	5
TPH1	56	33	32	62	23	14	12	12	6	47	46	21	24	20	13	3
All genes	2055	2055	2065	1300	593	260	233	227	132	140	723	634	459	426	426	238

(C-INP-C)

F1	F2	F3	F4	F5
3.15	2.86	2.98	3.48	2.85

Şekil 6b

	C>N-LBE				N-C-LBE			
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
ENO1	109	120	145	80	46	0	0	0
FTN1	200	166	167	140	87	19	30	22
GAPDH	268	250	277	192	43	4	13	0
HSP90	160	127	128	61	64	0	0	0
RPL7A	92	85	86	51	42	11	10	10
RPS6X	113	99	102	60	64	2	0	0
RP36	06	02	01	32	22	15	20	13
TP11	130	121	129	89	69	0	0	0
YHM	245	209	219	140	140	23	32	1
ALB	22	16	16	7	2	40	41	22
FTL	87	92	82	30	34	60	69	32
TMSB4X	92	41	41	28	28	67	64	24
ALDOA	70	83	83	45	45	14	10	0
ATP5A1	120	100	100	82	23	0	0	0
CALN2	53	54	54	44	44	10	17	15
LDHA	86	58	67	30	30	0	0	0
TPH1	56	81	81	66	17	24	20	8
All genes	2022	1835	1942	1100	793	291	324	147

(C>N-LBE)/(N-C-LBE)

F1	F2	F3	F4	F5
6.95	5.59	4.06	7.95	3.1

Şekil 6c-1

C>N	LBE	N-C	LBE	(C>N)/(N-C)	(C>N-LBE)/(N-C-LBE)
F1	2281	259	725	488	6.95
F2	2065	230	722	429	5.59
F3	2065	223	694	428	6.08
F4	1300	132	374	266	7.95
F5	933	140	456	219	3.03

Şekil 6c-2

	Test Numbers		C49		LBE		C-N		LBE		N-C		LBE		C-N		LBE		C-N		LBE	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2	F1	F2
ENO1	614	74	217	28	49	4	126	18	18	3	31	12	42	3	189	33	0	0	0	0	0	0
FTM1	492	268	263	76	23	19	226	54	20	10	87	22	39	13	225	44	14	6	0	0	0	0
GNPDH	812	393	372	119	42	20	311	70	23	14	81	43	67	9	289	52	4	24	0	0	0	0
HSP40	512	68	181	44	32	5	163	37	13	2	19	7	37	0	190	22	0	0	0	0	0	0
RPL7A	237	51	138	21	70	3	100	18	11	1	32	5	22	3	92	56	11	2	0	0	0	0
RPS3A	371	104	451	26	21	9	128	28	11	3	27	2	25	6	113	21	2	0	0	0	0	0
RPS6	432	140	126	32	31	12	80	21	17	6	40	6	25	8	89	19	15	0	0	0	0	0
TPST1	492	302	171	26	31	21	145	63	15	12	29	27	33	9	130	51	3	0	0	0	0	0
VIM	752	118	347	22	28	7	268	31	24	3	78	4	59	8	245	28	23	0	0	0	0	0
ALB	124	45	64	37	8	1	36	39	10	2	55	13	3	2	28	17	43	16	0	0	0	0
FTL	678	354	204	102	49	27	116	23	21	21	69	79	39	14	87	2	59	52	0	0	0	0
TMSB4X	352	177	144	32	29	11	70	18	19	10	74	45	17	7	52	8	87	98	0	0	0	0
ALDOA	338	80	115	28	22	2	41	23	11	1	35	5	21	3	76	22	14	2	0	0	0	0
ATP5A1	238	6	132	4	8	0	123	4	3	0	6	0	20	0	129	4	3	0	0	0	0	0
CALM2	374	38	109	16	29	3	66	11	18	2	40	5	21	3	53	6	19	2	0	0	0	0
LDHA	181	8	83	7	8	0	70	6	4	0	19	2	13	0	88	6	0	0	0	0	0	0
TPH1	375	28	146	16	20	4	84	11	14	2	47	5	23	3	95	9	24	5	0	0	0	0
All genes	7844	2263	3639	747	422	140	2231	438	253	92	174	139	423	110	2823	312	30	108	0	0	0	0

(C-N)/N-C

F1	F2
3.15	1.56

(C-N)/LBE/N-C/LBE

F1	F2
6.98	2.15

Şekil 6d

	Test Numbers		CAN		LBE		CAN	LBE		N-C		LBE		CAN	LBE		CAN	LBE		CAN	LBE	
	F1	F2	F1	F2	F1	F2		F1	F2	F1	F2	F1	F2		F1	F2		F1	F2		F1	F2
ENO1	614	127	217	52	40	14	186	43	18	8	31	12	42	11	188	34	0	0	1	188	34	0
FTH1	562	312	283	121	30	18	226	111	29	5	57	10	39	22	236	103	12	0	0	236	103	12
GAPDH	612	552	372	287	42	40	310	283	23	18	61	24	57	59	288	245	4	0	0	288	245	4
HSPAB	213	135	131	52	32	5	192	53	13	4	18	5	37	6	150	46	0	0	0	150	46	0
RPL7A	337	112	136	36	12	7	103	35	11	3	33	3	22	7	92	33	11	0	0	92	33	11
RP34X	271	152	151	56	21	12	124	49	11	5	27	10	25	12	113	41	2	0	0	113	41	2
RP86	432	195	128	62	31	10	66	65	17	7	42	27	25	11	92	59	15	16	16	92	59	15
TPT1	489	344	171	149	31	18	146	103	15	12	28	40	33	22	130	66	0	16	16	130	66	0
VDR	782	475	347	36	38	5	296	56	24	8	75	29	60	19	245	53	29	16	16	245	53	29
ALB	164	59	54	50	5	2	38	29	10	4	24	31	8	4	23	22	45	27	27	23	22	45
FTL	679	326	204	150	49	16	118	54	21	21	86	116	18	12	97	32	20	102	102	97	32	20
TMSB4X	352	109	144	36	20	3	20	14	16	7	74	55	17	2	52	7	27	53	53	52	7	27
ALDOA	339	145	116	73	22	7	51	44	11	6	39	26	21	7	70	38	14	21	21	70	38	14
ATP5A1	239	64	128	50	9	0	133	53	3	0	6	3	20	5	120	56	0	0	0	120	56	0
CALM2	374	78	106	46	29	2	80	6	16	5	40	40	21	1	53	1	19	39	39	53	1	19
LDNA	151	27	63	20	9	0	20	19	4	0	10	1	13	2	69	18	0	0	0	69	18	0
TPH1	379	114	148	30	20	7	92	15	14	5	47	11	23	8	85	16	24	5	5	85	16	24
All genes	7644	3285	3000	1424	446	173	2530	1316	260	117	355	146	459	193	2022	200	5	303	303	2022	200	5

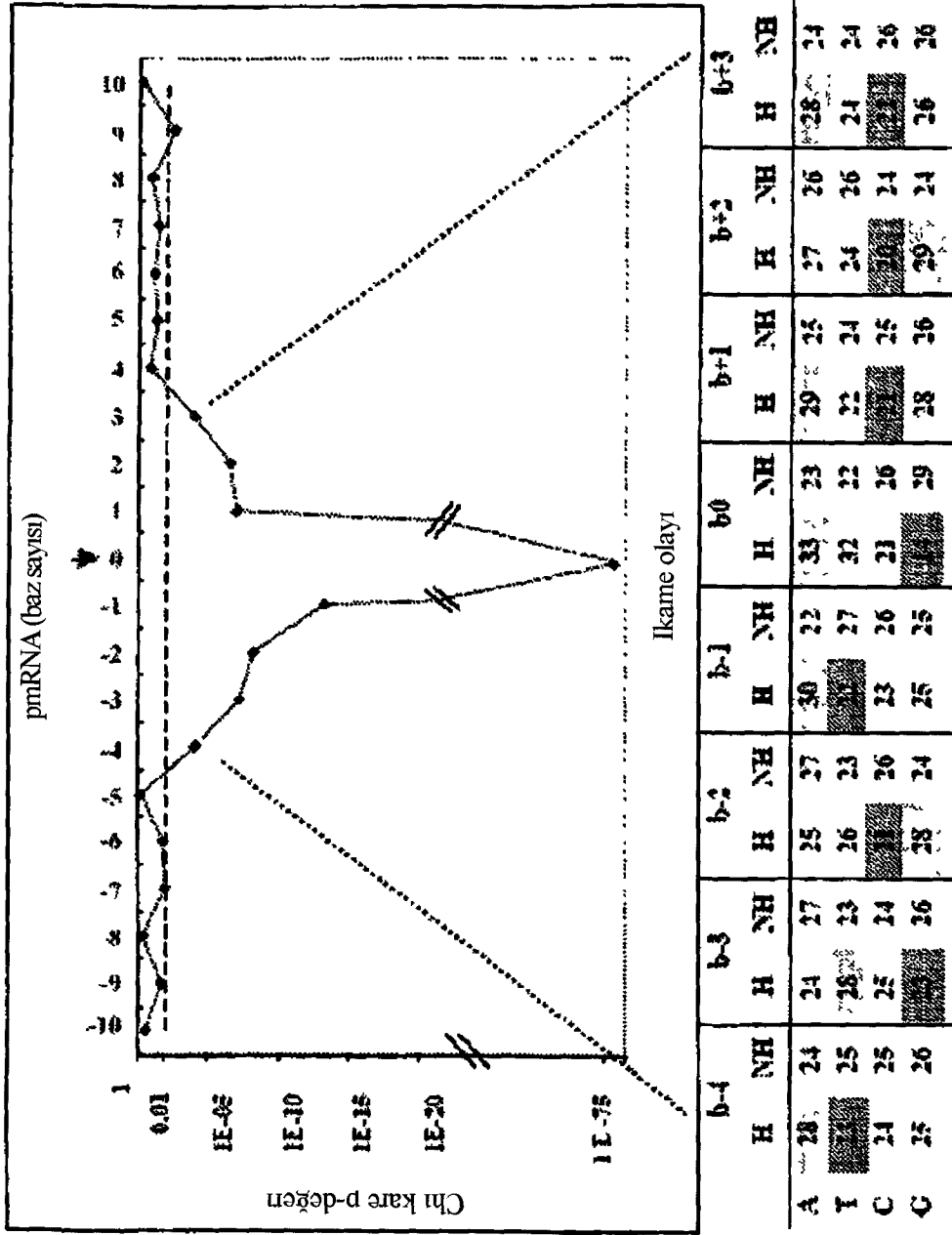
(CAN-LBE)(N-C-LBE)

F1 F2
6.99 2.34

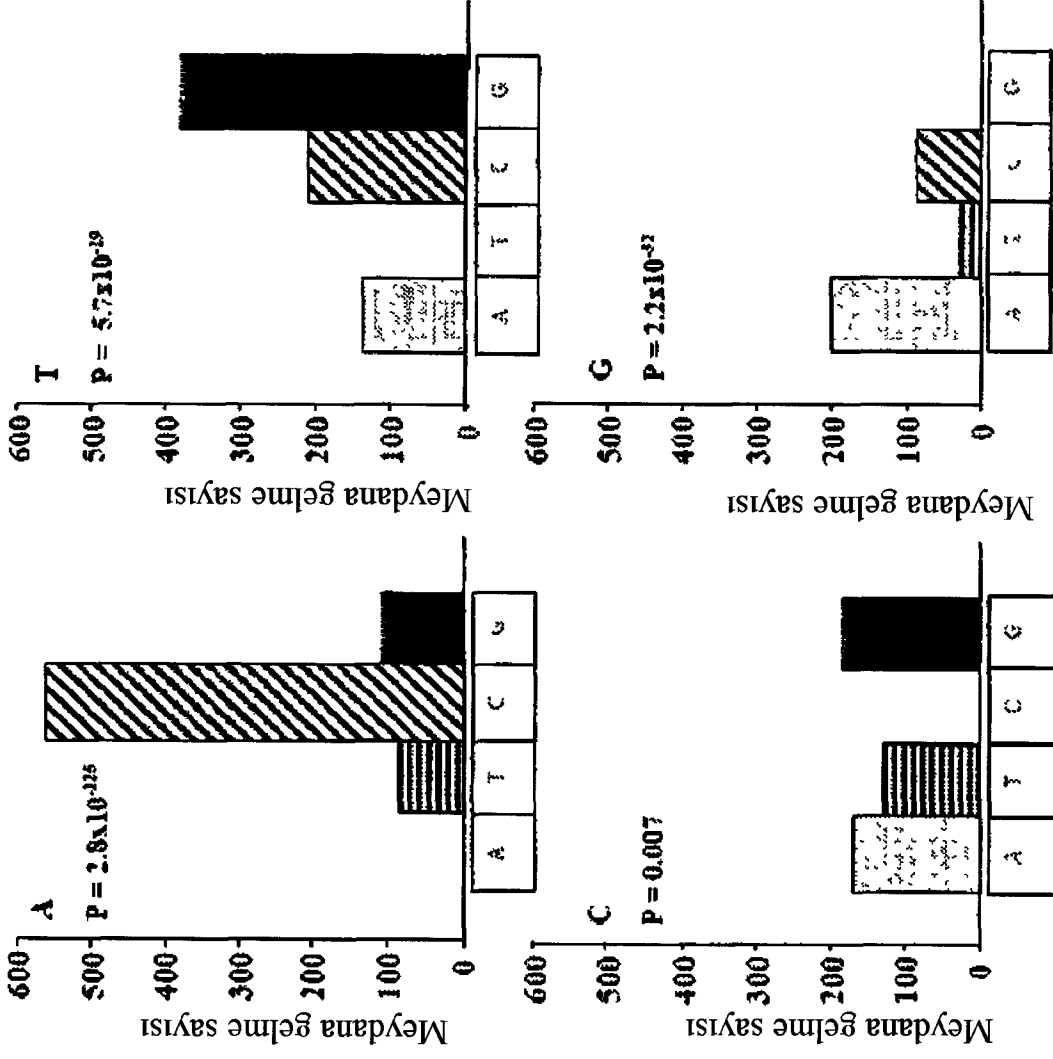
(CAN)(N-C)

F1 F2
3.15 2.27F1 F2
3.15 2.27
F2 cell lines removed

Şekil 6e



Şekil 7a



Şekil 7b

B b-1'e doğru
sapmalar (n = 799)

replacement					%
A	T	C	G		
A	41	201	42		36
T	28		56	83	21
C	77	41		126	30
G	75	9	20		13
					% 23 11 35 31

C b+1'e doğru
sapmalar (n = 630)

replacement					%
A	T	C	G		
A		24	52	37	21
T	27		45	177	47
C	38	48		15	19
G	40	11	16		13
					% 20 16 21 43

D Ne b-1'e ne de b+1'e
doğru olmayan sapmalar (n =

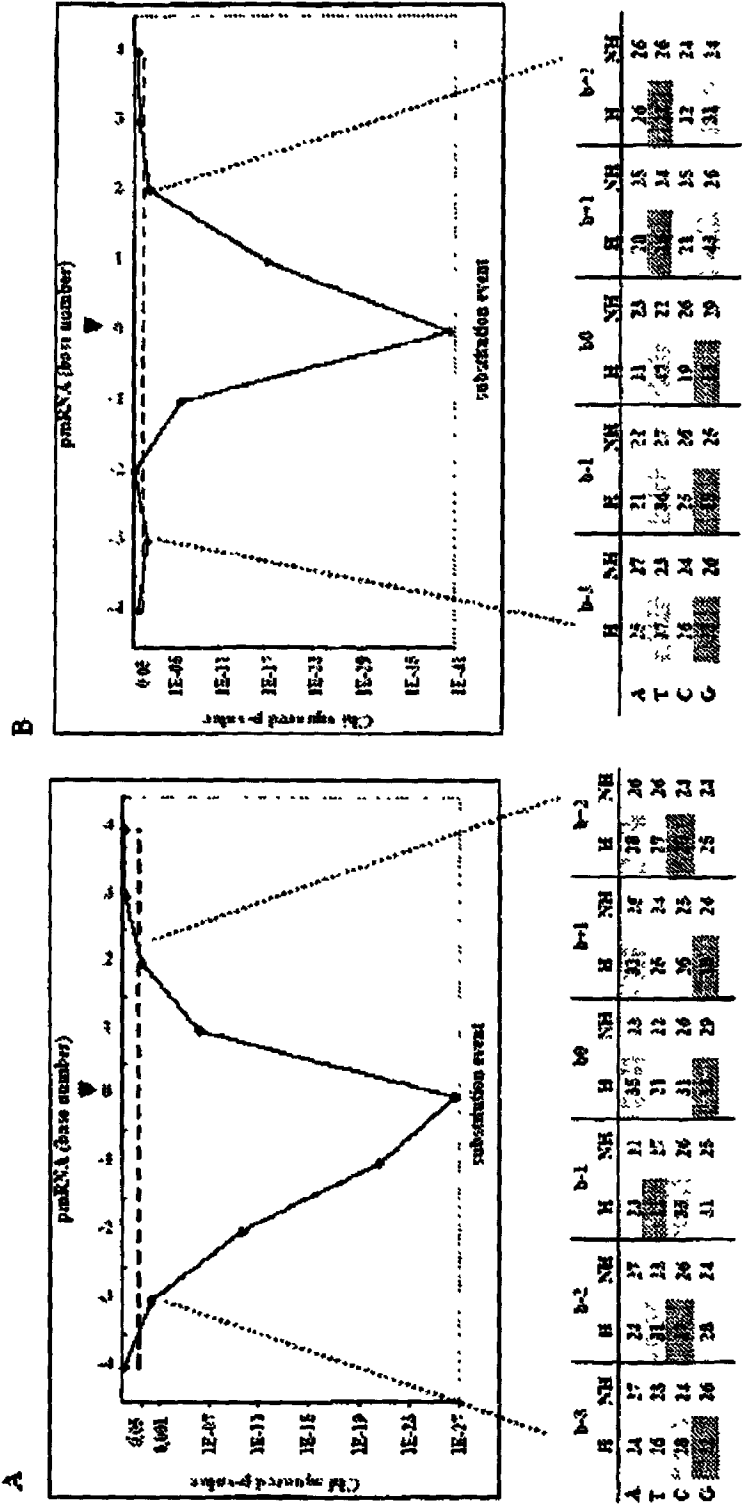
replacement					%
A	T	C	G		
A		7	148	8	47
T	42		50	9	29
C	17	10		23	14
G	7	2	24		10
					% 19 5 64 12

E b-1 = b+1'e doğru
olan sapmalar (n =

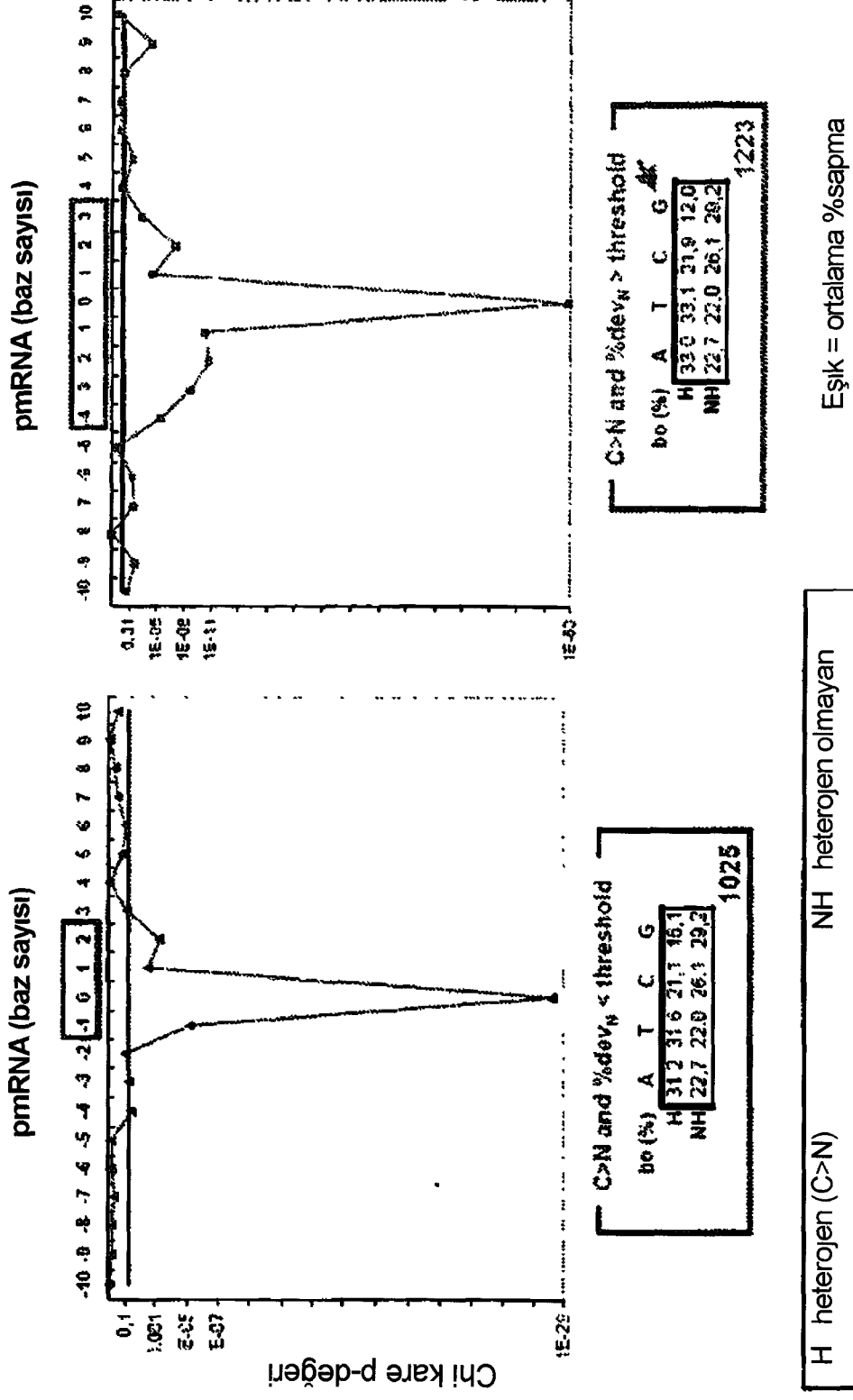
replacement					%
A	T	C	G		
A		5	52	12	20
T	11		12	95	35
C	25	30		17	21
G	71	1	8		24
					% 31 11 21 37

F Uçlu içerisindeki
sapmalar (n = 286)

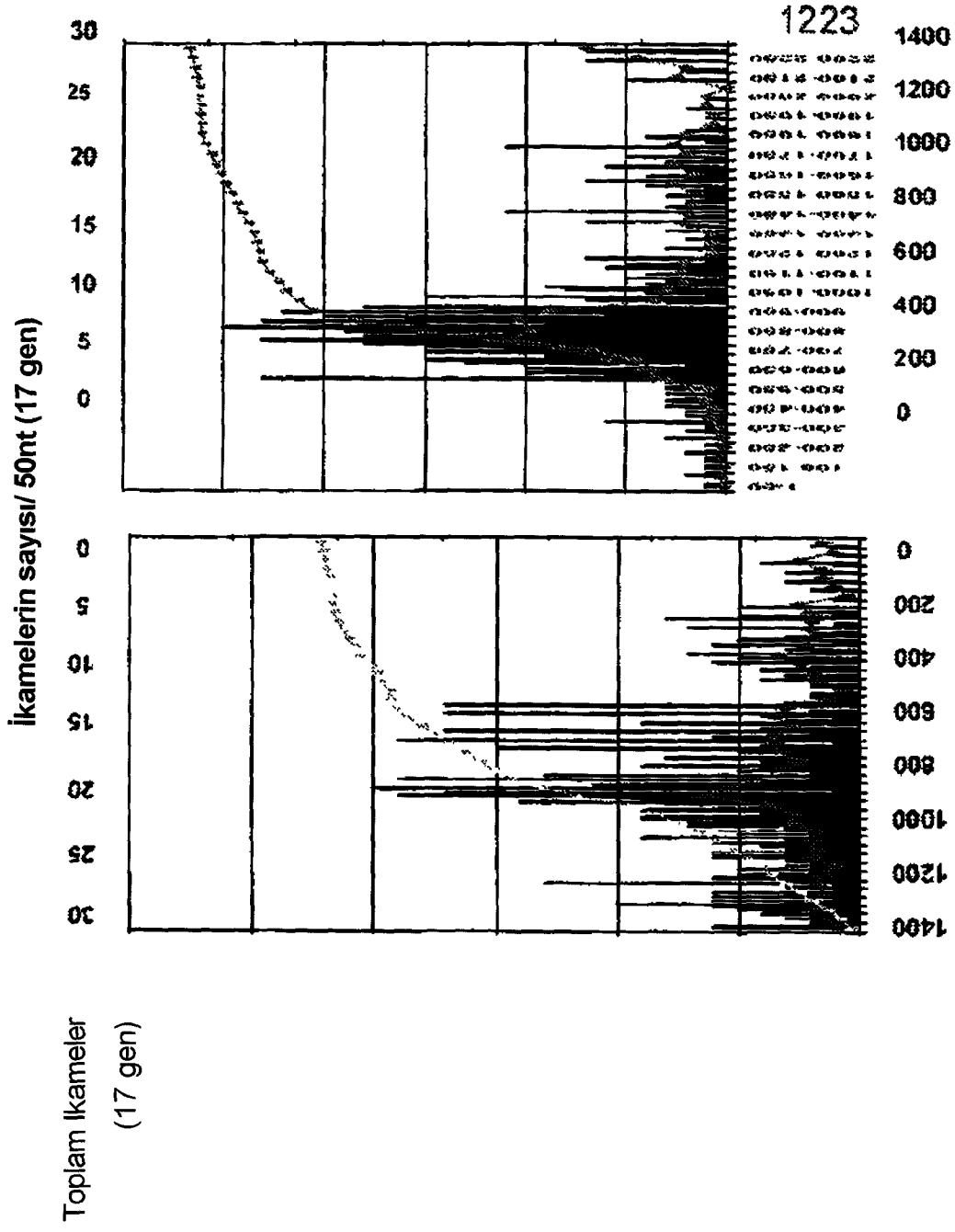
replacement					%
A	T	C	G		
A		8	107	8	46
T	31		47	20	37
C	12	1		4	6
G	6	5	17		11
					% 19 5 64 12



Şekil 7d



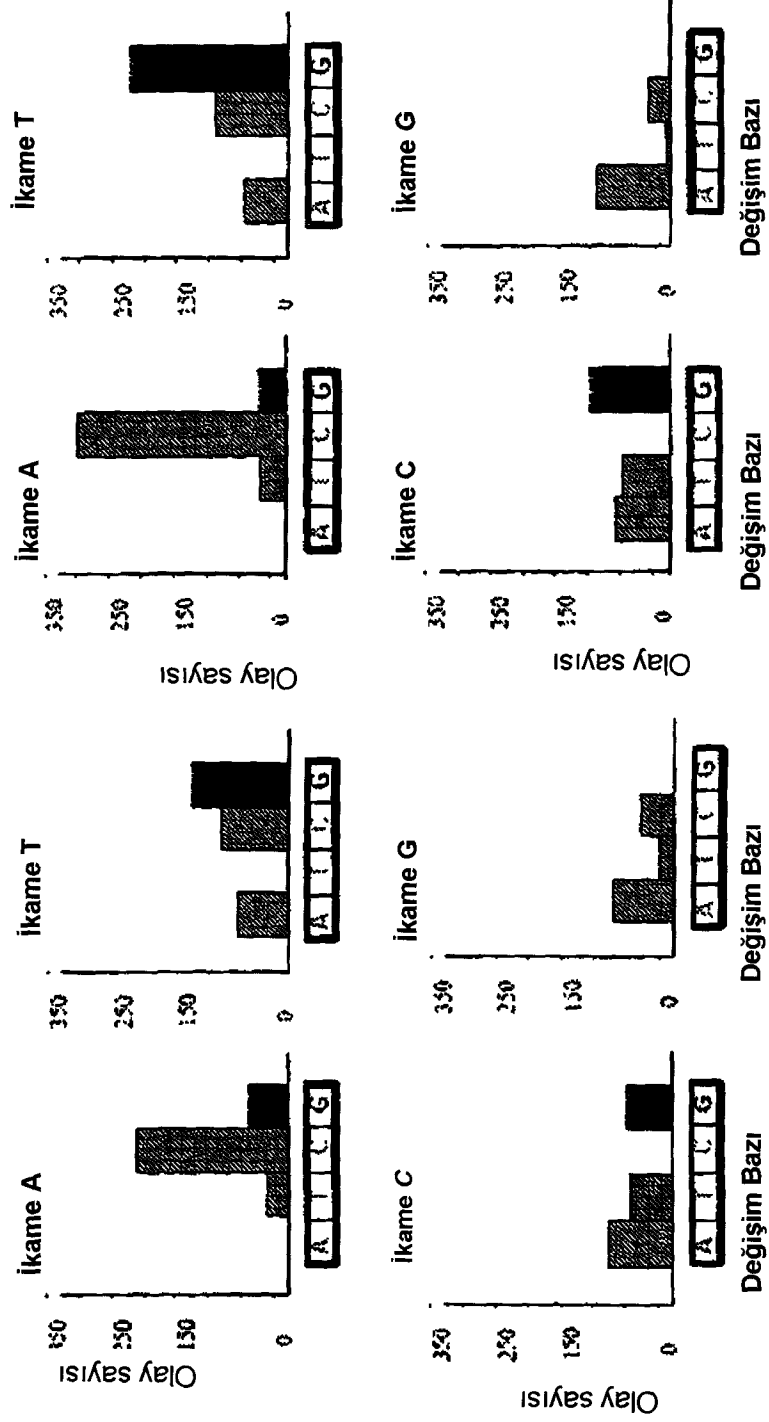
Şekil 7e



Şekil 7f

$C > N$ and $N > \text{average } \%DEV_N$

$C > N$ and $N > \text{average } \%DEV_N$



Şekil 7g

[Kanser > Normal] ikamelerinin Kodlama Etkisi		
17 genlik çalışma		
C>N ikamelerinin sayısı	2281	
CDS içerisindeki C>N ikamelerinin sayısı	1548	
Kodlama etkisi %	%67,9	
CDS bölgesi çalışması		
ikame sayısı		%
Susturma ikameleri	369	23,8%
Kodlama etkisi (AA modifikasyonu ancak aynı aileden)	393	25,4%
Kodlama etkisi (AA ailesi modifikasyonu)	744	48,1%
Sens-olmayan ikameler	24	1,6%
Kanonik STOP kodonu modifikasyonları	16	1,2%
Bir ATG kodonu veren ikameler (MET)	1	210%

Şekil 9

>U14557*431ref1BF C0328.11 filmör proteini dölümsel-kontrollü 1 (Homo sapiens)
 MCTFDEZSRHNSIYVIREADSEILEVEPAPNSKCEGNTDSIJSQHAQIAIQPSAIGTISIVITVITVQNHLEJSTSTFTEHACCTINDAIGMSLHKEIQQEPKCTTPTC
 TAAECIEHILIASFTYHITQITICEDMHTUGGKALLCPEDGCTTATMTFTRGCIKMKPQGMHLEHIVKLSQ
 >guS241428J|v|d|SP Q08371.21 vimentin [Homo sapiens]
 MSIRSVSSVAMPSPPTASPSPSRSYVTSIRTYILGSAIDAFSTISRSIYVAJYSGGVATRSRQVLKRSIPGVALLOSJFSLADAKIHETKQITKNEKLEDELATREAN
 YIDITFPEQDQKILASLEQLAGQGFSLGCVYEEHEDILRRQVQGLINDYARVTEEDWLEDDISLDEKLSEKUCQPEKSNELQSFQKQVLNGLARLDERKTELEGEELH
 PLKPLNEETFEILNRSICQHVLCITVNSSPCTGALPCTGQCTSVASRNLQEAIEHYNSFFPALFELALHNDITKACAPCESTIKSTFQKQGLCTEVTALAKQTHESLEKAGSMT
 SFTAVELKUYCCTIGLQCTICQHHSEDAKRLAEYVNSLIVYKALLSLEATYKHLLETKESRSILHIEHTFSLHEDTNLLLEELVDTHETPTLLIKHTVETASCTVINEZSCQHDQ
 LEKHTPSAAITFQSE
 >gri1171533441 roilKP aDiasI Ribozomal protein S6 [Homo sapiens]
 MKAHISFPAIGCQELIEVDEPKRITFTYFMAIEFALALAGEENKTYVTRIGGRIKQTFENKQULITHGRVRLILYVTSQCYPRPRGCEGKNSFTRGIVLRLVLMVLYKOK
 GECINPGLTITVTRCTPRKLSAIRKLIHILSRSEEDVRAQTVTRNPLNKEGKPRTKAPSGQLVTFVVLGHRSGCLMKRQTKRQSEDAEYAVILLANQZKAKERQCEQIAQWR
 ALESIRASTKESSESGKQPELSPK
 >yu452<e|I|reilKP C0C563.11 Ribozomal protein L7a [Homo sapiens]
 MPTKRAKGRKQZPAPAVTQZKAYTQTNFLPTZEFWFGIGQDCCPRAQZQIPFTVTFVIRILQDQDAIIXYELKXVDEATNQTGALLDELATATCLAKAHETPEETKQSEKQKLLA
 RAKKRAAGGVETREPPVRAQGVITITVETNRRDLYVIAEDTPTELVTFEPALQRPVGVVCIYFGQKJLRQVSEKICITVAFQVQNSQNGRLAKLTAIRINRERUTE
 LREHFGNVLGSKSYALIAKLEKAKNEIATHEGKHTFSSKESK
 >Tl45C6"25ref1KP C30J38.11 ribozomal protein, X-bağlı X-izoform [Homo sapiens]
 KQATPSEELKXVAAPPEEMHLLKLGVTAPESSTQPRHIRECLPTIIRIIRUKPLTALIGSEVIRKCGQRTKIDKQVSTCTYFAGQSLCTIRKCTYDENFALITKQKQFAVETITP
 ELIYKILAKXNVLFGQTTGJSGHPTTPAKTIRYSELIRKNTIICQCLISGCTTCTIATPCTNLCQNTGCAKLRILQVHCNSRSPQSEFDATKADANQHSFATRLNLIPTIGQOK
 KPNITLPRGSGSIRLITAEKSDKRLAKPQSGGKQCFKQSTNSQAGT

 normal proteinler

 STOP kodonları etkilenmiş olan proteinlerin ilave peptidleri

Şekil 10a

(DHPLC = Denature Edici Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

Prensip:

cDNA PCR amplifikasyonu



Isı ile denatürasyon

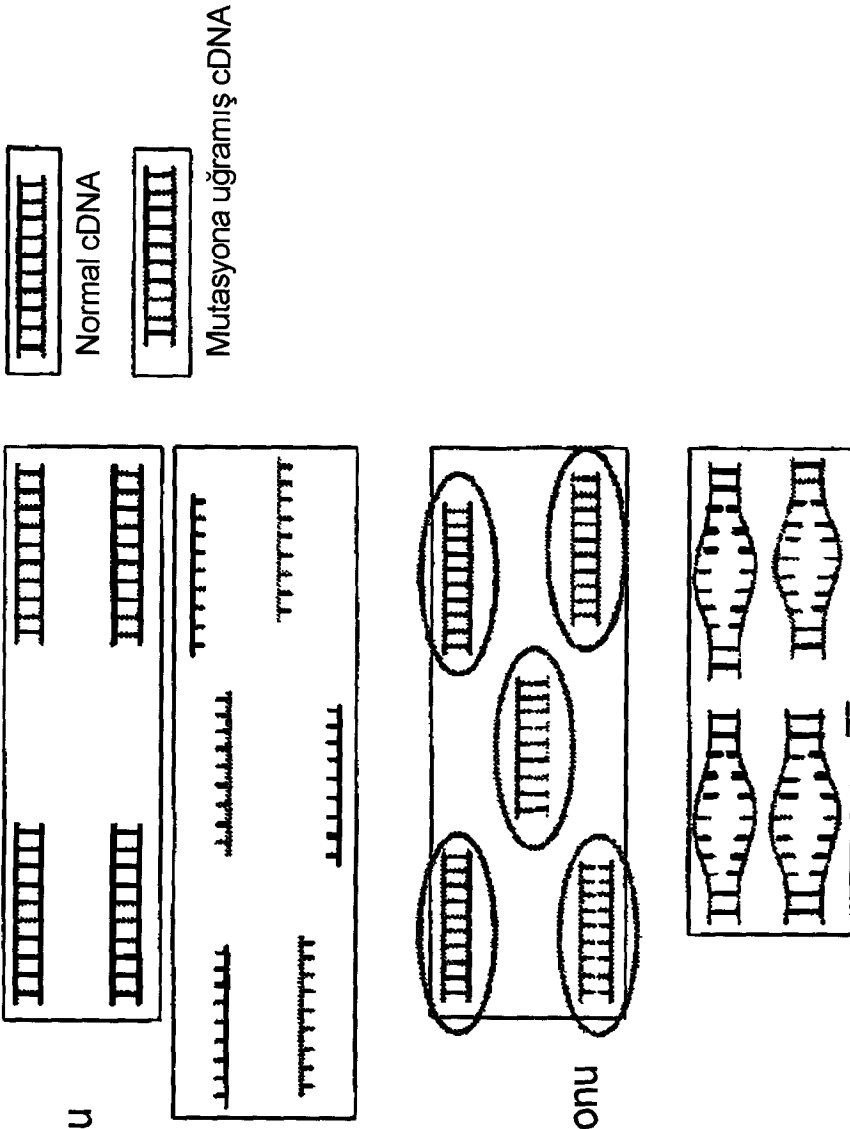


Yavaş soğuma

⇒ homoduplexes ve
heteroduplexes formasyonu



Erime %80 (55 - 60°C)



Şekil 11a

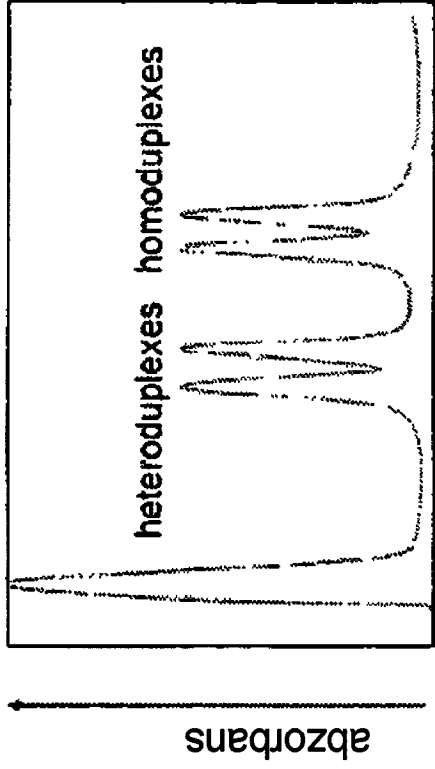
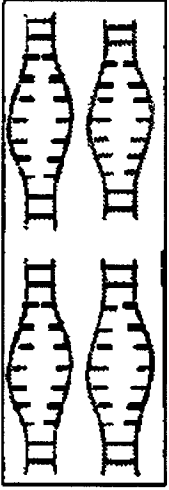
Örneğin DHPLG kolonuna

enjeksiyonu :

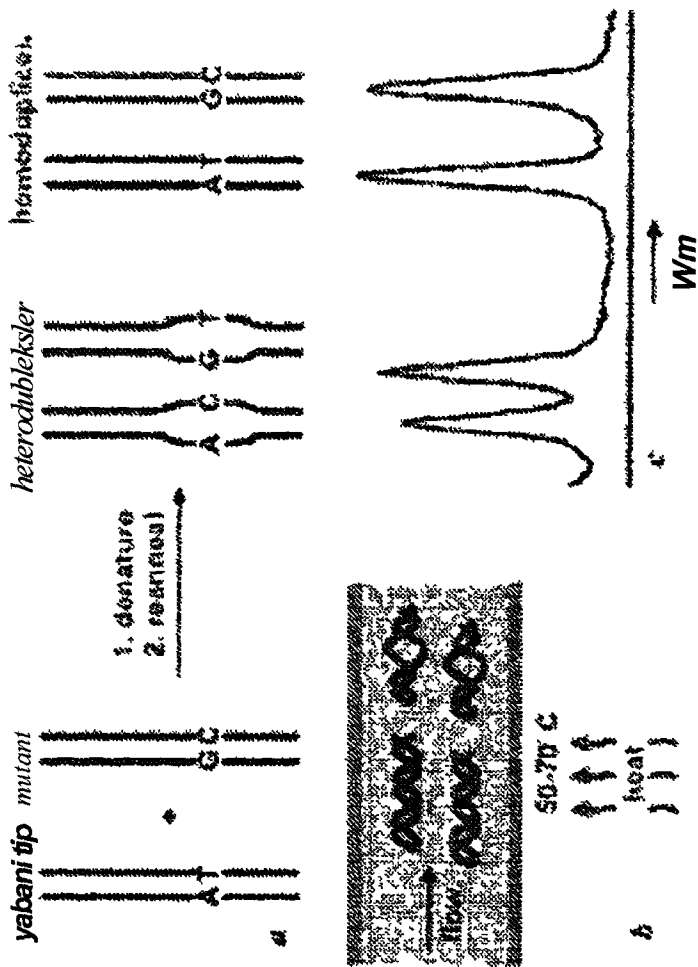
$\rightleftharpoons$ heterodupleksler

homoduplekslerden önce

ayrışır



Şekil 11b süre



Şekil 2 DHPLC ile mutasyonun tespit edilme prensibi a) DHPLC analiz öncesinde 3 dakika 95 C'de denatüre edilmiş ve 95 C'den 65 C'ye kademeli olarak 30 dakika yeniden tavlanmış PCR ürünlerinin bir karışımı olarak tıpkı orijinal homodubleksler karşılaştırmaktadır. Bir yanlış eşleşme durumunda sadece orijinal homodubleksler oluşmamakta, ayrıca heterodublekslerin sense ve anti-sense susları heterodubleksler de oluşmaktadır. b) Heterodubleksler analiz sıcaklığında (60-90 C) daha fazla denatüre olmakta ve DNA Sep kolonunda homodublekslerden daha erken ayrılmaktadır c) karşılık gelen kromatografik patern dört farklı DNA türüne ait dört farklı tepe noktası göstermektedir

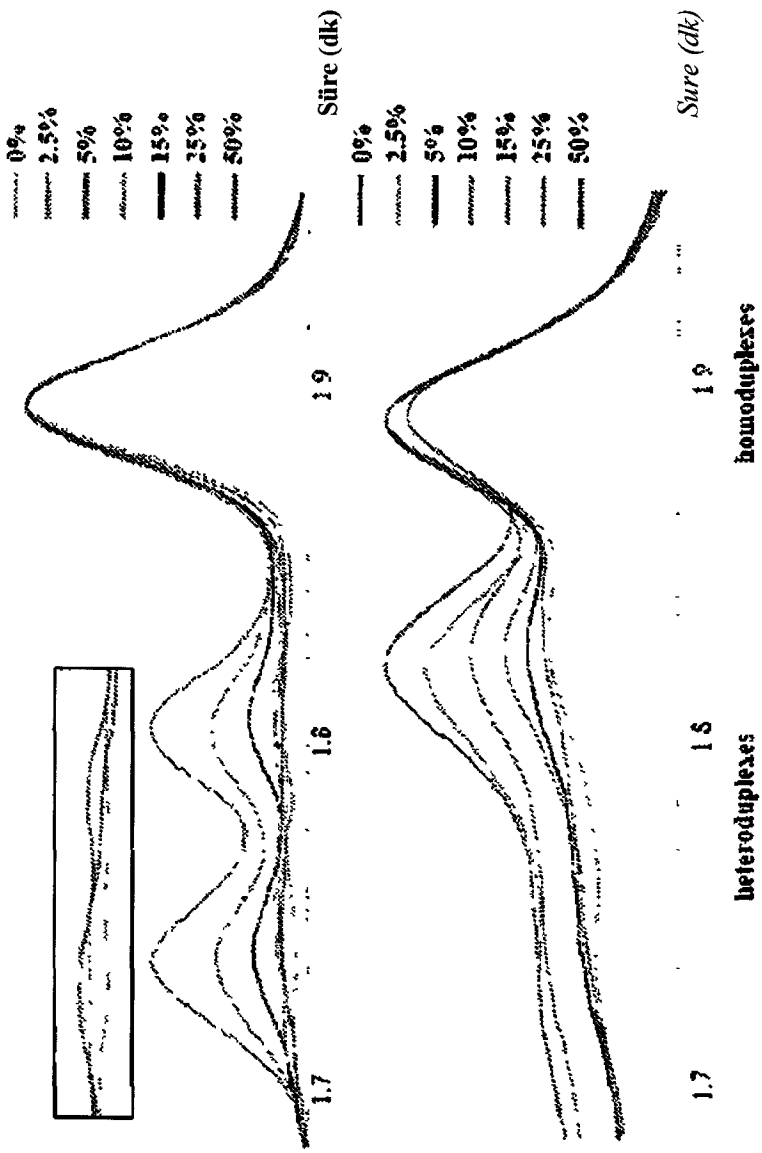
Kaynak : Theru A. Sivakumaran ve diğerleri, Current Science, 84 : 291 - 296,

2003

Şekil 11c

Pilot çalışma:

1 (Üst) ve 3 (Alt) mutasyon içeren cDNA (300bp)



=> %2.5 ila 5 arasında mutasyona uğramış cDNA'nın belirlenmesi

Şekil 11d


```

5' GGAACAGTTTAAAGATCTGTG 3' 91-335
5' TTATATTGAAATTAAGAAATGTGC 3' 390-614
Amplification product length : 314
GC% : 42,34
Suggested hybridization temperature (TA) : 53,3
Primer strand + :
Primer strand - :
Primer : 5' GGAACAGTTTAAAGATCTGTG 3'
          |||..|||..|||..|||..|||
Target : 311 : 5' GGAACAGTTTAAAGATCTGTG 3'
score : 181
TM : 70,9 / 49,3 / 55,
Primer : 5' GGAACAGTTTAAAGATCTGTG 3' (complement)
          |||..|||..|||..|||..|||
Target : 527 : 5' GGAACAGTTTAAAGATCTGTG 3'
score : 184
TM : 63,4 / 42,8 / 50,5

```

>gl34318943|ref|NM_021109.2| Homo sapiens (Homo sapiens) beta 4, X-linked (HMSH4X), mRNA

```

ACAACTGGTGGTGGGCACTGGGAGACAGACTTCCTCTGTTACTGCTGGCTGCTGCTTGGCTTTCCTCGGACACCAATCTGACAAACCGAATATCGTTGCGATCGGAAATTCGPTA
ACTCGAATCTGAAGAAACAGAGAGCCAGAGAGAPATCCACTGCTTCTAAGAAACGAATGACAGGAGAGCAAGCAGGGAATCTGTAATGAGCGGTGCGCGCCCAATATGCACTGT
ACATTCACACAGCAATTCCTCTTATTTTACTGTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTT
ATATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTT
ATATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTTATGCTTTT

```

Şekil 12c

Sembol	İsim	Expasy		Plazma Proteom veri tabanı	
		proteinler		mRNA	
		SP erişimi	PPD erişimi	PPD erişimi	
A2M	alfa-2-makroglobulin	P01323	NP_000005	NM_000014	
AHSG	Alfa-2-HS-glikoprotein	P02765	NP_001613	NM_001622	
ALB	albumin	P02768	AA439235	BC039235	
APCS	amiloid P bileşeni	P02743	NP_001630	NM_001639	
APOA1	apolipoprotein A-I	P02647	NP_000030	NM_000039	
APOA2	apolipoprotein A-II	P02652	NP_001634	NM_001643	
APOC1	apolipoprotein C-I	P02654	NP_001636	NM_001645	
APOC2	apolipoprotein C-II	P02655	NP_000483	NM_000474	
APOC3	apolipoprotein C-III	P02656	NP_000031	NM_000040	
APOD	apolipoprotein D	P06090	NP_001638	NM_001647	
APOE	apolipoprotein E	P02649	NP_000032	NM_000041	
AZGP1	2n-alfa2-glikoprotein	Q5XKQ4	CAA42438	X59766	
B2M	beta-2-mikroglobulin	P51769	NP_004039	NM_004048	
C1S	Tumleyen bileşen 1 s alt bileşeni	P08871	NP_958850	NM_201442	
C3	Tumleyici bileşen 3	Q5LDJ0	NP_000055	NM_000054	
C7	Tumleyici bileşen 7	P10643	NP_000578	NM_000587	
CDH1	E-kadein	P12830	BAA08957	AB025106	
CFB	Tumleyici faktör B	P00751	NP_001701	NM_001710	
CH3L1	kritnaz 3-benzeri 1	P36222	NP_001267	NM_001276	

Şekil 13a

Sembol	İsim	Expassy		Plazma Proteom veritabanı	
		proteinler		mRNA	
		SP erişimi	PPO erişimi	PPD erişimi	
CLEC3B	C-tipi laktin alani ailesi 3 uye B	P05452	NP_003269	NIM_003278	
CLU	klusterin	P10909	NP_001922	NIM_001831	
CP	ceruloplasmin	P03450	NP_000087	NIM_000096	
CRP	C-reaktif protein	P02741	AAH20766	BC020768	
EDN1	endotelin I	P05305	NP_001946	NIM_001955	
EGFR	epidermal buyume faktoru reseptoru	P00533	NP_958441	NIM_201284	
F13A1	koagulasyon faktoru XII, A1 polipeptid	P03488	NP_000120	NIM_000129	
F13B	koagulasyon faktoru XII, B polipeptid	P05160	NP_001965	NIM_001984	
FGA	fibrinojen alfa zinciri	P02671	NP_000499	NIM_000503	
FBG	fibrinojen beta zinciri	Q32065	NP_006132	NIM_005141	
FGG	fibrinojen gama zinciri	P02679	NP_000356	NIM_021870	
GF1	glukoz fosfat izomeraz	P06744	NP_000166	NIM_000175	
GSTP1	glutatifyon S-transferaz p1	P08211	NP_000843	NIM_000852	
HDLBP	cDNA FLJ45936 fis Vigilin'e çok benzer	Q00341	BA027153	AK127833	
HP	haptogloblin	P00738	NP_005134	NIM_005143	
HPX	hemopeksin	P02750	NP_000604	NIM_000613	
HRG	histidin-zengin glikoprotein	P04195	NP_000403	NIM_000412	
IGFBP3	insulin-benzen buyume faktoru baglanma proteini 3	P17536	NP_000569	NIM_000598	
IGJ	immunoglobulin J polipeptidi	P01591	NP_053247	NIM_144646	

Şekil 13b

Sembol	İsim	Expasy		Plazma Proteom veritabanı	
		proteinler		miRNA	
		SP enişimi	PPD enişimi	PPD enişimi	
INH1	Inhibin, alfa	P05111	NP_032182	NIM_002191	
KLK11	Kalhekrein-ilişkili peptidaz 11	Q9UBX7	NP_659196	NIM_144947	
LDHA	laktat dehidrojenaz A	P00338	NP_005557	NIM_005556	
LGALS3BP	lektin, galaktozid-bağlayıcı, çözünabilir, 3 bağlama proteini	Q08380	NP_005558	NIM_005557	
LRG1	losin-zengin alfa-2-glikoprotein I	P02750	NP_443324	NIM_052972	
ORM1	Homo sapiens <i>arasonukoid</i> 1	P02763	NP_000598	NIM_000607	
PKM2	piruvat kinaz, kas	P14618	NP_872270	NIM_182470	
PLG	plazminojen	P00747	NP_000292	NIM_000301	
PCN1	paraoksonaz 1	P27169	NP_000437	NIM_000446	
PROC	protein C	P04070	NP_000303	NIM_000312	
PZP	hamilelik-bolgesi proteini	P20742	NP_002855	NIM_002864	
RBP4	retinol bağlama proteini 4	P02753	P02753	BC020633	
SAA1	serum amiloid A1	P02735	NP_000322	NIM_000331	
SERPINA1	serpin peptidaz inhibitörü, tür A	P01009	NP_000288	NIM_000295	
SERPINA3	serpin peptidaz inhibitörü, tür A, uye 3	P01011	NP_001076	NIM_001085	
SERPINA5	serpin peptidaz inhibitörü, tür B, uye 1	P05164	NP_000365	NIM_000374	
TF	transferrin	P02787	NP_001054	NIM_001063	
TFRC	transferrin reseptörü	P02786	NP_003225	NIM_003234	
TGFBI	donuşen buyume faktörü, beta 1	P01137	NP_000551	NIM_000560	

Sembol	İsm	Expasy		Plazma Proteom veri tabanı	
		proteinler		mRNA	
		SP erişimi	PPD erişimi	PPD erişimi	
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	P01033	NP_003245	NM_003254	
TTR	transthyrin	P02766	NP_000362	NM_000371	
VTN	vitronectin	P04004	NP_000629	NM_000638	

Şekil 13d

3 plazma proteinin seçimi :

APOA1

RLKQVDPYRPIIMKAAVLTAVLFLTGQARHFWQQDEPPQSPWDRVKQLATVYDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLD
 IWDSVTSTFSKLRQGLPVTOEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEEMELYRQKVEPLRAELQEGAR
 QKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDAIRTHLAPYSDELRORLAARLEALKENGARGARLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQG
 LLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ'GARRRPPSRCSE'GPPKQV

Post-Stop Peptid

APOA2

GTCTKORDAQ'AAALPIVIMMKLLAATVLLTICSLEGALVRRQAKEPCVESLSQVFTQVTDYGKDLMEKVKSPELOAEAKSYFEKS
 KEQLTPLIKKAGTELVNFLSYFVELGTQPATQ'SVQTVFQQLASRTPTGQS'SSQVYPI'CA'INAE'

Post-Stop Peptid

APOC2

LWIVSQSQSOT'HSVPRRNWAGOPARAWRIOTMGTRLLPALFLVLLVGFVQGTQPOODEMPSPTFLIQVKESLSYWESA
 KTAACNLVEKTYLPVAVDEKLRDLYSKSTAAMSTYTGIFTQVLVYLKGE'OPDPPSVDKGRVPYSPDPPGSD'APDSQ'LLPFPFN
 SSLSNSFQ'KQDFKLLMLCOTAFLE'QCPKWRG'LEPAN'AP'LCNML'PAQ'VE'SSE''C'IVITAKKKKKKKK

Aşağıdakilere karşı antipeptid
 antikorunun üretimi:

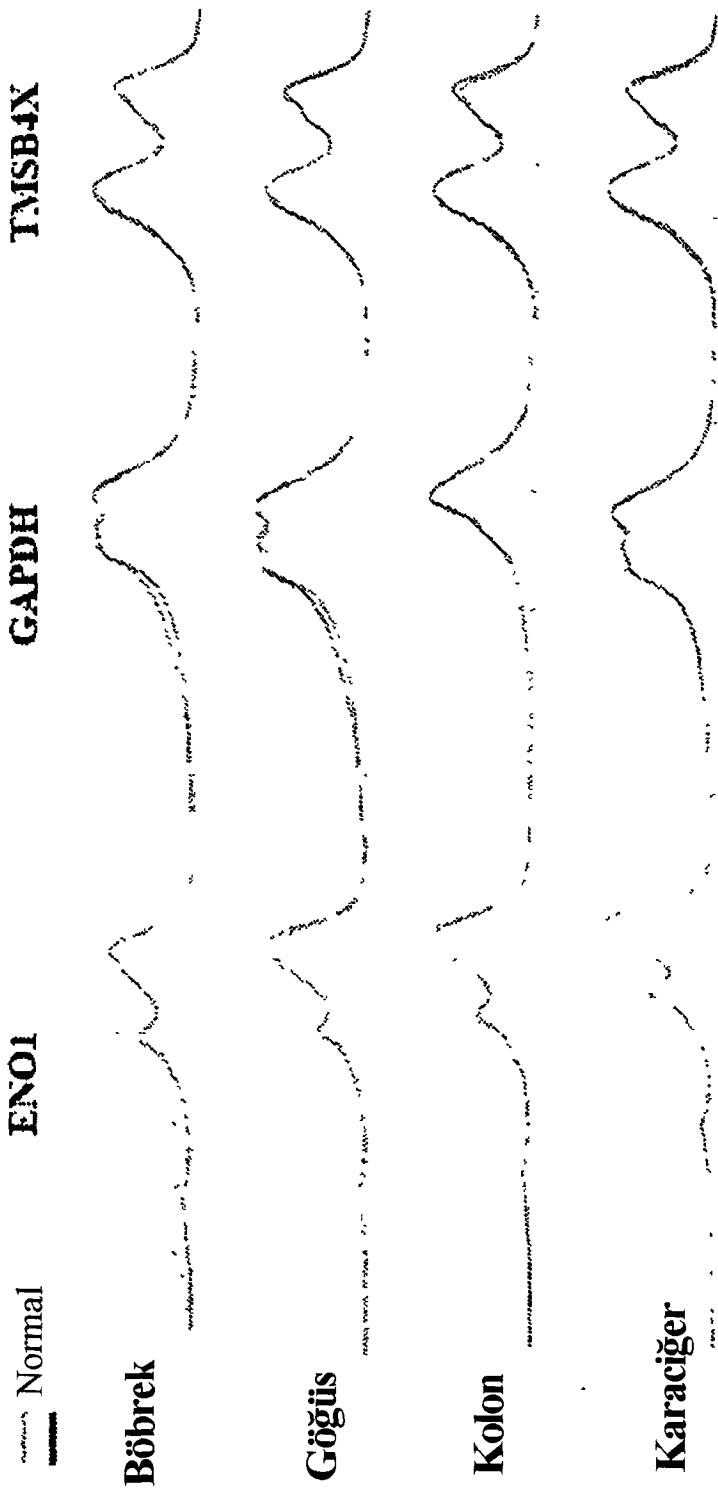
APOA1 GARRRPPSRCSE
 APOA2 VFQQLASRTPTGQS
 APOC2 DPPSVDKGRVPYSPD
 (positive antigenic profile)

Post-Stop Peptid

NH₂ Transkripsiyon infidelitesi varvanti COOH



Şekil 14

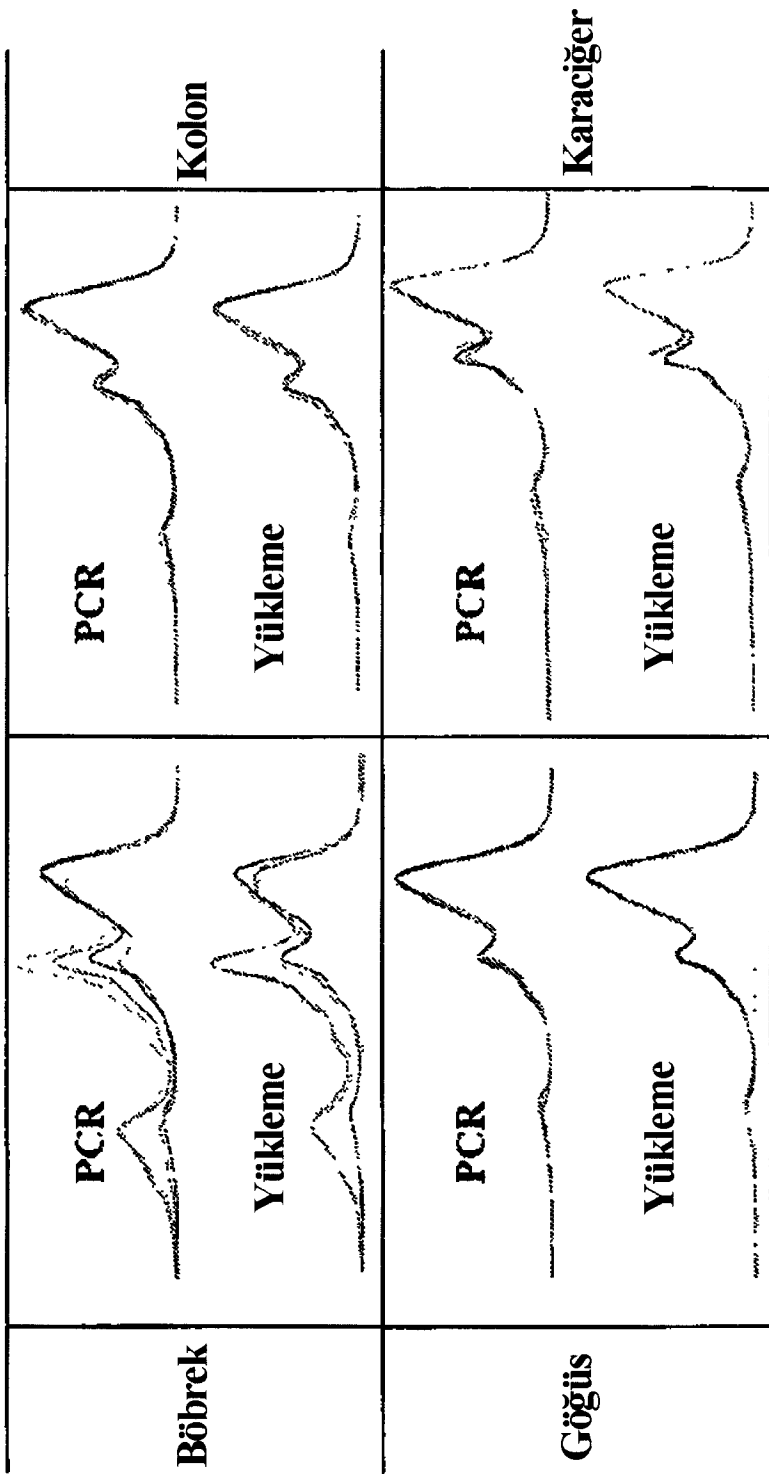


ENO1, GAPDH ve TMSB4X genleri için normal bitişik dokulara karşı tümör dokularının DHPLC profilleri.

ENO1, GAPDH ve TMSB4X genleri ve *pfx* polimerazı ile tumleyen olan oligonukleotidler kullanılarak PCR ile kanserli hastalardan alınan cDNA'lar (Biochan Inc) amplifiye edilmiştir. cDNA'lar Böbrek, Göğüs, kolon ve Karaciğer dokularından elde edilmiştir. Normal DHPLC profili Yeşil ile ve kanserli profil ise Siyah ile gösterilmektedir. Çift kollu DNA örnekleri bir DHPLC sistemine (Transgenomic) enjekte edilmiştir. Fırının sıcaklığı GAPDH geni için 62.5 C, ENO1 geni için 61.5 C ve TMSB4X geni için ise 55 C'dır. Eğriler Navigator yazılımı (Transgenomic) ile görsel hale getirilmiş ve normalize edilmiştir.

Şekil 15a

ENO1

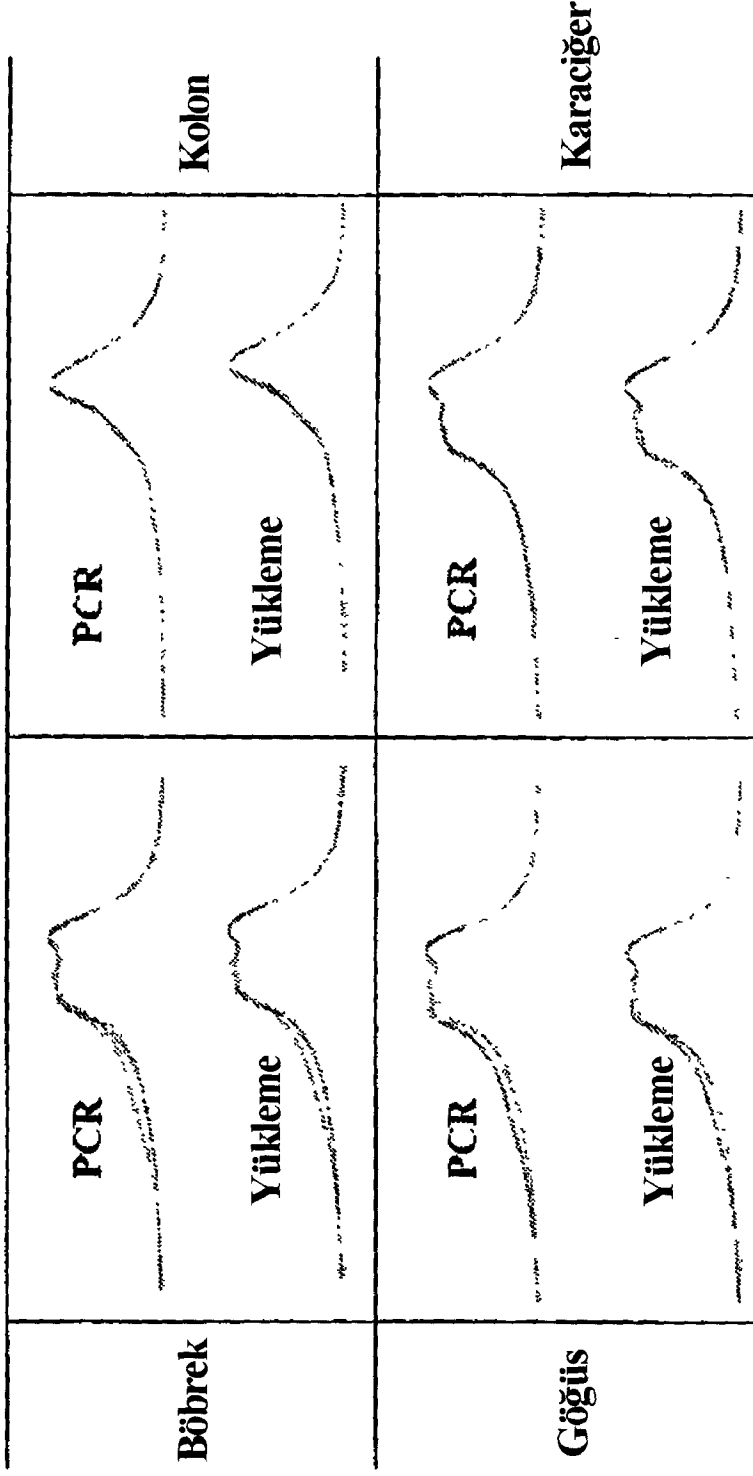


ENO1 geni için normal bitişik dokulara karşı tümör dokularının Farklı PCR ve Yükleme DHPLC profilleri.

4 doku için iki farklı PCR ürünü hazırlanmış ve her bir PCR ürünü DHPLC sistemine iki defa enjekte edilmiştir. Normal DHPLC profili Yeşil ile ve kanserli profil Siyah ile gösterilmiştir. PCR çifti için elde edilen DHPLC profili Normal için Kırmızı ile ve kanserli için Mavi ile gösterilmiştir. Yükleme çiftleri için profiller Normal için Mor ve Kanserli için Açık Mavi ile gösterilmiştir. Eğriler Navigator yazılımı (Transgenomic) ile görsel hale getirilmiş ve normalize edilmiştir.

Şekil 15b

GAPDH



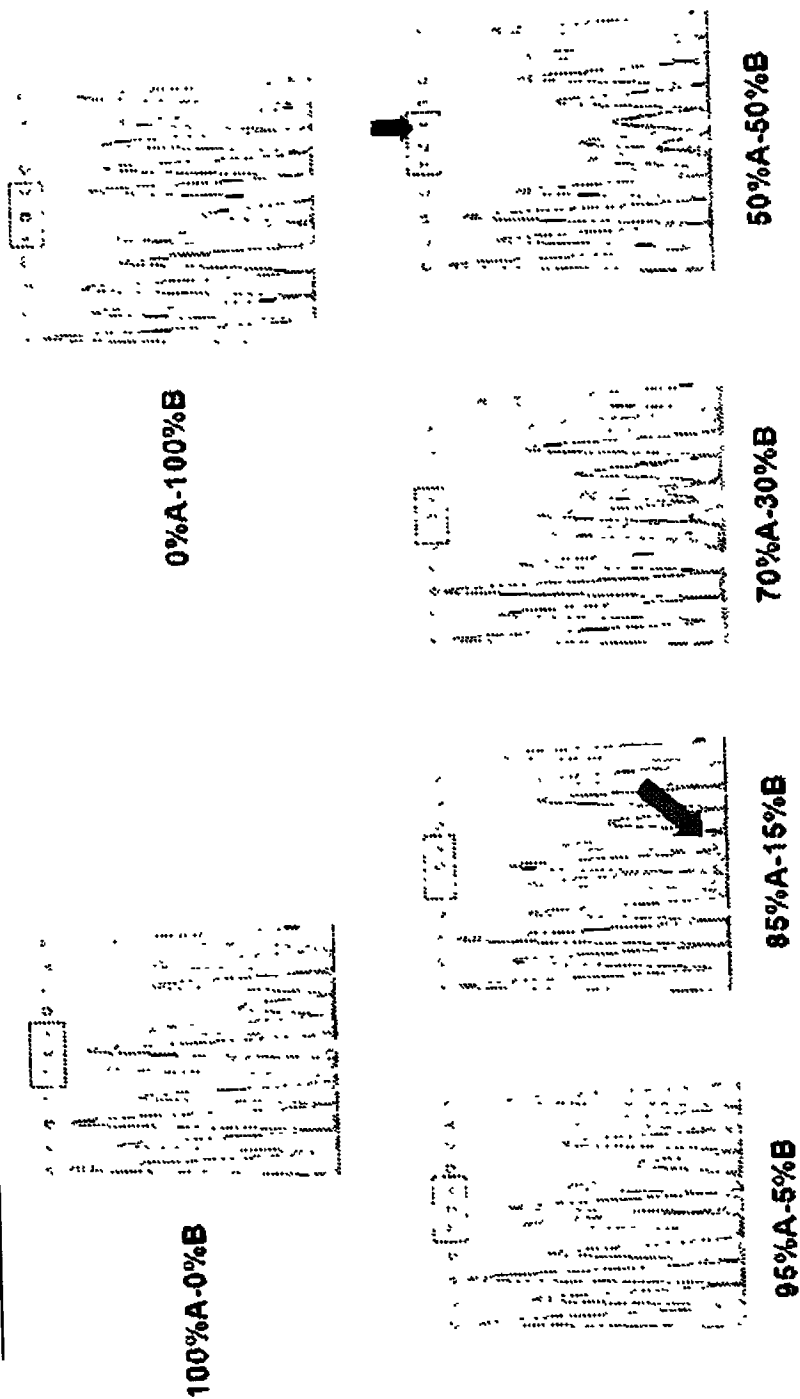
GAPDH geni için normal bitişik dokulara karşı tümör dokularının Farklı PCR ve Yükleme DHPLC profilleri.

4 doku için iki farklı PCR ürünü hazırlanmış ve her bir PCR ürünü DHPLC sistemine iki defa enjekte edilmiştir. Normal DHPLC profili Yeşil ile ve kanserli profil Siyah ile gösterilmiştir. PCR çifti için elde edilen DHPLC profili Normal için Kırmızı ile ve kanserli için Mavi ile gösterilmiştir. Yükleme çiftleri için profiller Normal için Mor ve Kanserli için Açık Mavi ile gösterilmiştir. Eğriler Navigator yazılımı (Transgenomic) ile görsel hale getirilmiş ve normalize edilmiştir.

Şekil 15c

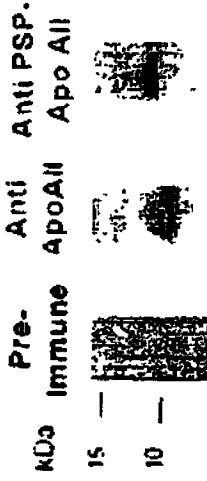
Dizilim B__ : CCGCAGCGCAT

Dizilim A__ : CCGCTCAGCAT



Şekil 16

Delipide edilmiş HDL



Şekil 17d

Afinite ayrılmış fraksiyon



Şekil 17e

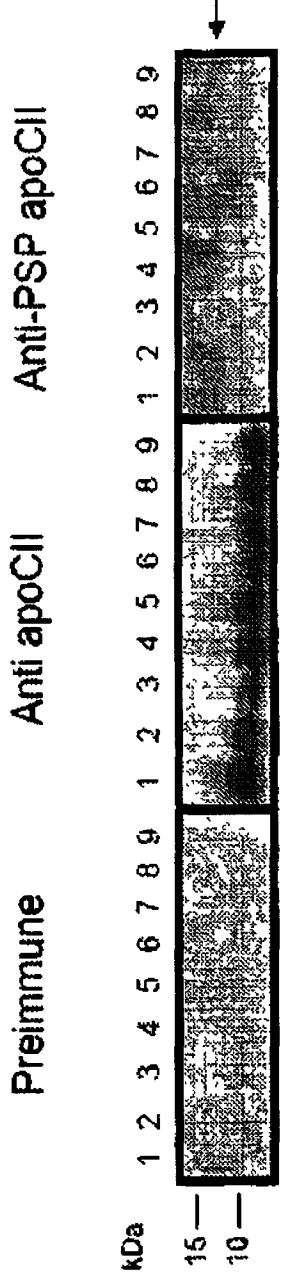
Hazırlayıcı ultrasantrifügasyon



Şekil 17c

c Metastatik fazdaki 10 kanser hastasından toplanan plazmanın sıralı ultrasantrifügasyonu ile HDL (d1 07-1 21 g/ml) hazırlanmıştır. Her bir adım ardından geri toplanan farklı fraksiyonlar %0.01 EDTA içeren 0.15 M NaCl, pH 7.4'e karşı diyaliz edilmiştir. Belirtilen fraksiyonlar üzerinde ya ticari anti-apoAII antikor (altı panel) ya da anti-PSP apoAII antikoru (üst panel) ile Şekiller 17a ve 17b de belirtilenler aynı seyrettiler kullanılarak Western blot gerçekleştirilmiştir. Jeller aşırı yüklenmiştir ve bu distorsiyon ile geniş bantları açıklamaktadır. Ayrıca orijinal toplanan plazma veya karşılık gelen bir hacimdeki lipoprotein-eksik serum (d>1.21 g/ml) üzerinde de Western blot uygulanmıştır.

d Safleştirilmiş HDL %0.01 EDTA, pH 7.4'e karşı diyaliz edilmiş, -80 C'de dondurulmuş ve sonrasında liyofilize edilmiştir. Sonrasında buz-soğukluğunda kloroform-metanol (2:1 v/v, 20 mg HDL proteini başına 5 ml) kullanılarak liyofilize edilmiş HDL üzerinde delipidasyon uygulanmıştır. Dietil eter kullanılarak ikinci bir delipidasyon ardından delipide edilmiş proteinin toplam haline getirilmesi için santrifügasyon (1000 rpm, 5 dk, 4 C) uygulanmıştır. Bu tekrarlanmıştır ve nihai topak N2(g) altında kurutulmuştur. Topak 6 M ure, pH 8 içeren 10 mM Tris içerisinde yeniden çözülmuştür. Yukarıda açıklandığı gibi pre-immun serum, ticari anti-apoAII veya anti-PSP apoAII kullanılarak 10 ug delipide HDL üzerinde Western blot gerçekleştirilmiştir. e Matris parçaları üzerinde hareketsiz hale getirilmiş anti-PSP antikorları kullanılarak apoAII'nin PSP formunun izole edilmesi için afinite kromatografi deneyleri yapılmıştır. Ayrıntı kısmı hem anti-apoAII hem de anti-PSP apoAII antikorları kullanılarak Western blot ile analiz edilmiştir.



Şekil 17f

Tavşan poliklonal anti-PSP apoCII antikorunun kullanılması sırasında Şekil a'da gerçekleştirilene benzer bir deney gerçekleştirilmiştir

İsm	mRNA id	PSP	Karar
A-5G	NM_001823.1	AR-HQDCEEVYARRHSHHFVQANNAWV3SLJCWFRKCHMP3TUSLSESLPY/PHT5AEIWWVYMFDP3H	YES
ALB	BC029235	RS-AYESUF_FEVICAKNTLSIK-KFL	YES
APCS	NM_001894.2	GLDSTRALENEMTV	YES
APCA1	NM_000039.1	QARRPPPSRQSE	YES
APCA2	NM_001843.1	3VQTFVQPLASRTF130S	YES
APCA2	NM_000453.1	QPOFF3VONGRVYEPDP3SD	YES
APCA3	NM_000046.1	CLNTPCFPAYPCCLGSCNLOGGPURLMPDSLSALFHLMPGPPPGWASQ	YES
APOD	NM_001847.2	PGSTGRFLPLKNTSASLSPTPFPFKDHPHFDS	YES
APOE	NM_000041.2	TPAFAMRPHATFCLLPFRSLQRETLSPQPSWGP	YES
A2GP1	X58745.1	EARVGGHWQECTG	YES
CHIL1	NM_001275.1	PSVCHTARGPRMPRPLAFAGPEPDHLC	YES
CLU	NM_001881.2	DYCVAFAP7QASESSQCCLOPPRESSARHVTRPQFP3GQLRPA3PQSG3CTLQ3AAH-GKNT4PACII	YES
HR3	NM_000442.2	NVIFLRKXNNTLN	YES
IGFBP3	NM_002928.4	TPAARLIWSSNMPIYFACKTAKDMTESWLOQFFIFLVVH	YES
NHA	NM_002191.2	GWGVFLNPMWGGHLP7HESVEEROSWEIDGSHSLSLQLWATLP7LLSQ	YES
KC111	NM_144947.1	TGPT-KGSPFSISTWCLVDPVHNNKGP	YES
PKMC	NM_122470.1	WYPEPLQFLSHPLEP2HPL3Q3QL	YES
PL3	NM_000391.1	LDGRSDAITHLEAGTWY9I	YES
SERP1A3	NM_001055.4	3LPSSSGALSHLELGMKNGCLOLWADGPGCAPSGHGNUGFACLSLEGGGOSLCSHAKRGQWYLOSOGGYNAS	YES
TF	NM_001003.2	NLR3RAATHV/MGTQMHHEPALVSLADWYCANHYCLHSSVLPQVLMK	YES
TGFBI	NM_000046.3	GPAPRPAPAGAPAPFPAPAPALPMGAVFKQ7AFSPFPG4FLKMERGL2ISVSL3ACLO9S5LTFPH5HSLSLFLCLLL PUC7HPLG3HAGDTSQEM4YCS	YES
TTR	NM_000371.1	QTSPPVDSKQEGKDFH	YES

Şekil 18a

>P02765 AHSG Alfa-2-HS-glikoprotein	IPNDDPETEEAALVAIDYINQNL PWGKYKHTL NQIDEVYVWPQPSGELFEIETLTETTCRVLDPTP
>P027S8 Albumin	FSVYAKCDSSPDSAEVRKVQDDCPLLAPLNDTRVWHAAKAALAFNAQNNGSNFQLEIEISRAQL NLLAEKOYGCKATLSEKLGAEVAVTCVTFOTPVTSQPOPEGANEAVPTPVDPDAPPSPLG IYDLRHTFMGVVSLGSPSGEVSHPRKTRTVVQPSVGAAGPVVPPQGRIRHFKVASGIGRDEEV 4GRSTLSSLSLLPYIPHRTEAEWVVMFDIRH*
	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHRFKOLGEENFKALVIAFAQYLOQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCOKSLHTLFGD KLCIVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPILPRLVRPEVDMCTAFHDMETFLKKLYEIAHRHPYFYAPELLFFAKRYKAAAFTE CCQAADKAAQLPKLDELROEGKASSAKQRLKASLOKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCCHGDLLECADRADLA KYICENQDSISSKLECCCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKOVFLGNFLYEYARRHPDYVSVLLRLAKTYETTEL KCCAAADPHECYAKVDFEFKPLVEEPONLIKQNCSELFQLGKEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPLVEVSRNLGKVGSKGCKHPKAMPKCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETTFHADICTLSEKERQIKKQITALVELVKHKPKATKEQLKAYM DDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKTCCCKSSCLRLTSHLKASQPTMRIRERK*RSKAVSSVLEFRWCKANTLSKHKFL*
>P02743 APCS Serum amiloid P-bileşeni	SVTDHVNLTIPLEKPLONFTLCFRAYSCLSRAYSLSFYNTQGRDNELLYVKERVGEYSLYIGRH TPLVKKGLRQGYFYEAQPKVYLQEQDSYGOKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYO STRALENEMTV*
>P02647 APOA1 Apolipoprotein A-I	NDRVKDLATVYVDVYKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLDNWDVSTSTFSKLRQLGPVTO LDDFQKKWQEEEMELYRQKVEPLRAELOEGAROKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRT AKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFVSVLSALEEYTKKLNQ*GARRRQPSRQSE*
>P02652 APOA2 Apolipoprotein A-II	VSQYFQTVTDYGKDLMEKVKSPLOAEAKSVFEKSKECLTPLIKKAGTELVNFLSVFVELGTOP
>P02S55 APOC2 Apolipoprotein C-II	SPSTFLTVKESLSSYWESAKTAQNLYEKTYPAYDEKLRLYSKSTAAMSTYTGTGFTDQVLS
>P02656 APOC3 Apolipoprotein C-III	XGYMKHATKAKDALSSVOESQVAQARGWVTDGFSLSKDYWSTVKDKFSEFWLDQFEVRP CRLLKRESLSALLPTLAPGEFPQGLASQ*
>P05090 APOD Apolipoprotein D	VOENFDVNVKYLGRWYIEKIPTTFENGRCIQANYSLMENGKIKVNLNQLRADGTVNOJEGEATP ALVYSCTCIQDLFHVCFAWILARNPNLPPETVDSLKNILTSNNIDYKKMTYTDQVNCPKLS*PGSI
normal proteinler	le of proteins whose STOP codon is affected

Şekil 18b

>P02649)APOE Apolipoprotein E
 MKVLWAALLVTLFAGCQAKVEQAVETEPELRLQOTETWQSGQRWELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEEILSSQVTOELRALMDETNKKELKAY
 KSELEEQLTPVAEETRALRSKELOAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGOSTEELRVRLASHLRKLRLLRDADDLQKRLAVYQAGAR
 EGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSAGQPLQERAAQAWGERLARMEEENGSRTRDLRDEYKEQVAEVRAKLEEQACQIRLQAEAFQAR
 LKSWFEPLVEDMOROWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH¹²KPAAMRPLATPOLPPRSLORE¹¹LSPP¹³PS¹⁴SN¹⁵GGP¹⁶
 >Q6XKQ4JAZGP1 Alfa-2-glikoproteini 1, ginko baglayıcı
 MWASMSRM¹PVLLSL²LLGPVQENODGRYS³LYTYTGLSKHVEDVPAFQALGSLNDLOFRYNSKDRKSQPMGLWROVEGMEDWKODSQ
 LQKAREDIFMETLKNVEYYNDSNGSHVLOGRFGCEENRSGAFWKYYDGDYIEFNKEIPAWVPFDPAAQITKOKWIEAEPVY¹QRAKAYLE
 EECRATLRKYLKYSKNILDRQDPPSVAVTSHQAPGEKKKLKOLAYDFYPGKIDVHMTRAGEVQEPELRGDIVLHNGNGTYQSWWVAVVPPQDTAP
 YSCHVQHS¹SLAOLVVPWEAST²EARVGGNCS³QTQ⁴
 >P36222)CHI3L1 Kitinaz-3-benzeri protein 1
 MGVKASOTGFVWLVLLQCCSAYKLVCYTSWSOVREGDGS¹CFD²ALDRFLCTHIYSFANISNDHIDTWEWNDVLYGM³LN⁴TLKNRNP⁵NLKTLLS
 VGGWNFGSQRFSKIASNTQSRRTEIKSVPPFLRTHGFDGLDLAWLYPGRROKQ⁶HF⁷TTLIKE⁸MAEFKEAQP⁹GK¹⁰Q¹¹LLSAALSAGKV¹²TIDSSYDIA
 KISQHLDFISIMTYDFHGAVRGTTGHSPLFRGQEDAS¹³PD¹⁴RF¹⁵SN¹⁶TDYAVGYMLRLGAPASKLVMGIPTFGRSFTLASSETGVGAPIS¹⁷GP¹⁸GIPGRFT
 KEAGTLAYVEICDFLRGATVHRTLGGQVPYATKGNQWVGYDDQGESVKSVQY¹⁹LKDRQLAGAMVVALDLD²⁰DFQGSF²¹CGODLR²²PFPLTNAIKDALA
 AT²³PSV²⁴LH²⁵TA²⁶RG²⁷SN²⁸PR²⁹PLAPALRE³⁰PD³¹HLPC³²
 >P0808)JCLU Klusterin
 MQVCSQPORGCYREQSAINTAPPSAHNAASPGGARGHRVPLTEACKDSRIGGM¹MKTLLLFYGLLLTWESGOYLGDQTVSDNELQEMSNOGSK
 YVNKEIQNAVNGYKOKTLEKTNEERKTLLSNLEEAKKKEDALNETRESETKL²KELPGVCNETMMALWEECKPCLKOTCMK³FYARVCRSGSGL
 VGRQLEEF⁴LNQSSPFYFWNNGDRIDSLLENDROQT⁵MLDVMDHFSRASSIDELFODRFF⁶TREP⁷ODTY⁸HYLPFSLPHRRPHFFPKSRIVRSUM
 PFS⁹PEPLN¹⁰FHAMFQPLEMIHEAQOAMD¹¹HFSPAQHPPTFIREGDDRTVCRERHNS¹²TGCLRMKDCODKOREILSVDCSTN¹³PSQAKLRR
 ELDESLOVAERLTRKYNELLKSYD¹⁴WKMLNTSSLLEQLNEQFMWWSRLANLTGEGDY¹⁵LV¹⁶RVTT¹⁷YASHTSDSDVPSGVTEWV¹⁸WKLFDSDPIT¹⁹VTYP
 VEYSRKNPKFMETVAEKALQEYRKKHREE²⁰NDVAF²¹APTGA²²SESS²³FO²⁴LELQPPRESSA²⁵GHQYTT²⁶PLP²⁷PGQLR²⁸FPAS²⁹PSUS³⁰CTLLD³¹SAAHG
 KNRIAPACN³²
 >P04198)HRG Histidin-zengin glikoprotein
 MKALIAALLITLQYSCAVSPTDCSAVEPEAEKALDLINKRRRDGYLFOLLRIADAH¹LRVENTTY²YLYLV³DVQESDCSVLSRKYW⁴NDCEPPD⁵SRRP
 SEIVIGQCKVIA⁶TRHS⁷HE⁸SGDLRV⁹ID¹⁰FNCTTSSVSSALANTKDSPL¹¹ID¹²FEDT¹³ERYRKOANKALEKYKEEND¹⁴DFASFRVDRI¹⁵VARVYRGGE¹⁶TGY
 FYD¹⁷FSVRNCP¹⁸RHHF¹⁹RP²⁰NV²¹FG²²CRAD²³LFYDVEALDLES²⁴PKNLVINCEV²⁵FD²⁶QOE²⁷HENINGV²⁸PPH²⁹LG³⁰PF³¹HWGG³²HERS³³TTK³⁴PPK³⁵PHGSRD³⁶PHH
 PHK³⁷PH³⁸EG³⁹PP⁴⁰PP⁴¹DERD⁴²HS⁴³HG⁴⁴PL⁴⁵PG⁴⁶PP⁴⁷LLP⁴⁸MSC⁴⁹SSCD⁵⁰HAT⁵¹FTNGAORHSHNNSSDL⁵²HP⁵³HK⁵⁴HS⁵⁵EQ⁵⁶HP⁵⁷GH⁵⁸PH⁵⁹HE⁶⁰HD⁶¹THRQ
 HP⁶²GH⁶³HP⁶⁴GH⁶⁵HP⁶⁶GH⁶⁷HP⁶⁸GH⁶⁹HP⁷⁰CH⁷¹DFODY⁷²GPC⁷³DD⁷⁴PPHNO⁷⁵GH⁷⁶CH⁷⁷GH⁷⁸GF⁷⁹PP⁸⁰GH⁸¹LR⁸²RR⁸³GP⁸⁴GK⁸⁵GR⁸⁶PF⁸⁷HCRQIGSV⁸⁸YRL⁸⁹PL⁹⁰RKGEV
 L⁹¹PL⁹²PEAN⁹³PS⁹⁴FL⁹⁵PH⁹⁶HK⁹⁷PL⁹⁸KPD⁹⁹NQ¹⁰⁰PP¹⁰¹QSV¹⁰²SESC¹⁰³RC¹⁰⁴K¹⁰⁵FG¹⁰⁶PPQVSM¹⁰⁷FT¹⁰⁸HT¹⁰⁹FPK¹¹⁰N¹¹¹AP¹¹²LR¹¹³K¹¹⁴M¹¹⁵N¹¹⁶T¹¹⁷L¹¹⁸N¹¹⁹

Şekil 18c

>P17936|jGFBP3 Insülin-benzerli buyume faktoru-bağlayıcı protein 3
 MORARPTLWAAALTLLVLLRGPPVARAGASSAGLGPVVRCEPCDARALAOCAAPPVCAELVREPCCGCCQLTCAISEGQPCGITYTERCGSGLR
 CQSPDEARPLQALLDGRGLQYNASAVSRLRAYLLPAPPAPCDASSEEDRSAGSVSPVSTHRVSDPKFHLHSHKIIKKHGHAKDSQRYKVD
 YESQSDTQNFSSSKRETEYGPCORREMEDTLNHLKFLNVLSPRGVHIPNCDKKGFYKXCCRPSSGKRKRGFQWCVDAYGQPLPGYTTKGKED
 VHCYSMOSKTPAAQLAKSSSMPTYFAQCTAKCATSSVALQPRRFLFVAV*
 >P0511|IINH1 Inhibin alfa zinciri
 IMVHLHLLTTPQGHSCQGLELARELYLAKYRALFLDALGPPAVTREGGDPGVRRLLPRRHALLGGFTHRGSEPEEEEDVSQAILFPATDASCED
 KSAARGLAQEAEEGLFYMFRPSQHTSRQVTSQALWFHTGLDRQGTAAANSSEPLGLLALSPGGPVAVPMSLGHAPPHWAVLHLATLSALSLL
 THPVLVLLRCPLCTCSARPEATPELVHTRTPPSGGERARRSTPLMSWPWSPSALRLLQRPPEEPAAHANCHRVALLNISFQELGWERWIVYP
 PSFIFYCHGGCGLHIPPNLSLPPVGPAPTPAGPYSLIPGACPPCCAAALPGTMRPLHVRTTSDGGYSFKYETVPNLLTQHCACITGKGVFLNPMA
 GSKAPTHSWEERQSWEDGSHSSLSLELQAWATLPTLLSQ*
 >Q3UBX71KLK11 Kallikrein-11
 MORLRVYLRDWKSSGRGLTAAKEPGARSSPLQAMRILOLILALATGLVGGETRIIKGFCKPHSQPWQAALFEKTRLLCGATLIAPRWLLTAAHQL
 KPRYVHLGQHNLOKEEGCEQTRTATESFPHPGFNNSLPNKDHRNDIMLYKMASPVSTWAVRPLTLSSRCVYTAGTSLISGWGSGTSSPQLRLPH
 TLRCANITIEHOKCOENAYPGNITDTMYCASVQEGGKDSQGGPLVCNQSLGIIISWGQDPCATRKPGVYTKVCKYVVDWIOETMKNN*TCP
 THSPSPGISIWCALYPMISANKK*
 >P14513|PKM2 Piruvat kinaz izozimier M1/M2
 MSKPHSEAGTAFIQTCQLHAAMADTFLEHMCRLDIDSPITARNITGICTGPASRSVETLKEMIKSGMNVARLNFSGTHEYHAETKKNVRTATES
 FASDPILYRPVAVALDTKGFEIRTLGUKGGTAELKKGATLKLTDNAYMEKCDENILWLDYKNICKVVEVGSKYVDDGLISLOVKKQKGADFLVTE
 VENGSSLOSKKGVNLPAAVDLPVASEKDIDDLKFGVEQDVDMVAFSFRKASDVHEVRKYLCEKGNIKIKISKIENHEGVRRFDEILEASDGIMVA
 RGDLGIEIPAEEKVFLAOKIMIGRCNPRAGKPVICATOMLESMIKKPRPTRAEGSDVANAVLDGADCMISGETAKGDVPLEAVRMOHLIAREAEAA
 MFHRKLFEEELVRASSHSTDLMEAMAMGVSVEASYKCLAAALIVLTESGRSAHQVARYRPRAPIAVTRNPOTARQAHLYRGIFPVLCQDPVQEAWA
 EDVQLRVNFAMNVGKARGFFKKGDVAVVLTGWRPGSGFTNIMRVVPV*WTFEQLDPLSLHPLPPALPLQQQL*
 >P00747|PLG Plazminojen
 MEHKEVWLLLLFLKSGQGEPLDDYVNTQGASLFSVTKKQLGAGSIEECAAKCEEDEEFTCRAFYHSKEQCCQVMAENRKSSIIIRMRODVLFKEK
 KVYLSECKTGNKKNYRGTMSTKNGITQQWWSSTSPHRPRFSPATHPSEGLEENYCRNPNDPQGPWCYTITDPEKRYDYCDILECEEEQMHHC
 SGENYDGIKISKTMSGLECCAWDSQSPHAGYIPSKFPNKLKNYCRNPDRRLRPWCFTTDPNKRWELCDIPRCTTTPPSSSGPTYOCLKGTGE
 NYRGNVAVTVSGHTCOHWSAQTPHTNRTPENFPCKILDENYCRNPDGKRAPWCHITNSQVRWEYCKIPSCDSSPVSTEQLAPTAPPELTPV
 VQDCYHGDGOSYRGTSSTTTTGKCCQSWSSMTPHRHOKTPENYPNAGLTNNYCRNPADKGPWCFTTDPSPVRWEYCNLKKCSGTEASVAP
 PPVILLPDVETPSEEDCMFGNGKGYRGKRATTVTGTPCQDWAAGEPHRHSIFTETNPRAGLEKNYCRNPDGDVGGPWCTYTTNPRKLYDYCD
 VPQCAAPSFDCGKQVPEKKCPGRVWGGCVAPHSPWQVSLRTFRGMMFCGGTLISPEWVLTAACHLEKSPRPSSYKVILGAHQEYNLEPHV
 QEIVSRLEFLEPTRKCIALLKLSAPAVITDKVIPACLPSPNYVWADRTCEFTGWGETQGTFGAGLLKEAQLPVENKVCNRYEFLNGRVOSTELCAG
 HLAGGTDSCQSDSGGPLVCFEKDKYLOGVTSWGLGCARPKNKPGYVVRVSRFTWIEGVARNNLDGKQSDALITWVG*

Şekil 18d

>P010111SERPINA3 Alfa-1 -antukimotripsin
 MERNLPLALLGLAAGFCPAVLCHFNPSPLDEENLTQENQDRGTHVLDGLASAVDFAFSLYKQLYLKAPDKNVIFSPLSISTALAFLSLGAHNTLT
 EILKGLKFNLTETSEAEIHQSFOHLLRTLNOSSOELQLSMGNAMFVKEQLSLDRFTEDAKRLYGSEAFATDFQDSAAAKKLINDVYKNGTRGKITD
 LKLDLSQTNMMLVNYIFFKAKWEMPFDPDQTHQSRYLSKKWVMVPMMSLHLLTIPYRDEELSCVTWELKYTGNASALFILPDDKMEVEEA
 MLIFETLKRWDRSLEFREIGELYLPKFSISROYNLNLLQIGIEEAFTSKADLSGTTGARNLAVSQVWHKAVLDVFEEGTEASAATAVKITLLSALVE
 TRTVRFNRPFLLMIIVPTDTQNIFFMSKVTPNPKQA*SLPSSSGLSKELQMDAQCLQVYKQPPQCAFSGHOMQCPVCLSLDGOSLOSLSM#K
 GPATLQVKGWAS*
 >P02767JTF Serotransferin
 MRLAVGALLVCAYLGLCLAVPDKTVRWCAVSEHEATKQCFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDQIRAIANEADAVTLDAGLVYDAYLAPNN
 LKPVVAEFGSKEDPQTFYYAVAVAKDSGFQINQLRGKKSCHTGLGRSAGWNPIGLLYCDLPEPRKPLEKAYANFFSGSCAPCADGTDFFQL
 CQLCPGGCSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNTKPYDEYKDCCHLAQVPSHTVVARSMGGKEDLIW
 ELLNQAOEHFGKDKSKEFQLFSSPHGKDILLFKDSAHGELKVPPRMIDAKMYLGYEYVTAIENLREGTQPEAPTDECKPVKWCALSHHERLKODE
 WSVNSVGKIECVSAETTEDCIAKIIANGEADAMSLDGGFYIAGKCGLYPVLAENYKSDNCEDTPEAGYFAVAVKKSASDLTWDNLKGGKKSCH
 TAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRRFDEFFSEGCAPGSKKDSLCKLQMGSGNLCEPNNKEGYGYTGAFRCLEKGDVAFVKHQTVPQNTGG
 KNPDFWAKNLNEKDVELLDGTRKPVVEEYAINCHLARAPNHAWTRKOKEACVHKILRQGGHFGSNVTDGSGNFQLFRSETKDLLFRDDTVCL
 AKLHDRNTYEKYLGEYVKAVGNLRKCSSTSLLEACTFRPP*NLRGPAATIKV#KGTQNIIEFALVSLAQVVCANFVQLISSVLPDVLNKK
 >P01137JTGFB1 Donuşen buyume faktoru beta-1
 MPSSGLRLLPLLLPLWLLVLTGPRPAAGLSTCKTIDMELVKRKRIEARGQILSKLRLASPFSGQEVPPGGLPEAVLALYNSTRDVRAGESAEPEP
 EPEADYYAKEVTRVLNVEETHNEYDKFKGSTHSIYMFNTSELREAVPEP*VLLSRAELRLRLKLVQEHVELYQKYSNNSWRVYLSNRLAPSDSP
 EWLSDVTVGWVROWLSRGGEIEGFRLSAHCSDSRDNTLDVDINGFTTGRRGDLATHGMINRPFLLLMATELERAQHLQSSRRHRAOLDTNYCFS
 STEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAPCCVQALEPLPIVYVYGRKPKVEQLSN
 MIVRSCKCS*GNAPNRPAPAGDAFPHIAUALPAGAV*WDTAPSPFGAPIKMLRQLIHVSGLCAQLQSPSLTFPHKSLSLFLQLLPLVCTPHIP
 GKMQGTSGERYCS*
 >P027S6 TTR Transtretin
 MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPLMVKVLDVARGSPAINVAVHVRKAADDTWEPFASGKTSESGELHGLTTEEFVEGIYKVEIDTK
 SYWKALGISPFHEAEVWFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVWTPNKE*CTSTYPPVDLKDEGWDFFM*

Şekil 18e

Tahminler

106/106	M	nM	Toplam	
M	365	132	447	70.47%
nM	705	1725	2428	71.05%
Toplam	1020	1855	2875	
	TP	TN		70.88%
TP: Gerçek Pozitifler;				
TN: Gerçek Negatifler				
	30,88	92.99%		

Gözlemler

Şekil 19