

ÖZET

NÜKLEOTİDLERİ İÇEREN NÜKLEOZOMLARIN SAPTANMASINA YÖNELİK YÖNTEM

5

Buluş, belirli nükleotidleri içeren mono-nükleozomlar ve oligo-nükleozomlar ve nükleozomların varlığının saptanması ve ölçülmesine yönelik bir yöntem ve hastalığın saptanması ve tanısının konulması için bu tür ölçümlerin kullanımı ile ilgilidir. Buluş ayrıca hastalığın saptanması ve tanısı için nükleozom ilişkili nükleotid biyo-belirteçlerinin tanımlanmasına yönelik bir yöntem ve söz konusu yöntem ile tanımlanan biyo-belirteçler ile ilgilidir.

10

İSTEMLER

1. Kanser, kardiyomiyopati, sistemik lupus eritematozus, kolit, kronik obstrüktif pulmoner bozukluk, Crohn hastalığı ve romatoid artrit tanısının konulmasına yönelik bir sücut sıvısı numunesinde bir biyo-belirteç olarak hücresiz bir nükleozom ile ilişkili bir DNA bazının kullanımı olup, özelliği DNA bazının şunlardan seçilmesidir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin.
2. İstem 1'e göre kullanım olup, özelliği hücresiz nükleozomun bir mono-nükleozom veya bir oligo-nükleozom olmasıdır.
3. İstem 1 veya istem 2'ye göre kullanım olup, özelliği hücresiz bir nükleozom ile ilişkili DNA bazının bir kan numunesinde ölçülmesidir.
4. İstemler 1 ila 3'ten herhangi birine göre kullanım olup, özelliği kanserin mesane, meme, kolon, serviks, özofagus, böbrek, kalın bağırsak, akciğer, ağız boşluğu, yumurtalık, pankreas, prostat, rektum, cilt veya mide kanseri olmasıdır.
5. Bir vücut sıvısı numunesinde hücresiz bir nükleozom ile ilişkili bir DNA bazının varlığının tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları içermesidir:
 - (i) vücut sıvısı numunesinin nükleozomlara bağlanan bir birinci bağlama ajanı ile temas ettirilmesi;
 - (ii) adımda (i) bağlanan nükleozomların DNA bazına bağlanan ikinci bir bağlama ajanı ile temas ettirilmesi ;

(iii) söz konusu ikinci bağlama ajanının vücut sıvısı numunesinde DNA bazına bağlanmasının saptanması veya kantifiye edilmesi; ve

5

(iv) vücut sıvısı numunesinde DNA bazını içeren nükleozomların varlığının bir ölçümü olarak bu tür bağlanma varlığının veya derecesinin kullanılması,

burada DNA bazı şunlardan seçilir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin.

10

6. Bir vücut sıvısı numunesinde hücresiz bir nükleozom ile ilişkili bir DNA bazının varlığının tespit edilmesine yönelik bir yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları içermesidir:

15

(i) vücut sıvısı numunesinin DNA bazına bağlanan bir birinci bağlama ajanı ile temas ettirilmesi;

(ii) adımda (i) bağlanan DNA bazının nükleozomlara bağlanan ikinci bir bağlama ajanı ile temas ettirilmesi;

20

(iii) söz konusu ikinci bağlama ajanının vücut sıvısı numunesinde nükleozomlara bağlanmasının saptanması veya kantifiye edilmesi; ve

(iv) vücut sıvısı numunesinde DNA bazını içeren nükleozomların varlığının bir ölçümü olarak bu tür bağlanma varlığının veya derecesinin kullanılması,

25

burada DNA bazı şunlardan seçilir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin.

30

7. İstem 5 veya istem 6'ya göre bir yöntem olup, özelliği bağlama ajanının bir antikör olmasıdır.

8. İstemler 5 ila 7'den herhangi birine göre bir yöntem olup, özelliği vücut sıvısı numunesinin kan veya serum veya plazma olmasıdır.

35

9. Bir hayvan veya bir insan öznede bir hastalık halinin saptanması veya tanısının konulmasına yönelik *in vitro* bir yöntem olup, özelliği aşağıdaki adımları içermesidir:

5 (i) bir öznenen elde edilen bir vücut sıvısında hücresiz bir nükleozom ile ilişkili bir DNA bazının saptanması veya ölçülmesi; ve

(ii) öznenin hastalık halini tanımlamak üzere saptanan nükleozom ilişkili DNA baz seviyesinin kullanılması,
10 burada DNA bazı şunlardan seçilir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin,
burada hastalık şunlardan seçilir: kanser, kardiyomiyopati, sistemik lupus eritematozus, kolit, kronik obstrüktif pulmoner bozukluk, Crohn hastalığı ve romatoid artrit.

15

TARİFNAME

NÜKLEOTİDLERİ İÇEREN NÜKLEOZOMLARIN SAPTANMASINA YÖNELİK YÖNTEM

5

BULUŞ SAHASI

Buluş, belirli nükleotidleri içeren mono-nükleozomlar ve oligo-nükleozomların varlığının saptanması ve ölçülmesine yönelik bir yöntem ve hastalığın saptanması ve tanısına yönelik olarak bu tür ölçümlerin kullanımı ile ilgilidir. Buluş ayrıca hastalığın saptanması ve tanısına yönelik nükleozom ilişkili nükleotid biyo-işaretçilerin tanımlanmasına yönelik bir yöntem ile ve söz konusu yöntem ile tanımlanan biyo-işaretçiler ile ilgilidir.

15

BULUŞUN ALT YAPISI

İnsan vücudu bir kaç yüz hücre tipi içerir. Bu hücre tiplerinin tümü, aynı genomu ancak vücut içinde oldukça farklı fenotipleri ve farklı fonksiyonları içerir. Bu fenotipik çeşitlilik, farklı hücre tiplerinin genomun diferansiyel ifadesinden kaynaklanır. Diferansiyel gen ifadesinin kontrolü bütünüyle anlaşılmamıştır ancak temel mekanizmalar, kromatini ökromatin veya heterokromatin olarak paketlemenin kontrolünü, nükleozom konumlandırılmasının ve nükleaz erişilebilir yerlerinin kontrolünü, DNA metilasyonu, hidroksimetilasyonu ve diğer modifikasyonlarını ve etrafına DNA sarılan nükleozomların yapısındaki varyasyonları içeren, gen ile ilişkili birbirine bağlı çok sayıda epigenetik sinyal tarafından gen regülasyonunu içerir.

Nükleozom, kromatin yapısının temel birimidir ve (H2A, H2B, H3 ve H4 histonlarının her birinin bir çiftini içeren) sekiz hayli korunmuş çekirdek histonunun bir protein kompleksinden oluşur. Bu kompleksin etrafı, yaklaşık 146 baz-çiftinden oluşan DNA ile

sarılır. Bir başka histon, H1 veya H5, bir bağlayıcı görevi görür ve kromatin kompaksiyonuna dâhil edilir. DNA, sıklıkla "bir ip üzerindeki bilyelere" benzediği söylenen bir yapı içinde birbirini izleyen nükleozomların etrafına sarılır ve bu temel 5 açık veya ökromatin yapıyı oluşturur. Kompakt veya heterokromatinde, bu ip sarılır ve kapalı veya kompleks bir yapıya süper-sarılır (Herranz ve Esteller, 2007).

Nükleozomların yapısı, histon proteinlerinin Post 10 Transkripsiyonel Modifikasyonu (PTM) ile ve varyant histon proteinlerin inklüzyonu ile değişkenlik gösterebilir. Histon proteinlerinin PTM'mi tipik olarak çekirdek histonların kuyruklarında meydana gelir ve yaygın modifikasyonlar lisin kalıntılarının asetilasyonu, metilasyonu veya 15 ubikitinasyonunu ve ayrıca arjinin kalıntılarının metilasyonu ve serin kalıntılarının ve birçoğunun fosforilasyonunu içerir. Histon modifikasyonlarının, gen ifadesinin epigenetik regülasyonuna dâhil edildiği bilinir (Herranz ve Esteller, 2007). Nükleozomun yapısı ayrıca, alternatif histon 20 izoformlarının veya farklı gen veya uç-birleştirme ürünleri olan ve farklı amino asit dizilerine sahip olan varyantların dâhil edilmesi ile de çeşitlilik gösterebilir. Histon varyantları, münferit tiplere ayrılan çok sayıda familyaya sınıflandırılabilir. Çok sayıda histon varyantının nükleotid 25 dizisi bilinir ve örneğin, National Human Genome Research Institute NHGRI Histone DataBase (Mariño-Ramirez, L., Levine, K.M., Morales, M., Zhang, S., Moreland, R.T., Baxevaris, A.D. ve Landsman, D. The Histone Database: an integrated resource for histones and histone fold-containing proteins. Database 30 Vol.2011. (Teslim edilmiştir) ve <http://genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml>), GenBank (NIH genetic sequence) DataBase, EMBL Nucleotide Sequence Database ve DNA Data Bank of Japan (DDBJ) kaynaklarında halka açıktır.

Erişkin insanlarda normal hücre döngüsü, bazı 10^{11} hücrenin günlük olarak hücre bölünmesi ile oluşturulmasını ve benzer sayıdaki hücrenin, ağırlıklı olarak apoptoz ile, ölümünü içerir. Apoptoz prosesi sırasında, kromatin mono-nükleozomlara ve hücrelerden serbest bırakılan oligo-nükleozomlara ayrılır. Normal koşullar altında, sağlıklı öznelerde dolaşımda bulunan nükleozomların seviyelerinin düşük olduğu belirtilir. Yükselmiş düzeyler, çoğu kanseri, oto-immün hastalığı, enflamatuvar rahatsızlığı, inmeyi ve miyokard enfarktüsü içeren çeşitli rahatsızlıkları olan öznelerde bulunur (Holdenreider & Stieber, 2009).

Mono-nükleozomlar ve oligo-nükleozomlar Enzime-Bağlı Bağışıklık Analizi (ELISA) ile saptanabilir ve bir kaç yöntem bildirilmiştir (Salgame et al, 1997; Holdenrieder et al, 2001; van Nieuwenhuijze et al, 2003). Bu analizler tipik olarak, yakalama antikoru olarak bir anti-histon antikoru (örneğin, anti-H2B, anti-H3 veya anti-H1, H2A, H2B, H3 ve H4) ve saptama antikoru olarak bir anti-DNA veya anti-H2A-H2B-DNA kompleks antikoru kullanır. Bu analizler kullanılarak alandaki çalışanlar, serumdaki nükleozom seviyelerinin, aynı hastalardan alınan plazma numunelerindekinden daha yüksek olduğunu (bir büyüklük sırasına kadar) belirtir. Bu PCR aracılığıyla yapılan DNA serum ve plazma ölçümleri için de geçerlidir (Holdenrieder et al, 2005). Bunun nedeni bilinmemektedir ancak yazarlar, bunun pıhtılaşma prosesi sırasında ek DNA salımından kaynaklandığını tahmin eder. Ancak mevcut tekniğin nükleozom ELISA analizlerinin sonuçlarının birbiri ile bağdaşmadığı bulunmuştur. Dahası, serumda veya plazmada dolaşan çoğu DNA'nın mono-nükleozomlar ve oligo-nükleozomlar olarak var olduğunun bildirilmesine rağmen (Holdenrieder et al, 2001), nükleozomların ve DNA'nın serum veya plazma içinde ölçülen düzeyleri iyi uyuşmaz. Gerçek zamanlı PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile ölçüldüğü üzere, dolaşımdaki hücresiz nükleozom düzeyleri ve dolaşımdaki DNA düzeyleri için ELISA sonuçları arasındaki

düzeltilme katsayısının serum içinde $r=0,531$ ve plazma içinde $r=0,350$ olduğu bildirilmiştir (Holdenrieder et al, 2005).

Mevcut nükleozom ELISA yöntemleri hücre kültürü içinde, primer olarak apoptozu saptamak için bir yöntem olarak (Salgame et al, 1997; Holdenrieder et al, 2001; van Nieuwenhuijze et al, 2003), kullanılır ve ayrıca serum ve plazma içinde dolaşan hücre dışı nükleozomların ölçülmesi için de kullanılır (Holdenrieder et al, 2001). Ölen hücreler tarafından dolaşıma salınan hücre dışı serum ve plazma nükleozom düzeyleri, bunların bir potansiyel biyo-belirteç olarak kullanılmasını değerlendirmek için çok sayıda farklı kanser çalışmasında ELISA yöntemleri ile ölçülmüştür (Holdenrieder et al, 2001). Dolaşımdaki ortalama nükleozom düzeylerinin tümünde olmasa da çalışılan çoğu kanserde yüksek olduğu bildirilir. Dolaşımdaki en yüksek nükleozom düzeyleri, akciğer kanseri öznelerinde gözlenmiştir. En düşük düzeyler, sağlıklı öznelerin normal aralığı içinde olan prostat kanserinde gözlenmiştir. Buna rağmen, maligne tümörleri olan hastaların kayda değer şekilde çeşitlilik gösteren serum nükleozom konsantrasyonlarına sahip olduğu bildirilmiştir ve ilerlemiş tümör hastalığı olan bazı hastaların dolaşımdaki, sağlıklı özneler için ölçülen aralık içinde, düşük nükleozom düzeylerine sahip olduğu bulunmuştur (Holdenrieder et al, 2001). Yükselmiş nükleozom düzeylerinin bu ve çeşitli kanser-olmayan nedenlerinden dolayı, dolaşımdaki nükleozom düzeyleri, kanserin bir biyo-belirteci olarak klinik olarak kullanılmaz (Holdenrieder ve Stieber, 2009). Şaşırtıcı şekilde, dolaşımdaki nükleozom seviyeleri mevcut tekniğin bu nükleozom ELISA yöntemleri ile ölçüldüğü üzere düşük veya saptanabilir olmayan birçok kanser öznelerinin aslında dolaşımdaki hücre dışı nükleozomların yüksek seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir. Mevcut tekniğe ait ELISA yöntemleri ile saptanmayan nükleozomları saptayan nükleozomlar için yeni ELISA yöntemleri tasarlanmış ve gösterilmiştir.

Histon PTM'lerinin saptanmasına yönelik ELISA yöntemleri de teknikte bilinir. Serbest histon proteinlerinde (bir nükleozom kompleksinde diğer histon ve DNA'ya bağlı olmayan) PTM saptanmasına yönelik ELISA yöntemleri, hücre lizatlarından 5 genellikle asit ekstraksiyonu yoluyla ekstrakte edilmiş histonlarda PTM'lerin saptanması için kullanılır. Dolaşımdaki hücresiz nükleozomlarda PTM'lerin saptanmasına yönelik bir immüno analiz belirtilmiştir (Bawden et al,2005). Doğrudan mikrotitre gözlemlere kaplanan saflaştırılmış nükleozomlarda histon 10 PTM'lerin ELISA saptanmasına yönelik bir yöntem son zamanda açıklanmıştır (Dai et al, 2011). Bu yöntemde kültürlenmiş hücrelerden alınan kromatin ekstraktlarının parçalanması ile elde edilen nükleozomlar, doğrudan mikrotitre gözlemlerine kaplanır ve anti-PTM antikolları ile reakte edilir. Teknike uzman 15 kişiler için bu yöntemin nispeten saf nükleozom numunelerine gerek duyduğu ve kan, plazma veya serum gibi kompleks biyolojik ortamda histon PTM'lerin doğrudan ölçümü için uygun olmadığı belirgin olacaktır.

20 Belirli bir DNA dizisi ile ilişkili hücresiz nükleozomlarda bir histon PTM'nin (H3K9Me, lisin kalıntısı K9'da histon H3 mono metillenmiş) saptanmasına yönelik modifiye edilmiş bir kromatik immünopresipitasyon (ChIP) yöntemi plazmada belirtilmiştir. Diziye spesifik histon metilasyonunun seviyesinin dolaşımdaki 25 nükleozom konsantrasyonundan bağımsız olduğu belirtilmiştir (Deligezer et al, 2008).

Histon varyantlarının (ayrıca histon izoformları olarak bilinir), gen ifadesinin epigenetik regülatörleri olduğu bilinir 30 (Herranz and Esteller, 2007). Histon varyantları, belirli bir varyantı kodlayan genin nakavt çalışmaları (örneğin RNAi nakavtının kullanılması), kromatin immünopresipitasyonu, amino asitlerin stabil izotip etiketlemesi ve kantitatif kütle spektrometri proteomikleri, immünohistokimya ve Western Blotlama 35 dahil çeşitli teknikler kullanılarak *in vivo* ve *in vitro*

alışılmıştır (Whittle et al, 2008; Boulard et al, 2010; Sporn et al, 2009; Kapoor et al, 2010; Zee et al, 2010; Hua et al, 2008).

- 5 Akciğer kanseri, meme kanseri ve melanom tanısı konulan öznelerden cerrahi veya biyopsi yoluyla çıkarılan doku numunelerinde histon varyantının ifadesinin immünohistokimya çalışmaları belirtilmiştir. Bu immünohistokimya çalışmaları, rezeke edilmiş kanser doku numunelerinde histon macroH2A (mH2A)
- 10 ve H2AZ varyantlarının boyanmasının bu kanserlerde prognostik uygulamaya sahip olabildiğini belirtir (Sporn et al, 2009, Hua et al, 2008, Kapoor et al, 2010). Klinik kullanım için immünohistokimyasal yöntemlerin bir dezavantajı, doku numune koleksiyonunun cerrahi veya biyopsi dahil invazif olmasıdır.
- 15 Imm nohistokimya yöntemlerinin bir diğ r dezavantajı, bunların hastalığın makul bir beklentisinin genellikle bir biyopsi veya doku rezeksiyonu yapılmadan önce mevcut olması gerektiğinden erken tanı veya tarama tanıları için uygun olmamasıdır. Minimal invazif kan ELISA testleri, daha geniş aralıktaki uygulamalar
- 20 için uygundur ve bu dezavantajları ortadan kaldırır ve sağık uzmanı için daha hızlı, daha düşük maliyet ve daha yüksek verimin yanı sıra hasta için tercih edilebilir.

- Ancak hücresiz nükleozomlarda hücresiz histon varyantları, kan
- 25 veya diğ r ortamda ölçülmemiştir. Kanda hücresiz nükleozomlardaki histon varyantlarının varlığı veya yokluğu ile ilgili herhangi bir çalışma belirtilmemiştir. Mevcut durumda intakt hücresiz nükleozomlarda histon varyantlarının saptanması veya ölçümü için herhangi bir yöntem bulunmaz ve ayrıca bu tür
- 30 herhangi bir ölçüm belirtilmemiş veya tasarlanmamıştır.

- Nükleozom pozisyonu ve nükleozom yapısının aracılık ettiğı (kurucu histon protein varyantı ve PTM yapıları bakımından) epigenetik sinyallemeye ek olarak hücrelerdeki gen ifadesinin
- 35 kontrolüne DNA'nın sitozin metilasyon durumu dahil DNA

nükleotidlere yönelik modifikasyonlar aracılık eder. Teknikte bazen DNA'nın 5-metilsitozin oluşturmak üzere sitozin nükleotidlerin 5 pozisyonunda metillenebildiği bilinmektedir. 5-metilsitozin formunda metillenmiş DNA'nın bir sitozin nükleotidinin bir guanin nükleotidine yakın meydana geldiği DNA dizisindeki pozisyonlarda meydana geldiği belirtilir. Bu pozisyonlar, stenografi için "CpG" olarak adlandırılır. CpG pozisyonlarının %70'ten fazlasının omurgalılarda metillendiği belirtilir (Pennings et al, 2005). Yüksek bir oranda CpG alanı içeren genom bölgeleri genellikle "CpG adaları" olarak adlandırılır ve insan gen promotör dizilerinin yaklaşık olarak %60'ı bu tür CpG adaları ile ilişkilidir (Rodriguez-Paredes and Esteller, 2011). Aktif genlerde CpG adaları genellikle hipo metillenir. Gen promotör dizilerinin metilasyonu, stabil gen inaktivasyonu ile ilişkilidir. DNA metilasyonu ayrıca genellikle Alu tekrarlamalı elemanlar ve uzun serpiştirilmiş nükleotid elemanları dahil tekrarlamalı elemanlarda meydana gelir (Herranz and Estellar, 2007; Allen et al, 2004).

20 Kansere DNA metilasyonunun dâhil edilmesi, 1983 kadar erkenden bildirilmiştir (Feinberg ve Vogelstein, 1983). Kansere hücrelerinde gözlenen DNA metilasyon motifleri, sağlıklı hücrelerinkinden farklılık gösterir. Tekrarlı elemanların, özellikle peri-sentromerik alanların etrafındakilerin, sağlıklı hücrelere kıyasla kanserde hipo-metillendiği bildirilir ancak spesifik genlerin promotörlerinin kanserde hiper-metillendiği bildirilir. Bu iki etkinin dengesinin, kanser hücrelerinde global DNA hipo-metilasyonu ile sonuçlandığı bildirilir (Rodriguez-Paredes; Esteller, 2007).

30 Belirli spesifik genlerin hiper-metilasyonu, kanserlerin bir tanısal biyo-belirteci olarak kullanılabilir. Örneğin, Septin 9 geninin hiper-metilasyonunun plazmadan ekstrakte edilen DNA'nın PCR amplifikasyonu ile saptanması için bildirilen bir yöntemin, %10'luk bir yanlış pozitif oranı ile kolon kanserlerinin

%72'sini saptadığı bildirilmiştir (Grutzmann ve ark, 2008). Spesifik genlerin veya lokusların DNA metilasyon durumu genel olarak, 5-metilsitozinin değil ancak sitozinin urasile, dizileme veya diğer araçlar yoluyla saptanabilen bir primer DNA dizisi değişimine yol açan, selektif bisülfid deaminasyonu ile saptanır (Allen et al, 2004).

Küresel DNA hipometilasyonu, kanser hücrelerinin ayırıcı bir özelliğidir (Estellar 2007 and Hervouet et al, 2010). Küresel DNA metilasyonu, immünohistokimya (IHC) teknikleri kullanılarak hücrelerde çalışılabilir. Alternatif olarak DNA, analiz için hücrelerden ekstrakte edilir. Kütle spektrometrisini takiben yüksek performanslı sıvı kromatografisi, ince katman kromatografisi veya sıvı kromatografisi ile analize yönelik olarak tekli nükleotidlerde DNA parçalanması ve metillenmemiş CpG miktarını hesaplamak üzere tritium etiketli S-adenozil metiyonin ile bağlantılı olarak DNA metiltransferazının kullanıldığı tüm CpG alanlarının metilasyonu ile inverse belirleme, klorasetaldehitin kullanıldığı floresan analizleri, en yakın komşu analizi ve restriksiyon sindirimi dahil olmak üzere hücreler veya diğer ortamlardan ekstrakte edilen DNA'da küresel metilasyonun saptanmasına yönelik birkaç yöntem belirtilmiştir. Bu yöntemlerin dezavantajları, bunların yoğun iş gücü gerektirmesi ve/veya büyük miktarlarda iyi kalitede ekstrakte edilmiş DNA'ya gerek duymasıdır (Allen et al 2004). Bisülfid deaminasyonu dahil PCR bazlı yöntemler, büyük DNA miktarlarına yönelik ihtiyacı ortadan kaldırır ancak 5-metilsitozinin toplam genom içeriğinin göstergesi olarak tipik olarak tekrarlamalı diziler olmak üzere spesifik genom bölgelerini çoğaltmalıdır (Allen et al 2004). Küresel DNA metilasyon ölçümüne yönelik bu yöntemler, çeşitli hücreler ve dokulardan ekstrakte edilen DNA'yı çalışmak üzere kullanılmıştır. Çalışanların bazıları, minimal invazif bir şekilde elde edilmesi daha kolay olduğundan tam kanda beyaz kan hücrelerinden ekstrakte edilen DNA ile ilgili çalışma

yapmışlardır (Moore et al, 2008; Ting Hsiung et al, 2007; Mansour et al, 2010). Kütle spektrometrili Sıvı Kromatografisi, küresel DNA metilasyon ölçümü için altın standart olarak düşünülür ancak maliyetlidir ve DNA, analiz öncesinde tekli
5 nükleotid seviyesine parçalanmalıdır (Vasser et al, 2009).

Küresel DNA metilasyonunun tahmin edilmesine yönelik son dönemdeki yöntemler, dokudan ekstrakte edilmiş hidrolize DNA'nın kütle spektrometrisi ile ultra yüksek basınçlı sıvı
10 kromatografisini (Zhang et al, 2011) ve metilasyona spesifik dijital bir dizileme (MSDS) yöntemini (Ogoshi et al 2011) içerir. Küresel DNA metilasyonuna yönelik klasik rekabetçi bir immüno analiz (ve ayrıca küresel 5-hidroksimetilsitozin metilasyonuna yönelik benzer bir analiz) açıklanmıştır. Bu
15 yöntemde hücreler veya dokulardan ekstrakte edilen DNA, bir 5-metillenmiş sitidin konjugatı ile kaplanmış bir mikrotitre gözüne eklenir, bir anti-5-metilsitidin antikoru eklenir ve ekstrakte edilmiş numunede kaplanmış 5-metilsitidin konjugatı ile metillenmiş DNA arasındaki antikor bağlama dağılımı,
20 numunede bulunan küresel DNA metilasyon seviyesini tahmin etmek üzere bilinen standartları ile karşılaştırılır (Cell Biolabs, 2011). Bir diğer immüno analize benzer yöntemde dokulardan veya plazma veya serum numunelerinden ekstrakte edilen DNA, bir mikrotitre gözüne kaplanır ve metillenmiş DNA, bir anti-5-
25 metilsitozin antikor kullanılarak saptanır (Vasser, et al, 2009; Epigentek, 2009). Bu yöntemlerin bir dezavantajı, bunların denatürasyon ve DNA'dan tüm nükleozom ve kromatin yapısının uzaklaştırılması dahil DNA ekstraksiyonunu gerektirmesidir. Bunlar dolayısıyla nükleozom bağlı nükleotidleri ölçemez ve
30 örneğin; bir DNA ekstraksiyona adımı olmaksızın doku lizatı, kan, plazma veya serum gibi biyolojik sıvılarda küresel DNA metilasyonunun doğrudan ölçümü için uygun değildir.

DNA'da sitozin bazlarının 5-hidroksimetil modifikasyonu da
35 belirtilmiştir. 5-hidroksimetilasyonun rolü, henüz iyi

anlaşılamamıştır ancak gen regülasyonuna dahil edildiği görünür (Stroud et al, 2011).

5 Küresel DNA metilasyonunun saptanması için mevcut durumlar, DNA ekstraksiyonunu veya saflaştırmasını içerir ve hızlı, yüksek, verimli, düşük maliyetli, minimal invazif tanısal yöntemler için uygun değildir. Benzer şekilde diğer modifiye edilmiş ve olağan olmayan bazlar (örneğin urasil, inozin, ksantin, hipoksantin) için DNA analizi sadece büyük ölçüde saf veya ekstrakte edilmiş DNA analizi ile araştırılabilir. Bu tür analiz doğrudan doku lizatı, kan, plazma veya serum gibi kompleks biyolojik ortamda gerçekleştirilemez.

15 5-metilsitozin veya diğer herhangi bir belirli nükleotidleri veya modifiye edilmiş nükleotidleri içeren hücresiz nükleozomlar kan veya diğer herhangi bir ortamda ölçülmemiştir. Belirli nükleotidleri içeren hücresiz nükleozomların varlığı veya yokluğu ile ilgili herhangi bir çalışma belirtilmemiştir. Belirli nükleotidleri içeren hücresiz nükleozomlara yönelik analizler önerilmemiş veya tasarlanmamıştır. Mevcut durumda hücresiz nükleozom ilişkili nükleotidlerin saptanması veya ölçümüne yönelik herhangi bir yöntem bulunmaz.

25 Bu noktada ekstraksiyon olmaksızın biyolojik numunelerde örneğin 5-metilsitozin ve 5-hidroksimetilsitozin dahil nükleozom ilişkili nükleotidlerin doğrudan tahmini için basit immüno analiz yöntemleri belirtilir. Şaşırtıcı şekilde nükleozom ilişkili nükleotidlerin, nükleozomların mevcut tekniğin ELISA yöntemleri ile saptanmadığı kan numunelerin saptanabildiği gösterilmiştir.

WO2005/019826, hastalığı tanılamak üzere modifiye edilmiş bir histon proteini ile spesifik olarak bağlanan bir antikör kullanılarak hücresiz nükleozomların analizini açıklar.

WO99/047924, tümör terapisinin etkinliğini belirlemek üzere serumdaki apoptotik ürünlerin ölçümünü açıklar.

WO2005/040814, bir kanser durumunu değerlendirmek üzere histon dizileri içerisinde kalıntıların post-translasyonel modifikasyonlarının ölçümünü açıklar.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

10 Buluşun bir birinci açısına göre kanser, kardiyomiyopati, sistemik lupus eritematozus, kolit, kronik obstrüktif pulmoner bozukluk, Crohn hastalığı ve romatoid artrit tanısına yönelik bir vücut sıvısı numunesinde bir biyo-belirteç olarak hücre-siz bir nükleozom ile ilişkili bir DNA bazının kullanımı sağlanır, 15 burada DNA bazı şunlardan seçilir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin.

Buluşun ikinci açısına göre bir vücut sıvısı numunesinde hücre-siz bir nükleozom ile ilişkili bir DNA bazının varlığının 20 saptanmasına yönelik bir yöntem sağlanır, bu yöntem aşağıdaki adımları içerir:

- (i) vücut sıvısı numunesinin nükleozomlara bağlanan bir birinci bağlama ajanı ile temas ettirilmesi;
 - 25 (ii) adımda (i) bağlanan nükleozomların DNA bazına bağlanan ikinci bir bağlama ajanı ile temas ettirilmesi ;
 - (iii) söz konusu ikinci bağlama ajanının vücut sıvısı numunesinde DNA bazına bağlanmasının saptanması veya kantifiye edilmesi; ve
 - 30 (iv) vücut sıvısı numunesinde DNA bazını içeren nükleozomların varlığının bir ölçümü olarak bu tür bağlanma varlığının veya derecesinin kullanılması,
- burada DNA bazı, aşağıdakilerden seçilir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin.

Buluşun üçüncü bir açısına göre bir vücut sıvı numunesinde hücresiz bir nükleozom ile ilişkili bir DNA bazının varlığının saptanmasına yönelik bir yöntem sağlanır, bu yöntem aşağıdaki adımları içerir:

5

(i) vücut sıvısı numunesinin DNA bazına bağlanan bir birinci bağlama ajanı ile temas ettirilmesi;

(ii) adımda (i) bağlanan DNA bazının nükleozomlara bağlanan ikinci bir bağlama ajanı ile temas ettirilmesi;

10

(iii) söz konusu ikinci bağlama ajanının vücut sıvısı numunesinde nükleozomlara bağlanmasının saptanması veya kantifiye edilmesi; ve

(iv) vücut sıvısı numunesinde DNA bazını içeren nükleozomların varlığının bir ölçümü olarak bu tür bağlanma varlığının veya

15

derecesinin kullanılması,

burada DNA bazı, aşağıdakilerden seçilir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin.

Buluşun ilave bir açısına göre bir hayvan veya bir insan öznede bir hastalık halinin saptanması veya tanı konmasına yönelik *in vitro* bir yöntem sağlanır, bu yöntem aşağıdaki adımları içerir:

20

(i) bir öznenen elde edilen bir vücut sıvısında hücresiz bir nükleozom ile ilişkili bir DNA bazının saptanması veya ölçülmesi; ve

25

(ii) öznenin hastalık halini tanımlamak üzere saptanan nükleozom ilişkili DNA bazının seviyesinin kullanılması,

burada DNA bazı, aşağıdakilerden seçilir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin,

30

burada kanser, şunlardan seçilir: kanser, kardiyomiyopati, sistemik lupus eritematozus, kolit, kronik obstrüktif pulmoner bozukluk, Crohn hastalığı ve romatoid artrit.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

35

Şekil 1.

Buzağı serumunda seyreltilen MCF7 hücrelerinden ekstrakte edilen çapraz bağlı parçalanmış kromatinde hücresiz nükleozomlardaki 5-metilsitozin ile metillenmiş DNA'nın saptanmasına yönelik ELISA doz yanıt eğrisi.

Şekil 2.

Buzağı serumunda seyreltilen A375 hücrelerinden ekstrakte edilen çapraz bağlı parçalanmış kromatinde hücresiz nükleozomlardaki 5-hidroksimetilsitozinin saptanmasına yönelik ELISA doz yanıt eğrisi.

Şekil 3.

Mevcut tekniğin nükleozom ELISA yöntemleri kullanılarak 20 sağlıklı gönüllüden alınan serum ve EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan nükleozom seviyeleri.

Şekil 4.

20 sağlıklı gönüllüden alınan serum ve EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan histon varyantı mH2A1.1'in hücresiz nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 5.

20 sağlıklı gönüllüden alınan serum ve EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan histon varyantı mH2A2'nin hücresiz nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 6.

20 sağlıklı gönüllüden alınan serum ve EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan histon varyantı H2AZ'nin hücresiz nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 7.

20 sağlıklı gönüllüden alınan serum ve EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan histon modifikasyonu P-H2AX(Ser139)'un hücresiz nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 8.

Buluşa ait ELISA kullanılarak 20 sağlıklı gönüllüden alınan serum ve EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan 5-metilsitozin ile metillenmiş DNA'nın hücresiz nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 9.

Buluşa ait ELISA kullanılarak 20 sağlıklı gönüllüden alınan serum numunelerine yönelik saptanan 5-hidroksimetilsitozin ile metillenmiş DNA'nın hücre dışı nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 10.

3 kolon kanserli öznenin alınan EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan histon türleri ve nükleotidlerin hücre dışı nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 11.

13 akciğer kanser öznelerinden alınan EDTA numunelerine yönelik saptanan histon türleri ve nükleotidin hücre dışı nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 12.

2 pankreatik kanser öznelerinden alınan EDTA numunelerine yönelik saptanan histon türleri ve nükleotidlerin hücre dışı nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 13.

1 oral kanser öznelerinden alınan EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan histon türleri ve nükleotidlerin hücre dışı nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 14.

Buluşun ELISA yöntemleri kullanılarak saptanan nükleozom ilişkili 5-metilsitozin aracılığıyla DNA seviyelerinin bir oranı olarak normalleştirilmiş 4 farklı kanser hastalarından alınan EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan histon türleri ve nükleotidlerin hücre dışı nükleozom ilişkili seviyeleri. *Holdenrieder et al 2001 yöntemi ile üretilen sağlıklı gönüllülerden alınan bir numune içeren nükleozomlara yönelik normalleştirilmiş seviyeler, karşılaştırma için gösterilir (mH2A2 ve 5-hidroksimetilsitozin, bu numune için ölçülmemiştir).

Şekil 15.

Buluşun ELISA yöntemi kullanılarak sağlıklı gönüllülerden alınan EDTA plazma, sitrat plazma ve heparin plazma

numunelerinde saptanan 5-metilsitozin (5mc), mH2A1.1, H2AZ ve P-H2AX(Ser139)'un hücre dışı nükleozom ilişkili seviyeleri.

Şekil 16.

5 Buluşun ELISA yöntemi kullanılarak saptanan 3 sağlıklı gönüllüden ve 10 kolon kanseri örneğinden alınan serum numuneleri için saptanan hücre dışı nükleozom ilişkili 5-metilsitozin seviyeleri.

Şekil 17.

10 13 sağlıklı gönüllü ve 55 kanser hastasından alınan EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan hücre dışı nükleozom ilişkili 5-metilsitozin seviyeleri. Sağlıklı numunelerin ortalama değeri artı ortalama bir veya iki standart sapma olarak tanımlanan eşik noktaları gösterilir.

15 Şekil 18.

10 sağlıklı gönüllü ve 61 kanser hastasından alınan EDTA plazma numunelerine yönelik hücre dışı nükleozom ilişkili 5-metilsitozin seviyeleri. Sağlıklı numunelerin ortalama değeri artı ortalama iki standart sapma olarak tanımlanan eşik noktası gösterilir.

Şekil 19.

Artan tümör boyutu, evresi ve hastalığın nodal gelişimi olan akciğer ve kolon kanseri hastalarından alınan EDTA plazma numunelerine yönelik saptanan hücre dışı nükleozom ilişkili 5-metilsitozin seviyeleri.

Şekil 20.

11 sağlıklı örnekte bulunan ortalama oranlara göre ifade edilen ve nükleozom ilişkili 5-metilsitozin (5mc) aracılığıyla DNA seviyelerinin bir oranı olarak normalleştirilmiş 10 farklı kanser hastasından alınan EDTA plazma numunelerine yönelik olarak buluşun ELISA yöntemleri kullanılarak saptanan histon türleri ve nükleotidlerin ortalama hücre dışı nükleozom ilişkili seviyeler.

Şekil 21.

11 sağlıklı öznede bulunan ortalama oranlara göre ifade edilen ve nükleozom ilişkili 5-metilsitozin (5mc) aracılı DNA seviyelerinin bir oranı olarak normalleştirilmiş 2 kardiyomiyopati hastası, 10 sistemik lupus eritematozus (lupus) hastası, 12 ülseratif kolit hastası, 10 kronik obstrüktif pulmoner hastalık (COPD) hastası, 8 Crohn hastalığı hastası ve 10 romatoid artrit (RA) hastasından alınan EDTA plazma numunelerine yönelik buluşun ELISA yöntemleri kullanılarak saptanan histon türleri ve nükleotidlerin ortalama hücre-siz nükleozom ilişkili seviyeler.

BULUŞUN DETAYLI AÇIKLAMASI

Buluşun bir açısına göre kanser, kardiyomiyopati, sistemik lupus eritematozus, kolit, kronik obstrüktif pulmoner bozukluk, Crohn hastalığı ve romatoid artrit tanısına yönelik bir biyo-belirteç olarak hücre-siz bir nükleozom ile ilişkili bir DNA bazının kullanımı sağlanır, burada DNA bazı şunlardan seçilir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin.

Bir düzenlemede nükleozom, bir mono-nükleozom veya oligo-nükleozomdur.

Bahsedilebilen buluşun belirli bir açısına göre hücre-siz bir nükleozom ile ilişkili bir DNA bazının kullanımı sağlanır, burada DNA bazı şunlardan seçilir: kanser tanısına yönelik bir biyo-belirteç olarak 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin.

Bir düzenlemede kanser, bir mesane, meme, kolon, serviks, özofagus, böbrek, kalın bağırsak, akciğer, ağız boşluğu, yumurtalık, pankreas, prostat, rektum, cilt veya mide kanseridir. Bahsedilebilen belirli bir düzenlemede kanser, bir kolon, akciğer, ağız boşluğu veya pankreas kanseridir.

DNA bazları 5-metilsitozin ve 5-hidroksimetilsitozini içeren nükleozomların saptanması ve ölçümü için ELISA testleri geliştirilmiştir. Uygun spesifik bir anti-nükleotid antikoru ile kombinasyon halinde bu analizler için yakalama antikoru olarak bir anti-histon antikoru kullanılmıştır. Analizler, nükleozomları içeren spesifik nükleotidlerin, kanserli öznelerden alınan kan numunelerinde ölçülebildiğini ve invazif olmayan veya minimal invazif biyo-belirteçler olarak kullanım için ayırt edici olduğunu göstermek üzere kullanılmıştır. Hastalıklı öznelerden alınan serum ve plazma numunelerinde saptanan, diğer nükleozom epitoplarının seviyelerine göre, nükleozom ilişkili DNA 5-metilsitozin seviyeleri, sağlıklı öznelerden alınan numunelerde saptananlardan farklıdır. Ek olarak farklı hastalıklardan alınan öznelerden alınan numunelerde nükleozomlarda saptanan nükleotid seviyelerinin paterninin, diferansiyel bir hastalık tanısı mümkün olacak şekilde, özellikle nükleozom ilişkili nükleotid paternleri, farklı histon varyantları ve histon modifikasyonlarını içeren nükleozomlar için belirlenen paternler ile kombinasyon halinde incelendiğinde farklılık gösterdiği bulunmuştur. Teknikte uzman kişiler için farklı veya ek nükleotidleri içeren nükleozomlar için testlerin dahil edilmesinin muhtemelen bu tür paternler kullanılarak diferansiyel tanı ayırımının geliştireceği belirgin olacaktır.

Mevcut tekniğe ait yöntemler kullanılarak sağlıklı öznelerde bulunan nükleozomların seviyelerini araştırmak üzere, 20 sağlıklı öznelerden alınan serum ve plazma numunelerindeki nükleozomlar ölçülmüştür. Mevcut tekniğin her iki yöntemi, sağlıklı öznelerden alınan serum numunelerinde plazma numunelerindekinden daha yüksek sinyaller üretmiştir. Sonuçlar, Şekil 3'te gösterilir. Bu, nükleozom seviyelerinin serumda plazmadan daha yüksek olduğuna dair yayınlanan veriler ile uyumludur (*Holdenrieder et al, 2001).

Buluş yöntemleri kullanılarak sağlıklı öznelerde bulunan nükleozomların seviyelerini araştırmak üzere 20 sağlıklı öznenin serumunda ve sağlıklı bovin serumunda modifiye edilmiş nükleotid 5-metilsitozin içeren nükleozomlar ölçülmüştür. Serum sonuçları 20 sağlıklı öznenin tümünde düşüktür veya saptanamaz niteliktedir. Ayrıca 20 sağlıklı öznenin alınan EDTA plazma numunelerinde modifiye edilmiş nükleotid 5-metilsitozin içeren nükleozomlar ölçülmüştür ve şaşırtıcı şekilde daha yüksek sinyaller gözlenmiştir. Modifiye edilmiş nükleotid 5-metilsitozin içeren hücresiz nükleozomların yüksek seviyeleri, sağlıklı insan EDTA plazmasında mevcut buluş yöntemleri ile saptanmıştır ancak daha düşük seviyeler, Şekil 8'de gösterildiği üzere sağlıklı insan serumunda saptanmıştır. Şekiller 4-9, benzer sonuçların diğer nükleozom yapıları için elde edildiğini gösterir. Bu bulgu, yayınlanan sonuçlar (*Holdenrieder et al, 2001) ve mevcut tekniğin nükleozom ELISA yöntemleri için bulunan sonuçlar için beklenmedik ve farklıdır. Dolayısıyla şaşırtıcı şekilde buluş yöntemleri, serum ve EDTA plazma numunelerinde meydana gelen nispi nükleozom seviyeleri için mevcut teknik yöntemlerine zıt sonuçlar üretir.

Nükleozom yapılarının toplanabilen çeşitli yaygın plazma türlerinin tümünde saptanabilir olup olmadığı araştırılmıştır. Hücresiz nükleozom ilişkili 5-metilsitozinin yüksek seviyelerinin, EDTA plazmasında ve daha az ölçüde sağlıklı öznelerden alınan sitrat plazmasında buluş yöntemi ile saptanabildiği ancak nükleozom ilişkili 5-metilsitozinin, sağlıklı öznelerden alınan çoğu (5'te 3) heparin plazma numunesinde buzağı veya at serum taban değer sinyallerine göre düşük veya saptanamaz olduğu bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 15'te gösterilir. Kısaca açıklamak üzere hücresiz nükleozomlar, buluş yöntemi kullanılarak sağlıklı öznelerden alınan çoğu veya tüm EDTA plazma ve sitrat plazma numunelerinde nispeten yüksek konsantrasyonlarda bulunur, ancak sağlıklı öznelerden alınan

çoğu heparin plazma veya serum numunelerinde düşük seviyededir veya bulunmaz. Bu nedenle numune tipinin kesin seçiminin farklı uygulamalar için kritik olacağı belirgindir.

- 5 Belirli nükleotid yapılarını içeren hücresiz nükleozomların saptanması için numune seçiminin birkaç parametre içerdiği gösterilmiştir. Bunlar, genellikle sağlıklı öznelerden alınan serum ve heparin plazma numunelerinde bulunan hücresiz nükleozomların düşük seviyelerini ancak genellikle sağlıklı
- 10 öznelerden alınan EDTA ve sitrat plazma numunelerinde bulunan daha yüksek seviyeleri, hücresiz nükleozomları içeren serum numunelerinin serumun pıhtıdan ayrılmasından sonra EDTA ilavesi ile stabilize edilmesi gerektiği tavsiyesini (*Holdenreider *et al*, 2001) ve serum numune alma protokolünü içerir. Diğer
- 15 stabilize edici ajanlar (örneğin proteaz inhibitörleri) ayrıca kullanılabilir. Mümkün olduğunda 10mM EDTA eklenmesi ve numune donmasından sonra 1 saatlik damar delinmesinde santrifüj edilen serum numuneleri kullanılmıştır.
- 20 Klinik numuneler için kan numunesi tipi seçimi, belirli test için optimal klinik ayırım temelinde yapılmalıdır. Sağlıklı öznelerin serumunda buluş yöntemi ile tutarlı şekilde düşük nükleozom seviyelerine dair bulgular takip edilerek kanserli öznelerden alınan serum numunelerin nükleotid 5-metilsitozin
- 25 içeren nükleozomlar ölçülmüştür. %100'e kadar klinik duyarlılık, kolon kanseri numuneleri için Şekil 16'da gösterilen şekilde gözlenmiştir.

- Ayrıca çeşitli hastalıkları olan öznelerden alınan EDTA plazma
- 30 numunelerine nükleotidler 5-metilsitozin ve 5-hidroksimetilsitozin içeren hücresiz nükleozomlar ve diğer nükleozom yapılarının nispi seviyeleri ölçülmüştür. Hücresiz nükleozomların seviyeleri, hem sağlıklı öznelerden hem de hastalıklı öznelerden alınan EDTA plazma numunelerinde yüksektir
- 35 ve EDTA plazma numuneleri bu nedenle hastalıklı ve sağlıklı

öznelerin hassas bir ayırıştırıcısı için en iyi numune seçeneği olması muhtemel görünmeyecektir. Ancak farklı nükleotidleri içeren nükleozomların (ve ayrıca diğer nükleozom yapılarının) nispi seviyelerine bakımından dolaşımdaki hücre-siz nükleozomların seviyelerinin ve bilişiminin hastalıklı ve sağlıklı bireyler arasında ve ayrıca farklı hastalıklar arasında değişkenlik gösterdiği gösterilmiştir. Dolayısıyla öncelikle (i) dolaşımdaki nükleozomların yüksek seviyelerinin hem sağlıklı hem de hastalıklı öznelerden alınan tüm veya çoğu EDTA plazma numunesinde bulunduğu ancak bunun tüm kan numune tipleri için geçerli olmadığı ve ayrıca (ii) şaşırtıcı şekilde hastalığın saptanması ve hastalık tipinin ayrımının bununla birlikte, hastalıklı ve sağlıklı öznelerin plazmasında bulunan nükleozom yapılarının nispi türlerinin bir veya daha fazlasının seviyelerine ve yapısal profiline bağlı olarak bu EDTA plazma nükleozomlarının analizi ile yapılabildiği belirtilir.

Sağlıklı öznelerden ve sırasıyla 55 ve 62 kanserli özneden oluşan iki deneydeki çeşitli kanser tiplerine sahip 117 özneden alınan EDTA plazmasındaki hücre-siz nükleozomlar ölçülmüştür. Toplamda %78 (117'den 91'i) kanser numunesi doğru şekilde, sağlıklı özneler için ortalama sonucun eşik değeri + ortalamanın 2 standart sapması kullanılarak nükleozom ilişkili 5-metilsitozin için buluş yöntemi kullanılarak kanser için pozitif olarak tanımlanmıştır.

Bu 2 deneyin birincisinde mide, kalın bağırsak, rektum, akciğer (küçük hücreli karsinom çeşitli küçük hücreli olmayan karsinomlar), meme, yumurtalık, pankreas, prostat, böbrek ve çeşitli oral kanserler (ağız boşluğu, damak, yutak ve gırtlak) gibi kanserli 55 özneden ve 13 sağlıklı özneden alınan EDTA plazmasındaki hücre-siz nükleozomlar ölçülmüştür. Sağlıklı özneler ve kanserli hastalardan alınan 13 numunenin tümü, nükleozomlar için pozitifdir. Ancak kanserli öznelerden alınan numunelerde saptanan seviyeler, sağlıklı öznelerden alınan

numunelerde bulunandan daha yüksektir ve sonuçlar, sağlıklı ve kanserli öznelerin ayırt edilebildiğini göstermiştir. Örneğin nükleozom ilişkili 5-metilsitozin için ortalama $\pm$ ortalamanın 2 standart sapması olarak OD terimleri halinde hesaplanan nöral aralık 0-1.41'dir. Bu eşik değeri kullanıldığında 13 sağlıklı numune negatiftir ve 55 kanser numunesinin 30'u (%55'lik genel klinik duyarlılık) %38 (%8'de 3) mide, %6 (5'te 3) kalın bağırsak, %33 (3'te 1) rektal, %33 (6'da 2) küçük hücreli akciğer, %64 (14'te 9) küçük hücreli olmayan akciğer, %33 (6'da 2) meme, %100 (1'de 1) yumurtalık, %100 (1'de 1) pankreas, %33 (6'da 2) prostat, %100 (1'de 1) böbrek ve %60 (5'te 3) oran kanser numuneleri dahil pozitifdir. Sonuçlar Şekil 17'de gösterilir.

Benzer şekilde nükleozom ilişkili H2AZ analizine yönelik normal aralık 0 - 0.95'tir. 0.95 olan bu eşik değeri kullanıldığında 13 sağlıklı öznenin tümü, yüksek nükleozom H2AZ seviyeleri için negatiftir. Buna karşın, yüksek nükleozom H2AZ seviyelerine yönelik pozitif bir sonuç, %100 (8'de 8) mide, %100 (5'te 5) kalın bağırsak, %67 (3'te 2) rektal, %83 (6'da 5) küçük hücreli akciğer, %79 (14'te 11) küçük hücreli olmayan akciğer, %50 (6'da 3) meme, %100 (1'de 1) yumurtalık, %100 (1'de 1) pankreas, %80 (5'te 4) prostat, %100 (1'de 1) böbrek ve %100 (5'te 5) oran kanser numuneleri dahil %84 (55'te 46) kanser numunesi (%84'lük genel klinik duyarlılık) için bulunmuştur.

Buluşun bir düzenlemesinde bir kontrol numunesi sağlanır ve pozitif veya negatif sonuçlar arasında ayırım yapmak üzere analize yönelik eşik seviyesi, kontrol numunesine yönelik sonuca ilişkin olarak tanımlanır. Bu, kontrol numunesi sonucu seviyesine eşit veya bunun üzerinde veya altında herhangi bir oran olabilir. Bu seviyenin altındaki hasta sonuçlarının, negatif olduğu düşünülür ve bu seviyenin üzerindeki hasta sonuçlarının pozitif olduğu düşünülür. Kararın belirsiz olarak düşünülmesi ve/veya testin tekrarlanması gerektiği eşik

seviyesine çok yakın hasta sonuçlarının bir "gri alan" aralığı olabilir.

5 Nükleozom ilişkili mH2A1.1 analizi için benzer şekilde normal aralık 0 - 0.91'dir. Bu eşik değeri kullanıldığında 13 sağlıklı numune negatiftir ve %64 (55'te 35) kanser numunesi pozitiftir. Nükleozom ilişkili P-H2AX(Ser139) analizi için normal aralık 0 - 1.08'dir. Bu eşik değeri kullanıldığında 13 sağlıklı numunenin tümü negatiftir ve %60 (55'te 33) kanser numunesi pozitiftir. 10 Dolayısıyla bazı nükleozom analizleri, diğerlerinden daha iyi klinik duyarlılık sergiler.

Ek olarak buluşun klinik kullanımını geliştirmek üzere nükleozom yapıların paterninin kullanılması mümkündür. Bu, örneğin 15 nükleozom ilişkili 5-metilsitozin analizinin eşik değerinin 1.01'e kadar olan bir aralık sağlayan ortalama + 1 standart sapmaya düşürülmesi ile yapılabilir. Bu durumda yanlış negatiflerin sayısı, %0 ila %23 (13'te 3) arasındaki sağlıklı özneden alınan numuneler için yanlış pozitif sonuçlarda bir 20 artış pahasına %93 (55'te 51) gelişmiş klinik duyarlılık sağlayan 4'e azaltılır. Sonuçlar Şekil 17'de gösterilir.

5-metilsitozin ilişkili nükleozomlar veya herhangi bir nükleozom için pozitif bulunan numuneler, nükleozom yapı profili için 25 sorgulanabilir. Nükleozom profili, Şekiller 20 ve 21'de gösterildiği üzere sağlıklı ve hastalıklı hastalar arasında ayırım yapmak üzere kullanılabilir burada çeşitli nükleozom yapılarının hastalıklı hastalardaki nispi oranlarının, sağlıklı hastalar ve diğer kanser dışı hastalıkları olan hastalarda 30 bulunanlara göre ifade edilir. Bu, bir test panelinde çoklu nükleozom yapıların araştırılmasının daha iyi klinik ayrımı kolaylaştırabildiğini gösterir.

Benzer şekilde buluşun tanısal spesifikliğı ve/veya duyarlılığı, 35 birden fazla testten elde edilen verilerin oranlar formunda

kombine edilmesi ile arttırılabilir. Örneğin nükleozom ilişkili P-H2AX:5-metilsitozin oranının kullanımı, gerçek pozitif kanser vakalarının saptanmasını tek başına nükleozom ilişkili 5-metilsitozine yönelik %55'ten (55'te 30) sağlıklı öznelerden alınan numunelere yönelik %100 (13'te 13) negatif sonuç sürerken 2 standart sapma eşik seviyesinde %67'ye (55'te 37) arttırır.

Kolon kanserli 3 hasta, akciğer kanseri olan 13 hasta, pankreas kanseri olan 2 hasta ve oral kanseri olan 1 hastadan alınan EDTA plazma numunelerinde iki farklı nükleotid içeren dolaşımdaki hücresiz nükleozomların seviyeleri ölçülmüştür ve bunlar, literatürde açıklanan şekilde hazırlanan sağlıklı öznelerden alınan serum nükleozomların yapay olarak üretilen preparatının yanı sıra 20 sağlıklı öznen kan numunesinde bulunan seviyeler ile karşılaştırılmıştır (*Holdenreider et al, 2001). Ayrıca normalleştirilmiş formda gözlenen seviyeler belirli bir nükleotidi içeren nükleozomların seviyesinin oranı olarak ifade edilmiştir ve bu tür oranlar veya oranların paternlerinin genel olarak her iki kanser tanısı için ve spesifik kanser tiplerinin diferansiyel tanısı için faydalı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca nükleozom ilişkili 5-metilsitozin seviyesinin hastalık ilerlemesi ile değişkenlik gösterip göstermediği araştırılmıştır. 5-metilsitozin içeren hücresiz nükleozomların ortalama seviyesinin, hastalığın ciddiyeti ile arttığı ve hastalığın lenf düğümlerine artan şekilde yayılması ile yükseldiği gözlenmiştir. Bu, saptanan nükleozomların tümör ilişkili olduğuna dair kanıt sağlar.

Ayrıca mevcut tekniğin iki nükleozom ELISA yöntemleri kullanılarak bu 19 kanser numunesinde bulunan nükleozomlar ölçülmüştür. Çalışılan 19 kanser öznesinden çoğunun, mevcut tekniğe ait nükleozom ELISA 1 ve 2 ile belirlendiği üzere düşük EDTA plazma nükleozom seviyelerine sahip olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, mevcut teknik analizlerinin rutin klinik amaçlar için neden kullanılmadığının nedenini gösterir.

Aynı 19 numunede 5-metilsitozin ve 5-hidroksimetilsitozin nükleotidleri içeren nükleozomları ölçmek üzere mevcut buluşun ELISA yöntemleri kullanılmıştır. Şaşırtıcı şekilde 5-metilsitozin içeren yüksek nükleozom seviyeleri, 19 numunenin tümünde saptanabilir. Dolayısıyla bir düzenlemede buluş, mevcut tekniğin nükleozom analizleri ile saptanmayan nükleozomları saptayabilen yeni bir nükleozom ELISA yöntemi sağlar.

10 Ayrıca literatürde açıklanan bir yöntem ile sağlıklı öznelerden üretilen nükleozomların bir numunesinin yanı sıra kanserli öznelerden alınan aynı 19 numunede 3 farklı histon varyantı ve bir histon PTM'si içeren nükleozomların seviyeleri ölçülmüştür (*Holdenrieder et al, 2001). Sağlıklı öznelerden üretilen

15 nükleozomlar ile ve 4 farklı kanser tipine sahip öznelerden alınan biyolojik sıvılarda bulunan çeşitli hücresiz nükleozomların bir paneli olarak, burada açıklanan nükleozom ilişkili nükleotid ölçümleri ile birlikte bu ölçümler kullanılmıştır. Şaşırtıcı şekilde, araştırılan 4 kanser tipinde

20 (akciğer, kolon, pankreas ve oral) bulunan nükleozom paterni, sağlıklı öznelerden üretilen nükleozom numunesinde bulunandan ayırt edilebilirdir. Ayrıca farklı kanser tipleri de öznelerin kanınca saptanabilen hücresiz nükleozomların paternine bağlı olarak birbirinden ayırt edilebilirdir. Dolayısıyla buluşun bir

25 düzenlemesinde bir öznenin sağlık veya hastalık halinin bir göstergesi olarak, farklı DNA bazlarını veya en azından 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozinden seçilen bir veya daha fazla DNA bazının bir kombinasyonunu içeren nükleozomların iki veya daha fazla ölçümü ve bir veya daha fazla histon varyantı

30 ve/veya bir veya daha fazla histon modifikasyonunu ve/veya per se nükleozomların ölçümlerini veya bunların herhangi birinin herhangi bir kombinasyonu veya oranından oluşan farklı nükleozom epitoplarının bir paneline yönelik bir numunenin test edilmesi ile bir hastalığın varlığı, tipi, nüksetmesi veya ciddiyetinin

35 saptanması veya tanı konulmasına yönelik bir yöntem sağlanır.

Benzer şekilde çeşitli kanser ve kanser dışı hastalıkta dolaşımdaki hücresiz nükleozomların nükleotid ve histon yapılarındaki değişkenliği saptamak üzere buluşun ELISA yöntemleri kullanılmıştır ve bunlar sağlıklı öznelerde bulunan nükleozomların yapısı ile karşılaştırılmıştır. Nükleozomların, araştırılan tüm kanser ve kanser dışı hastalıklarda mevcut olduğu bulunmuştur ve sağlıklı öznelerinkinden farklı olan profillere sahip olduğu bulunmuştur.

10

2 kardiyomiyopati hastası, 10 sistemik lupus eritematozus (lupus) hastası, 12 ülseratif kolit hastası, 10 kronik obstrüktif pulmoner hastalık (COPD) hastası, 8 Crohn hastalığı hastası ve 10 romatoid artrit (RA) hastasından alınan EDTA plazma numuneleri çalışılmıştır ve ortalama nükleozom ilişkili 5-metilsitozin seviyesinin bir oranı olarak saptanan çeşitli nükleozom yapılarının seviyeleri normalleştirilmiştir ve sonuçlar 11 sağlıklı öznede bulunanlara göre ifade edilmiştir. Hastalıkların, sağlıklı veya kanserli öznelerinkinden farklı olan nükleozom yapı profilleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla nükleozom yapı profilleri, geniş çeşitlilikte kanser dışı hastalıkta saptama, prognoz tahmini, izleme ve terapötik etkinlik tahmini için tanılayıcı bir araç olarak kullanılabilir. Sonuçlar Şekil 21'de gösterilir.

25

Ayrıca 10 farklı kanser hastalığı olan 55 hastadan alınan EDTA plazma numuneleri için buluşun ELISA yöntemleri kullanılarak saptanan histon tipleri ve nükleotidler bakımından hücresiz nükleozomların yapısındaki çeşitlilik çalışılmıştır. Saptanan çeşitli nükleozom yapılarının seviyeleri, nükleozom ilişkili 5-metilsitozin (5mc) aracılı DNA seviyelerinin bir oranı olarak normalleştirilmiştir ve 11 sağlıklı öznede bulunan ortalama oranlara göre ifade edilmiştir. Kanser hastalıkları, kanser dışı hastalıklar ve sağlıklı özneler arasında değişkenlik gösteren nükleozom yapı profilleri ve tüm öznelerde mevcut olan

35

nükleozomlar bulunmuştur. Dolayısıyla nükleozom yapı profilleri, kanser ve diğer hastalıklarda saptama, prognoz tahmini, izleme ve terapötik etkinlik tahmini için tanılayıcı bir araç olarak kullanılabilir. Sonuçlar Şekil 20 ve 21'de gösterilir.

5

Serum veya plazmada dolaşımdaki çoğu DNA mono-nükleozom ve oligo-nükleozom olarak belirtildiğinde (Holdenrieder *et al*, 2001) teknikte uzman kişiler için mevcut buluş yöntemlerinin ayrıca kan, serum ve plazma dahil doğrudan biyolojik sıvılardaki *per se* hücresiz metillenmiş DNA'yı (örneğin 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin içeren nükleozom ilişkili DNA olarak) saptamak veya ölçmek üzere kullanılabilir. Bu şekilde kullanılan buluş yöntemleri, özellikle DNA ekstraksiyonunun dahil edilmemesi veya gerekli olmaması nedeniyle mevcut tekniğin metillenmiş DNA'sının ölçülmesine yönelik yöntemlere göre basitlik ve hız avantajlarına sahiptir.

10

15

20

25

30

Ayrıca mevcut tarifname yönteminin, nükleozomlar içerisindeki herhangi bir nükleik asit veya DNA bazı veya nükleik asit analogu veya türevini saptamak veya ölçmek üzere kullanılabilirdiği belirgin olacaktır. Bu tür bazlar sınırlama olmaksızın adenin, timin, guanin, sitozin, urasil, inozin, ksantin, hipoksantin, 7,8-dihidro-8-okso-guanin ve bunların herhangi bir türevi veya analogunu içerir. Teknikte uzman kişiler için yaygın bir nükleotidin (örneğin sınırlama olmaksızın, guanin, sitozin, timin veya adenin), tüm veya çoğu nükleozomda meydana geleceği ve yaygın bir nükleotide yönelik bir antikoron kullanıldığı tarifname yönteminin bir numunedeki tüm nükleozomları görsel olarak bağlamak ve saptamak üzere bir yöntem sağlayacağı belirgin olacaktır. Dolayısıyla ayrıca yaygın bir nükleotid içeren nükleozomların tüm veya çoğu nükleozomun saptanmasını sağlayacak bir yol olarak ölçüldüğü *per se* nükleozomların saptanması için yeni bir yöntem açıklanır.

Tarifnemenin ilave bir açısı, yaygın bir nükleotid içeren nükleozomların, tüm veya çoğu nükleozom bağlı DNA'nın saptanmasını sağlayacak bir yol olarak ölçüldüğü tüm nükleozom ilişkili DNA'nın saptanması için yeni bir yöntem sağlar. Ayrıca

5 iki veya daha fazla DNA bazının ölçümü, bu DNA bazlarının nispi DNA içeriğinin bir oranının ölçümü için temel sağlayacaktır. Şekiller 10-14'te numunelerdeki nispi 5-metilsitozin ve 5-hidroksimetilsitozin seviyelerine yönelik bu tür oranlar gösterilir. Veriler, saptanabilir 5-metilsitozin ve 5-

10 hidroksimetilsitozinin nispi seviyelerinin farklı kanser tiplerinde farklılaştığını ve bu tür kanserleri ayırt etmek üzere kullanılabildiğini gösterir. Diğer benzer oranlar da teknikte faydalıdır. Örneğin toplam nükleozom bağlı DNA için bir metrik olarak uygun bir DNA bazını (veya bazlarını) ölçmek üzere mevcut

15 buluş kullanılarak ve bir diğer bazın (örneğin 5-metilsitozin) nispi seviyesi belirlenerek buluş yönteminin, belirli herhangi bir bazı içeren DNA oranını (örneğin bir numunede metillenmiş DNA yüzdesi) saptamak üzere kullanılabildiği belirgin olacaktır. Dolayısıyla mevcut buluş yöntemleri, bir numunede herhangi bir

20 bazın DNA içerik yüzdesinin ölçümü için basit ve hızlı bir yöntem sağlar. Yöntem, örneğin kan numuneleri olmak üzere birçok numunede hızlı ve basit şekilde kullanılabilir. Buluş yöntemleri, örneğin hücrelerden ekstrakte edilen kromatinin parçalanması ile elde edilen numuneler dahil bu tür numunelerin

25 meydana geldiği herhangi bir numunedeki nükleozomlarda bulunan DNA bazlarını saptamak ve ölçmek üzere kullanılabilir. Teknike uzman kişiler için buradaki nükleotid teriminin sınırlama olmaksızın pürinler, pirimidinler veya herhangi bir nükleik asit bazını ve ilişkili şekerler ile veya olmaksızın ve fosforilasyon

30 ile veya olmaksızın benzer molekülleri ve bunların herhangi bir analoğu, türevi veya taklidi dahil içermesi tasarlandığı belirgin olacaktır.

Mevcut buluş yönteminin, belirli nükleotidleri içeren nükleozom ilişkili DNA'nın saptanması ve ölçümü için başarılı bir yöntem

35

olduğu, bu yöntemin ayrıca *per se* nükleozomların saptanması için bir yöntem olarak başarılı şekilde kullanılabildiği ve *per se* nükleozomların saptanması için mevcut teknik yöntemlerinden daha üstün bir yöntem olduğu ve bu yöntemin ayrıca *per se* hücresiz DNA'nın doğrudan saptanması için ve *per se* hücresiz DNA'nın nükleotid bileşimi için bir yöntem olarak başarılı şekilde kullanılabildiği ve nükleozom ilişkili DNA ve bunun nükleotid bileşiminin saptanması için mevcut teknik yöntemlerinden daha üstün bir yöntem olduğu düşünülür. Yöntem, kompleks biyolojik ortam ve sıvılarda kullanım için hızlı, düşük maliyetli ve uygundur. Mevcut buluş yönteminin, nükleozomları ve kanda metillenmiş DNA içeren nükleozomları saptamak üzere kullanılabildiği ve bunun, kanser için bir biyo-belirteç olarak kullanılabildiği gösterilmiştir. Teknikte uzman kişiler için kanser hastalarından alınan kan numunelerinde bulunan bir biyo-belirtecine, kanser ve dolaşımdaki yüksek nükleozomlar ile ilişkili diğer hastalıklar için geniş bir tanı ve hastalık tarama amaçlarına yönelik değere sahip olduğu belirgin olacaktır (Holdenrieder et al, 2001).

Yüksek nükleozom seviyelerinin, buluş yöntemleri kullanılarak sağlıklı öznelerde bulunmadığını doğrulamak üzere 20 sağlıklı özne serumunda ve sağlıklı bovin serumundaki nükleotidler 5-metilsitozin ve 5-hidroksimetilsitozin içeren nükleozomlar ölçülmüştür. Buluşun her iki ELISA testi için dolaşımdaki serum nükleozom sonuçları, 20 sağlıklı öznenin tümü için düşük veya saptanamaz niteliktedir. Ayrıca aynı 20 sağlıklı öznenin alınan, plazma numunelerinde benzer bir test gerçekleştirilmiştir ve şaşırtıcı şekilde daha yüksek sinyaller gözlenmiştir. Bu bulgu beklenmediktir ve mevcut tekniğin nükleozom ELISA yöntemleri için bulunan sonuçlardan oldukça farklıdır.

Buluş, birçok kanser ve kanser dışı hastalıkta test edilmiştir ve test edilen hastalıkların tümünün saptanmasında etkili olduğu bulunmuştur. Bu, mevcut tekniğin nükleozom ELISA testleri ile

saptanamayan prostat kanseri vakalarının saptanmasını içerir (Holdenrieder, 2001). Buluşun, tüm veya çoğu kanserin saptanması için etkili olduğu belirgindir. Teknikte uzman kişiler için buluşun klinik performansının ilave nükleozom yapı testlerinin dahil edilmesi ve mevcut farklı nükleozom yapılarının oranlarının incelenmesi ile daha fazla geliştirilebildiği belirgin olacaktır.

Buluşun bir açısına göre bir numunede nükleotidleri içeren hücresiz nükleozomların saptanması ve ölçülmesine yönelik bir ikili antikor, immünometrik veya sandviç immüno analiz yöntemi sağlanır. Bu açının bir düzenlemesi, aşağıdaki adımları içeren bir immüno analizdir:

(i) nükleozomları içerebilen numunenin bir birinci antikor veya nükleozomlara bağlanan diğer bağlayıcı ile temas ettirilmesi;

(ii) nükleozomlar veya numunenin ikinci bir antikor veya bir nükleotide bağlanan diğer bağlayıcı ile temas ettirilmesi;

(iii) söz konusu ikinci antikor veya diğer bağlayıcının numunedeki bir nükleotide bağlanmasının saptanması ve/veya kantifiye edilmesi; ve

(iv) numunedeki bir nükleozom ilişkili nükleotidin varlığının bir ölçüsü olarak bu tür bağlanmanın varlığının veya derecesinin kullanılması

burada nükleotid şunlardan seçilir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin.

İkinci bir düzenlemeye göre aşağıdaki adımları içeren bir immünometrik immünoanaliz ile bir numunedeki nükleotidleri içeren hücresiz nükleozomların saptanması ve ölçülmesine yönelik bir yöntem sağlanır:

(i) nükleozomları içerebilen içerebilen numunenin bir birinci antikör veya bir nükleotide bağlanan diğer bağlayıcı ile temas ettirilmesi;

(ii) nükleozomlar veya numunenin ikinci bir antikör veya nükleozomlara bağlanan diğer bağlayıcı ile temas ettirilmesi;

(iii) söz konusu ikinci antikör veya diğer bağlayıcının numunedeki nükleozomlara bağlanmasının saptanması ve/veya kantifiye edilmesi; ve

(iv) numunedeki bir nükleozom ilişkili nükleotidin varlığının bir ölçüsü olarak bu tür bağlanmanın varlığının veya derecesinin kullanılması

burada nükleotid şunlardan seçilir: 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozin.

Çeşitli antikörler veya diğer bağlayıcılar, buluşta nükleozomlara bağlanan bir bağlayıcı olarak kullanılabilir. Bunlar, intakt nükleozomlarda meydana gelen ve serbest histonlarda meydana gelmeyen epitoplara (örneğin; bir nükleozomda iki histon arasındaki bağlantı noktasında bulunan bir epitop) bağlanmaya yönelik bağlayıcıları ve ayrıca yaygın nükleozom protein, histon veya nükleik asit epitopları dahil herhangi bir nükleozom bileşenine yönelik bağlayıcıları içerir.

Teknikte uzman kişiler için açıklanan buluş yöntemlerinin örneğin ForteBio Incorporated of USA tarafından piyasaya sürülen tipte etiketsiz analizler ve biyo-belirteç tipi analizleri dahil çeşitli düzenlemeleri içerdiği belirgin olacaktır. İmmüno metrik immüno analizler, analite bağlanmak üzere bir antikör (veya diğer bağlayıcı) içerir. bu şekilde bağlanan analit, orijinal test numunesindeki seviyesi veya konsantrasyonunun doğrudan ölçümü olarak saptanır. Bunun aksine "rekabetçi" immüno analizler genellikle analitin bir kısmını bağlamak üzere antikörün (veya diğer bağlayıcı) çok küçük bir miktarını kullanır ve etiketli bir analit (veya analit analogu) preparatı, bağlı ve serbest analit fraksiyonları (numune analiti ile)

arasında ayırım yapmak üzere kullanılır. Bağlı etiketlenmiş analit miktarı, orijinal numunede analit konsantrasyonunun dolaylı bir ölçümü olarak ölçülür. Bir "rekabetçi" immüno analiz tasarımı varyantında etiketlenmiş bir antikor, katı fazlı bir analit (veya analit analoğu) preparatı ile birlikte kullanılır. Etiketlenmiş antikorun bağlanması, numune analiti ile katı fazlı analit (veya analit analoğu) arasında dağıtılır. Katı fazlı analit (veya analit analoğu) preparatına bağlanan antikor miktarı, numunenin analit konsantrasyonunun dolaylı bir ölçümü olarak kullanılır.

Tarifnemenin ilave bir açısına göre aşağıdaki adımları içeren, etiketsiz bir immünometrik immüno analiz ile bir numunede, bir nükleozom ilişkili nükleotid dahil, bir nükleotidin saptanması ve ölçülmesine yönelik bir yöntem sağlanır:

- (i) numunenin bir antikor veya bir nükleotide bağlanan diğer bağlayıcı ile temas ettirilmesi;
- (ii) söz konusu antikor veya diğer bağlayıcının numunede bir nükleotide bağlanmasının saptanması ve/veya kantifiye edilmesi; ve
- (iii) numunede bir nükleotid varlığının bir ölçümü olarak bu tür bağlanmanın varlığı veya derecesinin kullanılması.

Tarifnemenin ilave bir açısına göre aşağıdaki adımları içeren rekabetçi bir immüno analiz ile bir numunede, bir nükleozom ilişkili nükleotid dahil, bir nükleotidin saptanması ve ölçülmesine yönelik bir yöntem sağlanır:

- (i) numunenin bir antikor veya bir nükleotide bağlanan diğer bağlayıcı ile temas ettirilmesi;
- (ii) söz konusu antikor veya diğer bağlayıcının numunede bir nükleotide bağlanmasının saptanması ve/veya kantifiye edilmesi; and

(iii) numunede bir nükleotid varlığının bir ölçümü olarak bu tür bağlanmanın varlığı veya derecesinin kullanılması.

5 Teknikte uzman kişiler için buluşun bu immüno analiz yöntemlerinin, DNA ekstraksiyonu için herhangi bir gereksinim olmaksızın doğrudan nükleotidleri ve nükleozom ilişkili nükleotidleri ölçtüğü belirgin olacaktır. Bunun aksine mevcut tekniğin nükleotid immüno analiz yöntemleri, bir numuneden DNA ekstraksiyonundan sonra (nükleozom ilişkili olmayan) 10 nükleotidleri saptar. Buluş yöntemleri, kan veya türevleri dahil kompleks biyolojik numunelerde doğrudan ölçümler için hız, basitlik ve uygunluk avantajlarına sahiptir.

15 Buluşun bir düzenlemesine göre aşağıdaki adımlar içeren, bir numunedeki belirli bir nükleotidi içeren hücresiz DNA oranının saptanmasına yönelik bir yöntem sağlanır:

(i) bir numunedeki hücresiz DNA seviyesinin saptanması veya ölçülmesi; 20 (ii) buluşun bir düzenlemesine göre bir nükleozom ilişkili nükleotidin seviyesinin saptanması veya ölçülmesi; ve (iii) nükleotid içeren DNA oranını belirlemek üzere iki ölçümün kullanılması.

25 Buluşun bu açısının bir düzenlemesine göre ilgili numune ve nükleotiddeki hücresiz her iki DNA seviyesi, buluş yöntemi kullanılarak ölçülür. Buluşa göre ilgili nükleotid, metillenmiş bir sitozin nükleotiddir bu nedenle nükleotidi içeren DNA oranı küresel DNA metilasyon ölçümünü sağlar.

30 Öznelerden alınan kanda nükleotidleri içeren nükleozomların saptanması ve ölçümünün, kanserli özneleri tanımlamak ve bunları sağlıklı öznelerden ayırt etmek üzere tanısal bir yöntem olarak kullanılabildiği gösterilmiştir. ayrıca farklı nükleotidler, 35 histon varyantları ve histon PTM'lerinin bir panelini içeren

nükleozom paternlerinin, farklı kanserler arasında ayırım yapmak üzere kullanılabildiği gösterilmiştir. Teknikte uzman kişiler için, bunun öznelerdeki kanseri saptayacak ve kanser pozitif öznelerde kanser tipleri arasında ayırım yapmak üzere

5 kullanılabilen bir kan kanser testi sağladığı belirgin olacaktır. Buluşun ilave bir yönüne göre, burada bir vücut sıvısı içinde hücresiz 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozinden seçilen bir nükleotid içeren nükleozomların varlığını ve/veya düzeyini veya konsantrasyonunu ölçme veya saptama ve saptanan

10 düzeyi bir öznenin, sınırlandırma olmaksızın, bir hastalığın bir klinik tanısını, hastalık tipinin veya alt-tipinin bir ayırıcı tanısını veya bir hastalık prognozunu veya bir hastalık relapsını veya tedavi rejimlerine özne duyarlılığının bir tanısını, içeren hastalık durumunun bir biyo-belirteci olarak

15 kullanma ile bir hastalığın varlığını saptamak veya tanısını koymak için bir yöntem sağlanır. Tanısal testler için kullanılan vücut sıvılarının, sınırlandırma olmaksızın, kanı, serumu, plazmayı, idrarı, beyin-omurilik sıvısını ve diğer sıvıları, içerdiği teknikte uzmanlığı olan kişiler tarafından

20 anlaşılacaktır. Tercih edilen bir uygulamada, örnek olarak seçilen vücut sıvısı, kandır, serumdur veya plazmadır. Bir vücut sıvısı içindeki bir nükleozom ilişkili nükleotidin analiz yanıtı, düzeyi, konsantrasyonu veya miktarı, mutlak terimler veya bağıl terimler hâlinde, örneğin, sınırlandırma olmaksızın,

25 bulunan toplam nükleozom düzeyinin bir oranı olarak veya bir başka nükleotidi veya histonu varyantı veya histon PTM'nin toplam DNA düzeyine oranı olarak ifade edilebilir.

Buluşun bir düzenlemesinde nükleozom ilişkili nükleotid ölçümü,

30 testlerin bir tanısal panelinin bir üyesi veya bir öznenin, sınırlandırma olmaksızın, bir hastalığın bir klinik tanısını, hastalık tipinin veya alt-tipinin bir ayırıcı tanısını veya bir hastalık prognozunu veya bir hastalık relapsını veya tedavi rejimlerine özne duyarlılığının bir tanısını, içeren hastalık

durumunun saptanması veya tanısı için ölçümler olarak kullanılır.

5 Dolaşımdaki hücresiz DNA'nın tümü veya çoğunun, nükleozom ilişkili DNA olarak mevcut olduğu belirtildiğinden teknikte uzman kişiler için hastalık halinin tanısı veya saptanmasının nükleozom ilişkili nükleotidlere yönelik bir immünoanaliz yerine veya buna ek olarak biyolojik bir sıvı içerisinde herhangi bir DNA ekstraksiyon adımı olmaksızın buluşa ait bir doğrudan 10 nükleotid immüno analiz kullanılarak per se nükleotidlerin saptanması veya ölçümü ile gerçekleştirilebildiği belirgin olacaktır. Buluşun ilave bir açısına göre bir vücut sıvısı içerisinde, 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozinden seçilen bir nükleotid varlığının ve/veya seviyesinin veya 15 konsantrasyonunun ölçülmesi veya saptanması yoluyla ve sınırlama olmaksızın bir hastalığının klinik tanısı, hastalık türü veya alt türünün diferansiyel tanısı veya bir hastalık prognozu veya hastalığın nüksetmesi veya tedavi rejimlerine duyarlı öznenin tanısı dahil olmak üzere bir öznenin hastalık halinin bir biyo- 20 belirteci (yalnızca testlerin bir panelinin bir üyesi olarak) saptanmış seviye kullanılarak bir hastalığının varlığının saptanması veya tanı koyulmasına yönelik bir non-ekstraksiyon nükleotid immüno analiz yöntemi sağlanır. Teknikte uzman kişiler tarafından tanı testine yönelik kullanılan vücut sıvılarının 25 sınırlama olmaksızın kan, serum, plazma, ürin, serebrospinal sıvı ve diğer sıvıları içerdiği kabul edilecektir. Tercih edilen bir düzenlemede numune olarak seçilen vücut sıvısı kan, serum veya plazmadır. Bir vücut sıvısı içerisinde bir nükleotidin analiz yanıtı, seviyesi, konsantrasyonu veya miktarı, mevcut 30 toplam nükleozom seviyesinin örneğin sınırlama olmaksızın bir oranı olarak veya bir diğer nükleotid veya histon varyantı veya histon PTM'nin seviyesine veya toplam DNA'nın seviyesine bir oran olarak mutlak terimler veya bağlı terimler hâlinde ifade edilebilir.

Tarifnemenin ilave bir açısına göre aşağıdaki adımları içeren, bir hücrede bir nükleotid içeren nükleozomların varlığının ve/veya seviyesinin saptanması veya ölçülmesine yönelik bir yöntem sağlanır:

5

- (i) bir hücreden kromatin izole etme;
 - (ii) kromatini mono-nükleozomlar ve/veya oligo-nükleozomlar oluşturmak için parçalama; ve
 - (iii) mono-nükleozomlar ve/veya oligo-nükleozomlar içinde
- 10 bir nükleotid varlığını buluşun bir immüno-analiz yöntemi vasıtasıyla saptama veya ölçme.

Kromatinden mono-nükleozomlar ve/veya oligo-nükleozomlar üretmek için yöntemler teknikte iyi bilinir ve enzim

15 sindirilmesini veya sonikasyonu içerir (Dai et al, 2011).

Teknikte uzman kişiler tarafından hücreler veya dokularda nükleozom ilişkili nükleotidlerin saptanmasına yönelik açıklanan yöntemin, IHC dahil mevcut durumda kullanılan yöntemlere göre

20 veya restriksiyon sindirimi ve en yakın komşu analizi ile veya kloroasetaldehit kullanılarak florsan analizleri ile veya metillenmemiş CpG miktarını hesaplamak üzere tritium etiketli S-adenozil metiyonin ile bağlantılı olarak DNA metiltransferazının kullanıldığı tüm CpG alanlarının metilasyonu

25 ile inverse belirleme yoluyla veya kütle spektrometrisini takiben yüksek performanslı sıvı kromatografisi, ince katman kromatografisi veya sıvı kromatografisi yoluyla analiz için tekli nükleotidlerde DNA sindirimi ile hücrelerden ekstrakte edilen DNA'daki nükleotidlerin saptanması avantajlarına sahip

30 olduğu kabul edilecektir. Belirli bir nükleozom ilişkili nükleotidin seviyesi, konsantrasyonu veya miktarı, örneğin mevcut toplam nükleozomun bir oranı olarak veya nükleozomların toplam seviyesine veya bir diğer nükleotid veya histon varyantı veya histon PTM'i içeren nükleozomların seviyesine veya toplam

DNA seviyesine bir oran olarak mutlak terimler veya bağıl terimler hâlinde ifade edilebilir.

5 Teknikte uzman kişilerce buluşun herhangi bir açısına göre antikor, bağlayıcı veya ligand terimlerinin bunlarla sınırlı olmamak üzere belirli moleküller veya varlıklara bağlanabilen herhangi bir bağlayıcıyı içermesi ve bu buluşun yönteminde kullanılabilen herhangi bir bağlayıcıyı içermesinin tasarlandığı belirgin olacaktır. Ayrıca nükleozom teriminin mono-nükleozomlar ve oligo-nükleozomları ve sıvı ortamda analiz edilebilen bu tür herhangi bir kromatik fragmanlarını içermesinin tasarlandığı belirgin olacaktır.

15 Tarifnamenin bir diğer açısına göre, burada tanımlanan yöntemlerin herhangi birine göre kitin kullanıma yönelik talimatlar ile birlikte nükleotid veya bunun bir bileşen parçasına spesifik bir ligand veya bağlayıcı veya nükleozom veya bunun bileşen parçasının yapısal/şekil bakımından taklidini içeren nükleozomların saptanması veya ölçülmesine yönelik bir 20 kit sağlanır.

Tarifnamenin ilave bir açısına göre, burada tanımlanan yöntemlerin herhangi birine göre kitin kullanıma yönelik talimatlar ile birlikte nükleotid veya bunun bir bileşen 25 parçasına spesifik bir ligand veya bağlayıcı içeren bir nükleotid veya nükleotid veya bunun bileşen parçasının yapısal/şekil bakımından taklidini içeren nükleozomların saptanması veya ölçülmesine yönelik bir kit sağlanır.

30 Açıklamanın bir başka yönüne göre, burada hayvanlarda veya insanlarda hastalık durumunu saptamak veya tanısını koymak için bir nükleozom ilişkili nükleotid biyo-belirtecini veya bir nükleotid biyo-belirtecini tanımlamak için aşağıdaki adımları içeren bir yöntem sağlanır:

(i) hastalıklı öznelerin bir vücut sıvısı içinde bir nükleotid içeren hücresiz nükleozomların düzeyini saptama veya ölçme;

5 (ii) kontrol öznelerinin bir vücut sıvısı içindeki bir nükleotid içeren hücresiz nükleozomların düzeyini saptama veya ölçme; ve

(iii) bir nükleotidin bu hastalık için bir biyo-belirteç olarak yararlı olup olmadığını tanımlamak için hastalıklı öznelerde ve kontrol öznelerinde saptanan düzeyler
10 arasındaki farkı kullanma.

Kontrol öznelerinin, örneğin, hastalıksız olduğu bilinen özneleri içerebilen veya (örneğin; ayırıcı tanı araştırması için) farklı bir hastalığı olan özneler olabilen çeşitli
15 temellere göre seçilebileceği teknikte uzmanlığı olan kişiler için aşikâr olacaktır.

Açıklamanın ilave bir yönüne göre, burada bir hastalıklı hayvan veya insan öznenin prognozunu değerlendirmek için bir nükleozom
20 ilişkili biyo-belirteci veya bir nükleotid biyo-belirtecini tanımlamak için aşağıdaki adımları içeren bir yöntem sağlanır:

(i) hastalıklı öznelerin bir vücut sıvı içinde bir nükleotid içeren hücresiz nükleozomların düzeyini saptama
25 veya ölçme; ve

(ii) hastalıklı öznelerin bir vücut sıvısı içinde saptanan bir nükleotid içeren hücresiz nükleozomların düzeyini öznelerin hastalık sonucu ile korele etme.

30 Açıklamanın ilave bir yönüne göre, burada tedaviye ihtiyacı olan bir hastalıklı hayvan veya insan özne için bir tedavi rejiminin seleksiyonu amacıyla kullanılacak olan bir nükleotid biyo-belirtecini tanımlamak için aşağıdaki adımları içeren bir yöntem sağlanır:

(i) hastalıklı öznelerin bir vücut sıvısı içinde bir nükleotid içeren hücresiz nükleozomların düzeyini saptama veya ölçme; ve

5 (ii) hastalıklı öznelerin bir vücut sıvısı içinde saptanan bir nükleotid içeren hücresiz nükleozomların düzeyini bu öznelerde bir tedavi rejiminin gözlenen etkinliği ile korele etme.

10 Açıklamanın ilave bir yönüne göre, burada bir hastalıklı hayvan veya insan öznenin tedavisini görüntülemek için kullanılacak olan bir nükleozom ilişkili biyo-belirteci veya bir nükleotid biyo-belirtecini tanımlamak için aşağıdaki adımları içeren bir yöntem sağlanır:

15 (i) bir hastalıklı öznenin bir vücut sıvısı içinde bir nükleotid içeren hücresiz nükleozomların düzeyini saptama veya ölçme;

(ii) öznenin hastalık progresyonu sırasında bir veya birden fazla zamanda söz konusu saptamayı veya ölçümü tekrar etme; 20 ve

(iii) bir hastalıklı öznenin bir vücut sıvısı içinde saptanan bir nükleotid içeren hücresiz nükleozomların düzeyini öznedeki hastalık progresyonu ile korele etme.

25 Açıklamanın ilave bir yönüne göre; burada, burada tanımlandığı üzere yöntem ile tanımlanan bir biyo-belirteç sağlanır.

İmmünoanaliz yöntemleri ile diğer kısımları içeren bir kompleks parçası olarak oluşturulan bir kısmın varlığının saptanabildiği 30 teknikte bilinir. Teknikte uzman kişilerce bir nükleotidi içeren hücresiz nükleozomların sıvı içerisinde nükleotidin doğrudan immünoanalizini içeren bir prosedür yoluyla, kan, plazma, serum ve ürün dahil biyolojik bir sıvı içerisinde saptanabildiği belirgin olacaktır. Bu prosedürde bir nükleotid üzerinde bulunan 35 bir epitopa yönelik bir antikoru kullanan bir tekli antikor

immünoanalizi veya bir nükleotid üzerinde bulunan iki epitopa yönelik iki antikoru kullanan 2-alanlı immüno analiz, bir nükleozom içerisindeki bir nükleotid varlığını saptamak üzere kullanılır. Dolayısıyla buluşun bir diğer düzenlemesinde bir nükleozom içerisinde bulunan bir nükleotid bir nükleotide yönelik bir immünoanaliz yönteminin kullanımı ile kan, plazma, serum ve ürün dahil biyolojik bir sıvıda doğrudan saptanır.

Dolayısıyla buluşun bir düzenlemesinde 5-metilsitozin veya 5-hidroksimetilsitozinden seçilen bir nükleozom ilişkili nükleotid, nükleotide yönelik bir immünoanaliz kullanılarak kan, plazma, serum ve ürün dahil biyolojik bir sıvıda ön ekstraksiyon olmaksızın doğrudan saptanır.

İlave bir yön, biyo-belirteci spesifik bağlayabilen, ligandlar veya bağlayıcılar, örneğin, doğal oluşumlu veya kimyasal olarak sentezlenmiş bileşikler, sağlar. Bir ligand veya bağlayıcı, biyo-belirteci spesifik bağlayabilen bir peptit, bir antikor veya bunun bir fragmanını veya bir sentetik ligandı, örneğin, bir plastik antikoru veya bir aptameri veya oligonükleotidi, içerebilir. Antikor, biyo-belirteci spesifik bağlayabilen bir monoklonal antikor veya bunun bir fragmanı olabilir. Bir ligand, bir saptanabilir belirteç, örneğin, bir lüminesan, flüoresan, enzim veya radyo-aktif belirteç ile etiketlenebilir; alternatif veya ilave olarak bir ligand, bir afinite etiketi, örneğin, bir biyotin, avidin, streptavidin veya His (örneğin, hekza-His) etiketi, ile etiketlenebilir. Alternatif olarak ligand bağlama, bir etiketsiz teknoloji, örneğin, ForteBio Inc.'in teknolojisi, kullanılarak belirlenebilir.

Açıklamaya göre bir biyo-sensör, biyo-belirtece karşı bir antikoru spesifik bağlayabilen biyo-belirteç veya bunun bir yapısal/şekil taklidini içerebilir. Burada tarif edildiği üzere bir ligand veya mimik içeren bir dizilim de sağlanır.

Açıklama ile ayrıca, biyo-belirteci saptamak ve/veya kantifiye etmek için, burada tarif edildiği üzere, doğal oluşumlu veya kimyasal olarak sentezlenmiş olabilen ve uygun bir şekilde bir peptit, antikör veya bunun fragmanı, aptamer veya oligonükleotid olan, bir veya birden fazla ligandın kullanılması ve açıklamanın bir biyo-sensörünün veya açıklamanın bir diziliminin veya açıklamanın bir kitinin kullanılması da sağlanır. Bu kullanımlarda, saptama ve/veya kantifikasyon, burada tanımlandığı üzere bir biyolojik örnek üzerinde gerçekleştirilebilir.

Tanısal kitler veya görüntüleme kitleri, açıklamanın yöntemlerini gerçekleştirmek için açıklanır. Bu tarz kitler uygun bir şekilde, burada tarif edildiği üzere, opsiyonel olarak kitin kullanılması için talimatlar ile birlikte, biyo-belirtecini saptanması ve/veya kantifikasyonu için bir ligand ve/veya bir biyo-sensör ve/veya bir dizilim içerecektir.

Açıklamanın ilave bir yönü, bir hastalık hâlinin varlığını saptamak için, burada tanımlandığı üzere biyo-belirteçlerin birini veya birden fazlasını saptayabilen ve/veya kantifiye edebilen bir biyo-sensör içeren bir kittir.

Bir hastalığın varlığını saptamak için biyo-belirteçler, bozukluğun progresyonunu geciktiren veya durduran yeni hedeflerin veya ilaç moleküllerinin keşfi için esansiyel hedeflerdir. Biyo-belirtecini düzeyi bozukluğun ve ilaç yanıtının göstergesi olduğundan, biyo-belirteç *in vitro* ve/veya *in vivo* analizlerde yeni terapötik bileşiklerin tanımlanması için yararlıdır. Buluşun biyo-belirteçleri, biyo-belirtecini aktivitesini modüle eden bileşikler için tarama amacıyla yöntemlerde kullanılabilir.

Böylelikle, açıklamanın ilave bir yönünde, burada biyo-belirtecini üretilmesini arttırabilen ve/veya baskılayabilen bir

maddeyi tanımlamak için, burada tarif edildiği üzere, bir peptit, antikor veya bunun fragmanı veya aptamer veya oligonükleotid olabilen bir bağlayıcının veya ligandın kullanılması veya açıklamaya göre bir biyo-sensörün veya
5 açıklamaya göre bir dizilimin veya açıklamaya göre bir kitin kullanılması sağlanır.

Burada ayrıca, bir öznde biyo-belirtecın üretilmesini arttırabilen veya baskılayabilen bir maddeyi tanımlamanın, bir
10 test maddesini bir özne hayvana uygulamayı ve öznden elde edilen bir test örneğinde bulunan biyo-belirtecın düzeyini saptamayı ve/veya kantifiye etmeyi içeren bir yöntem de sağlanır.

"Biyo-belirteç" terimi bir prosesin, olayın veya rahatsızlığın
15 ayırıcı bir biyolojik veya biyolojik olarak türetilmiş indikatörü anlamına gelir. Biyo-belirteçler, tanı yöntemlerinde, örneğin, klinik taramada ve prognoz değerlendirmesinde ve terapinin sonuçlarını görüntülemeye, özel bir terapötik tedaviye yanıt vermesi en olası olan hastaları tanımlamada, ilaç taramada
20 ve geliştirmede, kullanılabilir. Biyo-belirteçler ve bunların kullanımları yeni ilaç tedavilerinin tanımlanması için ve ilaç tedaileri için yeni hedeflerin keşfi için değerlidir.

Burada kullanıldığı şekliyle, "saptama" ve "tanı koyma"
25 terimleri, bir hastalık hâlinin tanımlanmasını, doğrulanmasını ve/veya karakterizasyonunu kapsar. Buluşa göre saptamanın, görüntülemenin veya tanının yöntemleri, bir hastalığın varlığını doğrulamak için, hastalığın gelişmesini başlangıcı ve progresyonu değerlendirme ile görüntülemek için veya hastalığın
30 sağaltılmasını veya regresyonunu değerlendirmek için yararlıdır. Saptamanın, görüntülemenin veya tanının yöntemleri ayrıca, klinik taramanın, prognozun, terapi seçiminin değerlendirilmesi, terapötik, yani ilaç taraması ve ilaç geliştirilmesi için, yararın değerlendirilmesi için yöntemlerde de yararlıdır.

Etkili tanı ve görüntüleme yöntemleri, doğru tanıyı oluşturma, en uygun tedavinin çabuk tanımlanmasına olanak sağlama (böylece, zararlı ilaç yan etkilerine gereksiz maruziyeti azaltma) ve relaps oranlarını düşürme ile, iyileştirilmiş prognoz için potansiyeli olan çok güçlü "hasta çözümleri" sağlar.

Bir düzenlemede söz konusu biyo-belirteçler bir tümörün hücrelerinden salınır. Böylelikle, buluşun ilave bir yönüne göre, burada bir tümör büyümesinin saptanması için (i) bir tümör ile ilişkili olan veya bir tümörün hücrelerinden salınan bir biyolojik örnek içinde bir biyo-belirteci ölçme ve (ii) söz konusu biyo-belirtecin düzeyinin tümörün boyutu, evresi, agresifliği veya disseminasyon ile ilişkili olduğu gösterme adımlarını içeren bir yöntem sağlanır.

Artmış hücre döngüsünün, hücre ölümünün ve apoptozun, hücre dışı nükleozomların artmış dolaşımsal düzeylerine yol açtığı bilinir (Holdenrieder et al, 2001). Dolaşımdaki hücre dışı nükleozomların düzeyi, bir spesifik-olmayan indikatördür ve enflamatuvar hastalıkları, çeşitli benign ve maligne rahatsızlıkları, otoimmün hastalıkları içeren çeşitli rahatsızlıklarda, aynı zamanda travmayı veya iskemiyi takiben gerçekleşir (Holdenrieder et al, 2001). Buluşun, öznelerde dolaşım içinde nükleozomlar bulunmuş olan çeşitli hastalık alanlarında uygulamaya sahip olacağı teknikte uzmanlığı olan kişiler için aşikâr olacaktır. Bunlar, sınırlandırma olmaksızın, travmayı (örneğin; şiddetli yaralanmayı veya cerrahiyi), aşırı egzersizi (örneğin, bir maraton koşmayı), inmeyi ve kalp krizini, sepsisi veya başka ciddi enfeksiyonu veya endometriyozisi, içerir. Kardiyomiyopati, sistemik lupus eritematozus, ülseratif kolit, kronik obstrüktif pulmoner hastalık, Crohn hastalığı ve romatoid artrit dahil bu tür çeşitli hastalıklardaki nükleozom seviyelerini ölçmek veya bunların nükleotid ve histon yapı çeşitliliğini araştırmak üzere buluşun immünoanaliz yöntemi kullanılmıştır ve bunlar sağlıklı

öznelerin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Tüm bu hastalıklarda nükleozomlar saptanabilir ve bunların nispi yapıları (histon ve nükleotid bileşimi bakımından) belirlenebilir. Mevcut buluş yöntemleri, mevcut nükleozom ELISA yöntemlerinden daha geniş bir aralıkta nükleozomları saptayabildiğinden buluş yöntemleri, daha geniş aralıktaki kanser ve kanser dışı hastalık alanlarında uygulamalara sahiptir.

- 10 Buluşun immüno-analizleri, enzim saptama yöntemlerini (örneğin, ELISA) kullanan immünometrik analizleri, flüoresans etiketli immünometrik analizleri, zaman-çözünük flüoresans etiketli immünometrik analizleri, kemilüminesan immünometrik analizleri, immünoturbidimetrik analizleri, partikülat etiketli
- 15 immünometrik analizleri ve immünoradyometrik analizleri ve radyo-aktif, enzim, flüoresan, zaman-çözünük flüoresan ve partikülat etiketleri içeren çeşitli etiket tipleri ile etiketlenmiş antijen veya etiketlenmiş antikor kompetitif immüno-analiz yöntemlerini içeren kompetitif immüno-analiz
- 20 yöntemlerini içerir. Söz konusu immüno-analiz yöntemlerinin tümü teknikte iyi bilinir, bakınız, örneğin, Salgame et al, 1997 ve van Nieuwenhuijze et al, 2003.

- Bir düzenlemede söz konusu biyolojik örnek, bir vücut sıvısı
- 25 içerir. Örneğin, buluşun bir yönteminde test edilebilen biyolojik örnekler, beyin-omurilik sıvısını (BOS), tam kanı, kan serumunu, plazmayı, menstrüal kanı, endometriyal sıvıyı, idrarı, tükürüğü veya başka vücut sıvısını (gaitayı, gözyaşı sıvısını, sinoviyal sıvıyı, balgamı), soluğu, örneğin, yoğunlaşmış soluk
- 30 olarak veya bunlardan bir ekstraktı veya saflaştırmayı veya bunların seyreltmesini içerir. Biyolojik örnekler ayrıca, bir canlı öznenen veya post-mortem alınan numuneleri de içerir. Örnekler alışılabilir bir şekilde hazırlanabilir, örneğin, uygun olduğunda, seyreltilebilir veya konsantre edilebilir ve
- 35 saklanabilir.

Bir düzenlemede buluşun yöntemi, birden fazla kere tekrar edilir. Bu düzenleme, saptama sonuçlarının bir zaman periyodu boyunca görüntülenmesine olanak sunma avantajı sağlar. Bu tarz
5 bir düzenleme, bir hastalık hâlinin tedavisinin etkinliğini görüntüleme veya değerlendirme yararı sağlayacaktır. Buluşun bu tarz görüntüleme yöntemleri, başlangıcı, progresyonu, stabilizasyonu, sağaltmayı, relapsı ve/veya remisyonu görüntülemek için kullanılabilir.

10

Böylelikle, açıklama ayrıca, bu tarz bir hastalığa sahip olma şüphesi olan bir öznde bir hastalık hâli için bir terapinin etkinliğini görüntülemenin, söz konusu öznden alınan bir biyolojik örnekte bulunan biyo-belirteci saptamayı ve/veya
15 kantifiye etmeyi içeren bir yöntem de sağlar. Görüntüleme yöntemlerinde, test örnekleri, iki veya daha fazla kere alınabilir. Yöntem ilaveten, test örneğinde bulunan biyo-belirtecın (biyo-belirteçlerin) düzeyini bir veya birden fazla kontrol (kontroller) ile ve/veya aynı test öznesinden daha
20 erken, örneğin, terapinin başlangıcından önce, alınan ve/veya aynı test öznesinden terapinin daha erken bir evresinde alınan bir veya birden fazla önceki test örneği (örnekleri) ile karşılaştırmayı içerebilir. Yöntem, farklı zamanlarda alınan test örneklerinde biyo-belirtecın (biyo-belirteçlerin)
25 doğasındaki veya miktarındaki bir değişimi saptamayı içerebilir.

Böylelikle, açıklamanın ilave bir yönüne göre, burada bir insan veya hayvan öznde bir hastalık hâli için terapinin etkinliğini görüntülemek amacıyla aşağıdakileri içeren bir yöntem sağlanır:

30

(i) burada tanımlandığı üzere biyo-belirtecın miktarını kantifiye etme; ve

(ii) bir test örneği içindeki söz konusu biyo-belirteci miktarını bir veya birden fazla kontrolde (kontrollerde)

35

ve/veya aynı test öznesinden daha erken bir zamanda alınan

bir veya birden fazla önceki test örneğinde (örneklerinde) bulunan miktarı ile karşılaştırma.

5 Test örneğinde biyo-belirtecın düzeyinde aynı test öznesinden daha erken alınan önceki bir test örneğindeki düzeeye kıyasla bir değışim, söz konusu terapinin bozukluk veya şüphelenilen bozukluk üzerindeki bir yararlı etkisinin, örneğın, stabilizasyonunun veya iyileştirmesinin, göstergesi olabilir. Dahası, tedavi tamamlandığında, buluşun yöntemi, bir hastalığın
10 reküransı için görüntülemek amacıyla periyodik olarak tekrar edilebilir.

Bir terapinin etkinliğini görüntülemek için yöntemler, insan öznelerde ve insan-olmayan öznelerde (hayvan modellerinde) var
15 olan terapilerin ve yeni terapilerin terapötik etkililiğini görüntülemek için kullanılabilir. Bu görüntüleme yöntemleri, yeni ilaç maddeleri ve maddelerin kombinasyonları için taramalara dâhil edilebilir.

20 İlave bir düzenlemede çabuk etki eden terapilerden dolayı daha çabuk değışimlerin görüntülenmesi, saha kısa saatlik veya günlük aralıklarda yürütülebilir.

Açıklamanın ilave bir yönüne göre, burada bir hastalık hâlinin
25 varlığını saptamak için bir biyo-belirteci tanımlamak için bir yöntem sağlanır. Burada kullanıldığı şekliyle, "tanımlama" terimi, biyolojik örnek içinde bulunan biyo-belirtecın varlığını doğrulama anlamına gelir. Bir örnekte bulunan biyo-belirtecın miktarını kantifiye etme, örnek içinde bulunan biyo-belirtecın
30 konsantrasyonunu belirlemeyi içerebilir. Tanımlama ve/veya kantifiye etme, örnek üzerinde doğrudan bunun bir ekstraktı üzerinde veya bunun bir seyreltmesi üzerinde dolaylı olarak gerçekleştirilebilir.

35 Açıklamanın alternatif yönlerinde, biyo-belirtecın varlığı,

biyo-belirtece yanıtta öznenin vücudu tarafından üretilen ve böylelikle bir hastalık hâline sahip olan bir öznenen alınan bir biyolojik örnek içinde bulunan, biyo-belirteci spesifik bağlayabilen antikoru veya bunun fragmanlarını saptama ve/veya
5 kantifiye etme ile değerlendirilir.

Tanımlama ve/veya kantifiye etme, bir hastadan alınan bir biyolojik örnek veya bir biyolojik örneğin bir saflaştırması veya ekstraktı veya bunun bir seyreltmesi içindeki spesifik bir
10 proteinin varlığını ve/veya miktarını tanımlamak için uygun herhangi bir yöntem ile gerçekleştirilebilir. Buluşun yöntemlerinde, kantifiye etme, örnek veya örnekler içinde biyo-belirtecın konsantrasyonunu ölçme ile gerçekleştirilebilir. Buluşun bir yönteminde test edilebilen biyolojik örnekler,
15 burada önceden tanımlananları içerir. Örnekler, alışagelmiş bir şekilde hazırlanabilir, örneğin, uygun olduğunda, seyreltilebilir veya konsantre edilebilir ve saklanabilir.

Biyo-belirteçlerin tanımlanması ve/veya kantifikasyonu, biyo-belirtecın veya bunun bir fragmanının, örneğin, C-ucu kırılması veya N-ucu kırılması olan bir fragmanın saptanması ile gerçekleştirilebilir. Fragmanlar uygun bir şekilde, 4 amino
20 asitten daha büyük uzunluktadır, örneğin, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 veya 20 amino asit uzunluğundadır. Özel olarak, bunun peptitlerinin veya histon kuyruklarının ile ilgili dizinin, histon proteinlerinin özel olarak yararlı fragmanları olduğu bildirilir.

Biyo-belirteç, örneğin, SELDI veya MALDI-TOF ile, doğrudan saptanabilir. Alternatif olarak, biyo-belirteç, biyo-belirteci spesifik olarak bağlayabilen bir ligand veya ligandlar, örneğin, bir antikor veya bunun bir biyo-belirteç-bağlama fragmanı veya başka peptit veya ligand, örneğin, aptamer veya oligonükleotid ile etkileşim yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak saptanabilir.
30 Ligand veya bağlayıcı, bir saptanabilir etikete, örneğin, bir

lümnesan, flüoresan veya radyoaktif etikete ve/veya bir afinite etiketine, sahip olabilir.

Örneğin, saptama ve/veya kantifiye etme, aşağıdakilerden oluşan gruptan seçilen bir veya birden fazla yöntem (yöntemler) ile gerçekleştirilebilir: SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), bir 1-D jel-temelli analiz, a 2-D jel-temelli analiz, Kütle spekt (MS), ters faz (RP) LC, boyut geçirgenliği (jel filtrasyon), iyon değişimi, afinite, HPLC, UPLC ve başka LC veya LC MS-temelli teknik. Uygun LC MS teknikleri, ICAT® (Applied Biosystems, CA, USA) veya iTRAQ® (Applied Biosystems, CA, USA) içerir. Sıvı kromatografi (örneğin, yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) veya düşük basınçlı sıvı kromatografi (LPLC)), ince-tabaka kromatografisi, NMR (nükleer manyetik rezonans) spektroskopisi de kullanılabilir.

Buluşa göre tanı koyma veya görüntüleme yöntemleri, biyo-belirtecin varlığını veya düzeyini saptamak için SELDI TOF veya MALDI TOF ile bir örneği analiz etmeyi içerebilir. Bu yöntemler ayrıca, klinik tarama, prognoz, terapinin sonuçlarını görüntüleme, bir özel terapötik tedaviye yanıt vermesi en olası olan hastaları tanımlamak için, ilaç tarama ve geliştirilmesi ve ilaç tedavisi için yeni hedeflerin tanımlanması için de uygundur.

Analit biyo-belirteçlerini tanımlama ve/veya kantifiye etme, biyo-belirteci spesifik bağlayabilen bir antikoru veya bunun bir fragmanını içeren bir immünolojik yöntem kullanılarak gerçekleştirilebilir. Uygun immünolojik yöntemler, sandviç immüno-analizlerini, örneğin, sandviç ELISA'yı, burada analit biyo-belirteçlerinin saptanması, bir analit biyo-belirteci üzerindeki farklı epitoplara tanıyan iki antikor kullanılarak gerçekleştirilir; radyoimmünoanalizleri (RIA), doğrudan, dolaylı veya kompetitif enzim bağlı bağışıklık analizlerini (ELISA), enzim immüno-analizlerini (EIA), Flüoresans immüno-

analizlerini (FIA), western blotlamayı, immüno-çökeltmeyi ve herhangi bir parçacık-temelli (örneğin, altın, gümüş veya lateks parçacıklar, manyetik parçacıklar veya Q-noktaları kullanılan) immüno-analizi, içerir. İmmünolojik yöntemler, örneğin, mikro-
5 titre plakada veya şerit formatında, gerçekleştirilebilir.

Bir hastalığa spesifik önemli biyo-belirteçlerin tanımlanması, tanısal prosedürlerin veya terapötik rejimlerin entegrasyonu için merkezidir. Kestirimci biyo-belirteçler kullanılarak, uygun
10 tanısal araçlar, örneğin, biyo-sensörler, geliştirilebilir; bu doğrultuda, buluşun yöntemlerinde ve kullanımlarında, tanımlama veya kantifiye etme, bir biyo-sensör, mikro-analitik sistem, mikro-mühendislik uygulanmış sistem, mikro-ayırma sistemi, immüno-kromatografi sistemi veya başka uygun analitik cihazları
15 kullanarak gerçekleştirilebilir. Biyo-sensör, biyo-belirtecini (biyo-belirteçlerin) saptanması için bir immünolojik yöntemi, elektriksel, termal, manyetik, optik (örneğin, hologram) veya akustik teknolojileri içerebilir. Bu tarz biyo-sensörler kullanılarak, biyolojik örneklerde beklenen konsantrasyonlarda
20 bulunan hedef biyo-belirteci (biyo-belirteçleri) saptamak olasıdır.

Burada kullanıldığı şekliyle, "biyo-sensör" terimi, biyo-belirtecini varlığını saptayabilen herhangi bir şey anlamına
25 gelir. Biyo-sensörlerin örnekleri burada tarif edilir.

Açıklamaya göre biyo-sensörler, burada tarif edildiği üzere, biyo-belirteci spesifik bağlayabilen bir ligand bağlayıcı veya ligandlar içerebilir. Bu tarz biyo-sensörler, buluşun bir biyo-
30 belirtecini saptamada ve/veya kantifiye etmede yararlıdır.

Buluşun biyo-belirteci (biyo-belirteçleri), "akıllı" hologramlara dayanan bir biyo-sensör barındıran teknolojiler veya yüksek frekanslı akustik sistemler kullanılarak

saptanabilir, bu tarz sistemler özel olarak, "barkod" veya dizilim konfigürasyonlarına uyumludur.

5 Akıllı hologram sensörlerinde (Smart Holograms Ltd, Cambridge, UK), bir holografik görüntü, biyo-belirteç ile spesifik olarak reaksiyona girmesi için sansibilize edilmiş bir ince polimer film içinde saklanır. Maruziyet ile, biyo-belirteç hologram ile gösterilen görüntüde bir değişime yol açarak, polimer ile reaksiyona girer. Test sonucu okuması, görüntünün optik
10 parlaklığında, görüntüsünde, renginde ve/veya pozisyonunda bir değişim olabilir. Kalitatif veya yarı-kantitatif uygulamalar için, bir sensör hologram, göz ile okunabilir, böylece saptama ekipmanı için ihtiyacı ortadan kaldırır. Bir basit renk sensörü, kantitatif ölçümler gerekli olduğunda, sinyali okumak için
15 kullanılabilir. Örneğin opasitesi veya rengi, sensörün çalışmasına müdahale etmez. Sensörün formatı, bir kaç maddenin eş-zamanlı saptanması için sinyal-çoğaltılmasına olanak sağlar. Geri-dönüşümlü veya geri-dönüşümsüz sensörler, farklı gereklilikleri karşılamak için tasarlanabilir ve söz konusu özel
20 bir biyo-belirtecini sürekli görüntülenmesi elverişlidir.

Uygun bir şekilde, buluşun bir veya birden fazla biyo-belirtecini saptanması için biyo-sensörler, örnek içindeki biyo-belirtecini varlığının veya kantifikasyonunun saptanmasını
25 bir sinyale dönüştürmek için biyo-moleküler tanımayı uygun araçlar ile birleştirir. Biyo-sensörler, örneğin, revirde, 'ayakta tedavi edilen hastalar' departmanında, cerrahide, evde, arazide veya iş-yerinde, "alternatif yer" tanısal testleri için uyarlanabilir.

30

Buluşun bir veya birden fazla biyo-belirtecini saptamak için biyo-sensörler, akustik, plazmon rezonans, holografik, Biyo-Katman İnterferometri (BLI) ve mikro-mühendislik uygulanmış sensörleri içerir. Basılmış tanıma elemanları, ince film
35 transistör teknolojisi, manyetik akustik rezonatör cihazları ve

başka yeni akusto-elektriksel sistemler, buluşun bir veya birden fazla biyo-belirtecinin saptanması için biyo-sensörlerde kullanılabilir.

- 5 Buluşun bir veya birden fazla biyo-belirtecinin tanımlanmasını ve/veya kantifikasyonunu içeren yöntemler, tezgah üstü aygıtlar üzerinde gerçekleştirilebilir veya laboratuvar-dışı bir ortamda, örneğin, hekimin ofisinde veya hastanın baş ucunda, tek kullanımlık, tanısal veya görüntüleme platformlarına dâhil
- 10 edilebilir. Buluşun yöntemlerini gerçekleştirmek için uygun biyo-sensörler, optik veya akustik okuyucuları olan "kredi" kartları içerir. Biyo-sensörler, yorumlama için hekime elektronik olarak aktarılacak olan toplanan verilere olanak vermesi için konfigüre edilebilir ve böylelikle e-tıp için temel
- 15 oluşturabilir.

- Bir hastalık hâlinin varlığının tanısı veya görüntülenmesi için tanısal kitleri burada tarif edilir. Kitler ilave olarak, bir biyo-belirteci tanımlayabilen ve/veya kantifiye edebilen bir
- 20 biyo-sensör içerebilir. Uygun bir şekilde, bir kit aşağıdaki gruptan seçilen bir veya birden fazla bileşen içerebilir: opsiyonel olarak burada tanımlanan yöntemlerin herhangi birine uygun bir şekilde kitin kullanılması için talimatlar ile birlikte, bir biyo-belirtece veya biyo-belirtecin bir
- 25 yapısal/şekil taklidine spesifik bir ligand bağlayıcı veya ligandlar, bir veya birden fazla kontrol, bir veya birden fazla reaktif ve bir veya birden fazla sarf malzemesi.

- Bir hastalık haline yönelik olarak biyo-belirteçlerin
- 30 tanımlanması, tanısal prosedürler ve terapötik rejimlerin entegrasyonuna izin verir. Buluşa ait bir biyo-belirtecin saptanması, klinik denemelerde katılmalarından önce özneleri taramak üzere kullanılabilir. Biyo-belirteçler, terapötik yanıt, yanıt verememe, elverişsiz yan etki profili, ilaç uyumu derecesi
- 35 ve yeterli serum ilaç seviyelerinin elde edilmesinin

belirtilmesi için yollar sağlar. Biyo-belirteçler olumsuz ilaç yanıtı ile ilgili bir uyarı sağlamak üzere kullanılabilir. Yanıt değerlendirmesinin dozajda ince ayar yapmak, bir sinyalde numunedeki biyo-belirteç varlığını veya miktarını en az

5 indirmek kullanılabildiğinden biyo-belirteçler kişiselleştirilmiş terapilerin geliştirilmesinde faydalıdır. Biyo-sensörler, örneğin, revirde, ayakta tedavi edilen hastalar departmanında, cerrahide, evde, arazide veya iş-yerinde, "alternatif yer" tanısal testleri için uyarlanabilir.

10

Buluşun bir veya daha fazla biyo-belirtecini saptamak üzere biyo-sensörler akustik, plazmon rezonans, holografik, Biyo-Katman İnterferometre (BLI) ve mikrotasarlanmış sensörleri içerir. Damgalanmış tanıma elemanları, ince film transistor

15 teknolojisi, manyetik akustik rezonatör cihazları ve diğer yeni akustik-elektrik sistemleri, buluşun bir veya daha fazla biyo-belirtercinin saptanması için biyo-sensörlerde kullanılabilir.

20

Buluşun bir veya daha fazla biyo-belirtecinin tanımlanmasını ve/veya kantifikasyonunu içeren yöntemler, tezgah üstü aletlerde gerçekleştirilebilir veya örneğin hekim ofisinde veya hasta yatağının yanında laboratuvar dışı bir ortamda kullanılabilen tek kullanımlık, tanısal veya gözlemle platformlarına eklenebilir. Buluş yöntemlerinin gerçekleştirilmesi için uygun

25 biyo-sensörler, optik veya akustik okuyucuları olan "kredi" kartlarını içerir. Biyo-sensörler, hekime yorumlaması için elektronik olarak iletilmek üzere verilerin toplanmasına olanak tanımak üzere konfigüre edilir ve dolayısıyla bir e-ilâç için temel oluşturulabilir.

30

Bir hastalık halinin varlığının tanısı ve gözlenmesi için tanı kitleri burada açıklanır. Bir düzenlemede kitler ek olarak bir biyo-belirteci tanımlayabilen ve/veya kantifiye edebilen bir biyo-sensör içerir. Uygun şekilde buluşa göre bir kit, isteğe

35 bağlı olarak burada tanımlanan yöntemlerin herhangi birine göre

kitin kullanımına yönelik talimatlar ile birlikte, aşağıdaki gruptan seçilen bir veya daha fazla bileşen içerebilir: bir ligand bağlayıcı veya biyo-belirteç veya biyo-belirtecini yapısal/şekil bakımından taklidi için spesifik ligandlar, bir veya daha fazla kontrol, bir veya daha fazla kontrol ve bir veya daha fazla sarf malzeme.

Bir hastalık hâli için biyo-belirteçlerin tanımlanması için, tanısal prosedürlerin ve terapötik rejimlerin entegrasyonuna izin verir. Buluşun bir biyo-belirtecini saptanması, bunların klinik çalışmalara katılmasından önce özneleri taramak için kullanılabilir. Biyo-belirteçler, terapötik yanıtı, yanıt vermemeyi, olumlu olmayan yan-etki profilini, tedaviye uyumun derecesi ve yeterli serum ilacı düzeylerinin başarılmasını göstermesi için araçlar sağlar. Biyo-belirteçler, advers ilaç yanıtının uyarısını sağlamak için kullanılabilir. Yanıtın değerlendirilmesi dozaja ince ayar yapmak, reçete edilmiş ilaçların sayısını minimuma indirmek, etkili terapi elde etmede gecikmeyi azaltmak ve advers ilaç reaksiyonlarından kaçınmak için kullanılabilirdiğinden, biyo-belirteçler, kişiselleştirilmiş terapilerin geliştirilmesinde yararlıdır. Böylelikle, buluşun bir biyo-belirtecini görüntüleme ile, hasta bakımı, bozukluk ile belirlenen ihtiyaçları ve hastanın farmakogenomik profilini eşleştirmek için tam olarak uygun hâle getirilebilir, böylelikle biyo-belirteç optimal dozu titre etmek için, bir pozitif terapötik yanıtı tahmin etmek ve şiddetli yan etkilere yönelik yüksek risk altında olan hastaları tanımlamak için kullanılabilir.

Biyo-belirteç-temelli testler, 'yeni' hastaların bir birinci basamak değerlendirmesini sağlar ve güncel ölçümler kullanılarak başarılamayan doğru ve çabuk tanı için objektif ölçümler sağlar.

Dahası, tanısal biyo-belirteç testleri, hafif derecede veya asemptomatik hastalığı olan veya semptomatik hastalık

geliştirmeye yönelik yüksek risk altında olabilen aile üyelerini veya hastaları tanımlamak için yararlıdır. Bu, uygun terapinin başlatılmasına veya önleyici tedbirlere, örneğin, risk faktörlerini yönetmeye, izin verir. Bu yaklaşımların sonuçları iyileştirdiği fark edilir ve bunlar bozukluğun aileni başlangıcını önleyebilir.

Biyo-belirteç görüntüleme yöntemleri, biyo-sensörler ve kitler de, hekimin relapsın bozukluğun ağırlaşmasından kaynaklanıp kaynaklanmadığını belirlemesine olanak sağlaması için, hasta görüntüleme araçları olarak yararlıdır. Farmakolojik tedavinin yetersiz olduğu değerlendirildiğinde, akabinde terapi eski hâline getirilebilir veya değiştirilebilir; uygun olduğunda terapide bir değişim yapılabilir. Biyo-belirteçler, bozukluğun hâline duyarlı olduğundan, bunlar ilaç terapisinin etkisinin bir endikasyonunu sağlar.

Buluş şimdi aşağıdaki sınırlayıcı olmayan örneklerle atfen açıklanacaktır.

ÖRNEK 1

Nükleozomdaki DNA ve proteinlerin, stabilite için çapraz bağlandığı (preparatta bulunan tüm histonların intakt nükleozomlara eklenmesi sağlanarak) MCF7 hücrelerinden ekstrakte edilen kromatinin parçalanması ile üretilen ticari olarak temin edilebilir bir nükleozom preparatı, intakt nükleozomları ve biyotinlenmiş bir monoklonal anti-5-metilsitozin saptama antikoru bağlayan katı fazlı bir anti-histon yakalama antikoru kullanılarak nükleozom ilişkili nükleotid 5-metilsitozin için bir ELISA yöntemi kullanılarak metillenmiş DNA için analiz edilmiştir. Nükleozom numunesi fötal buzağı serumunda seri olarak seyreltilmiştir ve ELISA'da çift kopya halinde test edilmiştir. Saf fötal buzağı serumu ayrıca herhangi bir hücresiz nükleozom içermeyen bir kontrol numunesi olarak ELISA'da

kullanılmıştır. Analiz yöntemi aşağıdaki gibidir: 0.1M fosfat tamponu içerisinde bir anti-histon antikoru solüsyonu, mikrotitre gözlerine (100 µL/göz) eklenmiştir ve gözleri yakalama antikoru ile kaplamak üzere 4°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Fazla anti-histon antikoru bir kaptan diğer kaba aktarılmıştır. Bir bovin serum albumin solüsyonu (20g/L), gözlerle (200 µL/göz) eklenmiştir ve gözlerde fazla protein bağlanma alanlarını bloke etmek üzere oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Fazla bovin serum albumin solüsyonu bir kaptan diğer kaba aktarılmıştır ve gözler, yıkama tamponu (200 µL/göz, %1 Tween 20 içeren 0.05M TRIS/HCl tamponu pH 7.5) ile üç kez yıkanmıştır. Numune (10 µL/göz) ve analiz tamponu (50 µL/göz, %0.9 NaCl, %0.05 sodyum deoksikolat ve %1 Nonidet P40 sübstitüenti içeren 0.05M TRIS/HCl pH 7.5), hafif çalkalama ile oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edilen gözlerle eklenmiştir. Numune ve analiz tamponu karışımı bir kaptan diğer kaba aktarılmıştır ve gözler, yıkama tamponu (200 µL/göz) ile üç kez yıkanmıştır. Bir biyotinlenmiş anti-5-metilsitozin saptama antikoru solüsyonu eklenmiştir (50 µL/göz) ve hafif çalkalama ile oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edilmiştir. Fazla saptama antikoru bir kaptan diğer kaba aktarılmıştır ve gözler yeniden yıkama tamponu (200 µL/göz) ile üç kez yıkanmıştır. Bir streptavidin-bayır turpu peroksidaz konjugatı eklenmiştir (50 µL/göz) ve hafif çalkalama ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Fazla konjugat bir kaptan diğer kaba aktarılmıştır ve gözler yeniden yıkama tamponu (200 µL/göz) ile üç kez yıkanmıştır. Renkli bir substrat solüsyonu (100 µL/göz, 2,2'-Azinobis [3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit]-diamonyum tuzu) eklenmiştir ve hafif çalkalama ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Gözlerin optik yoğunluğu (OD), standart bir mikrotitre plaka okuyucu kullanılarak 405nm'lik bir dalga boyunca ölçülmüştür. Artan nükleozom ilişkili anti-5-metilsitozin konsantrasyonu olan artan renk doz yanıt eğrisi, 5-metilsitozin (fötal buzağı serumu) yokluğunda gözlenen düşük bir arka plan sinyali ile gözlenmiştir. Pozitif ELISA sinyali, ELISA ile saptanan 5-

metilsitozinin (i) yakalama antikoru, numunedeki histonlara bağlandığından ve (ii) saptama antikoru, DNA'nın 5-metilsitozin bileşenine bağlandığından histon proteini ve DNA'yı içeren bir intakt nükleozom içerisine dahil edildiğini gösterir. Sonuçlar 5 Şekil 1'de gösterilir.

ÖRNEK 2

Nükleozomdaki DNA ve proteinlerin, stabilite için çapraz 10 bağlandığı (preparatta bulunan tüm histonların intakt nükleozomlara eklenmesi sağlanarak) A375 hücrelerinden ekstrakte edilen kromatinin parçalanması ile üretilen ticari olarak temin edilebilir bir nükleozom preparatı intakt nükleozomları ve biyotinlenmiş bir monoklonal anti-5-hidroksimetilsitozin 15 saptama antikorumu bağlayan katı fazlı bir anti-histon yakalama antikoru kullanılarak nükleozom ilişkili nükleotid 5-hidroksimetilsitozin için bir ELISA yöntemi kullanılarak 5-hidroksimetilenmiş DNA için analiz edilmiştir. Nükleozom numunesi fötal buzağı serumunda seri olarak seyreltilmiştir ve 20 ELISA'da çift kopya halinde test edilmiştir. Saf fötal buzağı serumu ayrıca herhangi bir hücresiz nükleozom içermeyen bir kontrol numunesi olarak ELISA'da kullanılmıştır. Analiz yöntemi aşağıdaki gibidir: pH 7.4 olan 0.1M fosfat tamponu içerisinde bir anti-histon antikor solüsyonu, mikrotitre gözlerine (100 25 µL/göz) eklenmiştir ve gözleri yakalama antikoru ile kaplamak üzere 4°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Fazla anti-histon antikoru bir kaptan diğer kaba aktarılmıştır. Bir bovin serum albumin solüsyonu (20g/L), gözlerle (200 µL/göz) eklenmiştir ve gözlerde fazla protein bağlanma alanlarını bloke etmek üzere oda 30 sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Fazla bovin serum albumin solüsyonu bir kaptan diğer kaba aktarılmıştır ve gözler, yıkama tamponu (200 µL/göz, %1 Tween 20 içeren 0.05M TRIS/HCl tamponu pH 7.5) ile üç kez yıkanmıştır. Numune (10 µL/göz) ve analiz tamponu (50 µL/göz, %0.9 NaCl, %0.05 sodyum deoksikolat 35 ve %1 Nonidet P40 sübstitüenti içeren 0.05M TRIS/HCl pH 7.5),

hafif çalkalama ile oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edilen gözlemlere eklenmiştir. Numune ve analiz tamponu karışımı bir kaptan diğer kaba aktarılmıştır ve gözler, yıkama tamponu (200 µL/göz) ile üç kez yıkanmıştır. Bir biyotinlenmiş anti-5-hidroksimetilsitozin saptama antikoru solüsyonu eklenmiştir (50 µL/göz) ve hafif çalkalama ile oda sıcaklığında 90 dakika inkübe edilmiştir. Fazla saptama antikoru bir kaptan diğer kaba aktarılmıştır ve gözler yeniden yıkama tamponu (200 µL/göz) ile üç kez yıkanmıştır. Bir streptavidin-bayır turpu peroksidaz konjugatı içeren bir solüsyon eklenmiştir (50 µL/göz) ve hafif çalkalama ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Fazla konjugat bir kaptan diğer kaba aktarılmıştır ve gözler yeniden yıkama tamponu (200 µL/göz) ile üç kez yıkanmıştır. Renkli bir substrat solüsyonu (100 µL/göz, 2,2'-Azinobis [3-
15 etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit]-diamonyum tuzu) eklenmiştir ve hafif çalkalama ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Gözlerin optik yoğunluğu (OD), standart bir mikrotitre plaka okuyucu kullanılarak 405nm'lik bir dalga boyunca ölçülmüştür. Artan nükleozom ilişkili anti-5-
20 hidroksimetilsitozin konsantrasyonu olan artan renk doz yanıt eğrisi, 5-hidroksimetilsitozin (fötal buzağı serumu) yokluğunda gözlenen düşük bir arka plan sinyali ile gözlenmiştir. Pozitif ELISA sinyali, ELISA ile saptanan 5-hidroksimetilsitozinin (i) yakalama antikoru, numunedeki histonlara bağlandığından ve (ii) saptama antikoru, DNA'nın 5-hidroksimetilsitozin bileşenine bağlandığından histon proteini ve DNA'yı içeren bir intakt nükleozom içerisinde dahil edildiğini gösterir. Sonuçlar Şekil 2'de gösterilir.

30 ÖRNEK 3

20 sağlıklı öznenin alınan serum ve plazma kan numunelerinin dolaşımdaki hücresiz nükleozom içeriğini ölçmek üzere mevcut tekniğin iki nükleozom ELISA yöntemi kullanılmıştır. Birinci
35 mevcut ELISA yöntemi (ELISA 1), Roche Cell Death ELISA'dır ve

diğeri (ELISA 2), bir anti-histon yakalama antikoru ve bir anti-histon-DNA kompleksi saptama antikorumu kullanan bir ELISA'dır. Mevcut her iki nükleozom ELISA yöntemi ile saptanan nükleozom seviyeleri, normal plazmada normal serumdakinden daha düşüktür.

5 Nükleozomların serum seviyesine yönelik normal aralık (optik yoğunluk birimleri halinde ifade edilir), ELISA 1 için 0 - 4.3 OD birim ve ELISA 2 için 0 - 1.4 olacak şekilde hesaplanmıştır (ortalama $\pm$ 20 sağlıklı öznenin serum sonuçlarının ortalamasının 2 standart sapması). Plazmaya yönelik ilgili aralıklar 0 - 0.95
10 ve 0 - 0.96'dır. Sonuçlar Şekil 3'te gösterilir.

Ayrıca sağlıklı öznenin alınan aynı 20 numunede 3 nükleozom ilişkili histon varyantı ve bir histon PTM'inin yanı sıra iki nükleozom ilişkili nükleotid içeren nükleozomların seviyeleri
15 ölçülmüştür. Sonuçlar, sağlıklı serum numunelerinin histon varyantları veya PTM veya nükleotidleri içeren nükleozomların düzgün düşük seviyelere sahip olduğunu gösterir. Histon varyantları, PTM veya nükleotidleri içeren nükleozomların serum seviyesine yönelik normal aralıklar (optik yoğunluk olarak ifade
20 edilir) şu şekildedir; (a) mH2A1.1 için 0 - 0.36, (b) mH2A2 için 0.05 - 0.78, (c) H2AZ için 0.11 - 0.58, (d) P-H2AX(Ser139) için 0.06 - 0.61, (e) 5-metilsitozin için 0.06-0.36 ve (f) 5-hidroksimetilsitrosin için 0.03-0.36. Ölçülen EDTA plazma sonuçları, 20 sağlıklı öznenin tümü için daha yüksektir.
25 Sonuçlar Şekiller 4, 5, 6, 7, 8 ve 9'da gösterilir.

ÖRNEK 4

13 sağlıklı öznenin ve mide, kalın bağırsak, rektum, akciğer
30 (küçük hücreli karsinom ve çeşitli küçük hücreli olmayan karsinomlar), meme, yumurtalık, pankreas, prostat, böbrek ve çeşitli oral kanserler (ağız boşluğu, damak, yutak ve gırtlak) kanseri olan 55 öznenin alınan EDTA plazmasında 5-metilsitozin içeren hücresiz nükleozomlar ölçülmüştür. Sağlıklı öznelerden
35 alınan 13 numunenin tümü, bir veya daha fazla hücresiz nükleozom

tipi için pozitiftir. Kanserli öznelerden alınan 55 numunenin tümü, analiz edilen hücretsiz tüm nükleozom tipleri için pozitiftir. Ancak kanserli öznelerden alınan numunelerde saptanan seviyeler, sağlıklı öznelerden alınan numunelerde bulunandan daha yüksektir ve sonuçlar, sağlıklı ve kanserli öznelerin ayırt edilebildiğini göstermiştir. Örneğin, nükleozom ilişkili 5-metilsitozin için ortalama $\pm$ ortalamanın 2 standart sapması olarak OD terimleri halinde hesaplanan normal aralık, 0 - 1.41'dir. Bu eşik değeri kullanıldığında 13 sağlıklı numunenin tümü negatiftir ve 55 kanser numunesinden 30'u, (%38 (8'de 5) mide, %60 (6'te 3) kalın bağırsak, %33 (3'te 1) rektal, %33 (6'da 2) küçük hücreli akciğer, %64 (14'te 9) küçük hücreli olmayan akciğer, %33 (6'da 2) meme, %100 (1'de 1) yumurtalık, %100 (1'de 1) pankreas, %33 (6'da 2) prostat, %100 (1'de 1) böbrek ve %60 (5'te 3) oran kanser numuneleri dahil pozitiftir (%55'lik genel klinik duyarlılık). Sonuçlar Şekil 17'de gösterilir.

Ayrıca aynı numunelerdeki çeşitli diğer nükleozom ilişkili yapıları ölçmek üzere buluş yöntemleri kullanılmıştır. Bu immünoanalizlerin sonuçları, 5-metilsitozin içeren nükleozomların saptanan seviyelerine göre normalleştirilmiş kanser hastalarından alınan numunelerdeki nükleozom yapılarının profilini sağlamak üzere toplanmıştır. Ortaya çıkan profiller, sağlıklı öznelerden alınan numunelerin nükleozom yapısı ile karşılaştırılmıştır. Hücretsiz nükleozomların nükleozom yapı profilinin sağlıklı öznelerinkine göre farklı olduğu bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 20'de gösterilir. Benzer şekilde kanser dışı çeşitli hastalıklardan alınan numuneler için nükleozom yapı profilleri toplanmıştır ve bunlar, kanserli hastalar ve sağlıklı öznelerden alınan numunelerdeki nükleozomların profili ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Şekil 21'de gösterilir.

Daha sonra 10 sağlıklı öznenin ve ayrıca çeşitli kanser tiplerine sahip 62 hastadan alınan numuneler dahil benzer bir diğer deney

gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, birinci deneyinkine benzerdir. Örneğin nükleozom ilişkili 5-metilsitozina yönelik sonuçlar ve ortalama + sağlıklı öznelerle yönelik sonuçların ortalamasının 2 standart sapması eşik değeri kullanıldığında 10 sağlıklı öznenin tümü için negatif sonuçlar elde edilmiştir ve pozitif sonuçlar, 9'da 9 prostat kanser hastası, 5'te 5 cilt kanseri hastası, 8'de 8 özofagus kanseri hastası, 13'te 12 mesane kanser, hastası, 2'de 2 serviks kanseri hastası ve 1'de 1 kolon kanser, hastası, 4'te 4 meme kanseri hastası, 7'de 7 yumurtalık kanseri hastası, 7'de 7 gırtlak kanseri hastası, 3'te 3 akciğer kanseri hastası ve 3'te 3 renal kanser hastası dahil %95 (62'de 61) kanser hastası için elde edilmiştir. Sonuçlar, Şekil 18'de gösterilir. Bu sonuç, özellikle 5-metilsitozin dahil olmak üzere serum nükleotid seviyeleri ve nükleozom ilişkili nükleotid seviyeleri kanser için klinik olarak duyarlı biyo-belirteçlerdir.

ÖRNEK 5

Kolon kanserli 3 özne akciğer kanserli 13 özne, pankreatik kanserli 3 özne, oral kanserli 1 öznenen alınan numunelerin ve Holdenrieder (*Holdenrieder et al, 2001) yöntemine göre sağlıklı öznelerden üretilen bir nükleozom numunesinin dolaşımdaki hücresiz nükleozom içeriğini ölçmek üzere mevcut tekniğin iki nükleozom ELISA yöntemleri kullanılmıştır. Birinci mevcut ELISA yöntemi (ELISA 1) Roche Cell Death ELISA'dır ve diğeri, bir anti-histon yakalama antikoru ve bir anti-histon-DNA kompleksi saptama antikorunu kullanan bir ELISA'dır.

Ayrıca kanserli öznelerden alınan aynı 19 numunede üç varyant histon ve bir histon PTM'nin yanı sıra nükleotidler 5-metilsitozin ve 5-hidroksimetilsitozin içeren nükleozomların seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçlar, mevcut tekniğin ELISA yöntemlerine yönelik düşük nükleozom sonuçları çoğu özne için, özellikle pankreatik ve oral kanseri hastaları için saptanmasına rağmen bu numunelerin çoğunun bir veya daha fazla nükleozom

ilişkili nükleotid veya varyant histon içeren nükleozomların daha yüksek saptanabilir seviyelerine sahip olduğunu gösterir. Kolon kanserli 3 özne, akciğer kanserli 13 özne, pankreatik kanserli 2 özne ve oral kanserli 1 öznenen alınan numuneler için sonuçlar sırasıyla Şekiller 10, 11, 12, ve 13'te gösterilir. Önemli nükleozom ilişkili histon varyant seviyeleri ve histon PTM seviyeleri, 19 kanser numunesinin 16'sında (3 akciğer kanser numunesi dışında hepsinde) saptanmıştır. Ek olarak önemli nükleozom ilişkili 5-hidroksimetilsitozin seviyeleri, 19 kanser numunesinin 12'sinde saptanmıştır. Ayrıca önemli nükleozom ilişkili 5-metilsitozin seviyesi, 19 kanser numunesinin tümünde saptanmıştır.

Ayrıca farklı nükleotid, histon varyantı ve histon PTM seviyelerini içeren nükleozom seviyelerinin paterni, tüm özneler için düzgün değildir ancak test edilen farklı kanserler için farklı paternler gösterir. Aynı veya farklı kanserli öznelerle yönelik sonuçlar arasında karşılaştırmayı kolaylaştırmak üzere nükleozom testlerine yönelik (macroH2A1.1, macroH2A2, H2AZ, P-H2AX(Ser139), 5-metilsitozin, 5-hidroksimetilsitozin içeren nükleozomlar) sonuçlar, 5-metilsitozin içeren nükleozomlar için gözlenen OD sinyalinin bir oranı olarak normalleştirilmiştir. Normalleştirilmiş sonuçlar (birden fazla öznenen alınan numunelerin test edildiği sonuçlarda standart sapmayı gösteren hata çubukları ile), sağlıklı öznelerden üretilen nükleozom numunesine yönelik aynı sonuçların yanı sıra Şekil 14'te her bir kanser için gösterilir (mH2A2 ve 5-hidroksimetilsitozin, bu numune için ölçülmüştür). Şekil 14, araştırılan dört kanserin tümünde farklı normalleştirilmiş nükleotidler, histon varyantları ve PTM içeren nükleozomların dağılım paterninin, sağlıklı öznelerden hazırlanan numunedeki nükleozomların dağılımına göre oldukça önemli derece farklılaştığını gösterir. Örneğin sağlıklı nükleozom numunesinde macroH2A1.1 içeren nükleozomların nispi seviyesi, kanser tüplerinin herhangi birine ait numunede saptanandan farklıdır. Dolayısıyla mevcut buluş,

basit bir kan bazlı tarama testinde kanser saptanması için bir yöntem olarak kullanılabilir. Teknikte uzman kişiler için buluşun, tümör veya diğer hastalık kökenli dolaşımdaki hücresiz nükleozomlar arasında daha fazla veya daha iyi ayırım yapmak üzere diğer ilave nükleotidleri ve/veya histon varyantlarını ve/veya histon modifikasyonlarını içeren nükleozomların test edilmesini içerdiği belirgin olacaktır.

Ayrıca gözlenen nükleozom tiplerinin paterni, farklı kanser tipleri için farklılaşır. Örneğin kolon, pankreatik ve oral kanserli öznelerden alınan numuneler, nükleozom ilişkili H2AZ ve 5-hidroksimetilsitozinin farklı normalleştirilmiş seviyeleri ile ayırt edilebilir. Benzer şekilde oral kanser, varyant macroH2A1.1'i içeren nükleozomların farklı nispi bir seviyesine dayanılarak kolon kanserli öznelerden alınan numunelerden ayırt edilebilen pankreatik kanserli öznelerden alınan numuneler ve diğer üç kanser tipinin herhangi birinden mH2A2 veya P-H2AX(Ser139) içeren her iki nükleozomun farklı normalleştirilmiş seviyelerine sahiptir. Dolayısıyla mevcut buluş, genellikle kanser tanısı koymak üzere ve belirli bir kanser tipini ayırt etmek üzere bir yöntem olarak kullanılabilir. Teknikte uzman kişiler için buluşun, farklı spesifik tümör kökenli veya diğer hastalık kökenli dolaşımdaki hücresiz nükleozomlar arasında daha fazla veya daha iyi ayırım yapmak üzere diğer ilave histon varyantları ve/veya histon modifikasyonları ve/veya nükleotidleri içeren nükleozomların test edilmesini içerdiği belirgin olacaktır.

ÖRNEK 6

3 sağlıklı öznen ve 10 kolon kanserli hastadan alınan serum numunelerinde buluş yöntemi test edilmiştir. Bu numunelerde 5-metilsitozin içeren nükleozomlar ölçülmüştür ve kanser sonuçları, Şekil 16'da gösterildiği üzere sağlıklı özneler için elde edilen sonuçlara göre düzenli şekilde yüksektir.

ÖRNEK 7

5 Akciğer ve kolon kanseri hastalarından alınan insan EDTA plazma numunelerinin nükleozom ilişkili 5-metilsitozin seviyeleri ölçülmüştür. Saptanan seviyeler, hastaların hastalık ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Şekil 19'da gösterilen sonuçlar, nükleozom ilişkili 5-metilsitozin seviyelerinin, boyut, seviye, nodal yayılma bakımından hastalığın ciddiyeti ile arttığını ve 10 nükleozom ilişkili 5-metilsitozin seviyelerinin hastalığın ilerlemesinin göstergeleri olarak tek başına veya tanısal bir panelin parçası olarak kullanılabildiğini gösterir.

REFERANSLAR

15

Allen et al, A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. Nucleic Acids Research: 32(3) e38DOI: 10.1093/nar/gnh032

20

Bawden et al, Detection of histone modification in cell-free nucleosomes. WO 2005/019826, 2005

25

Boulard et al, Histone variant macroH2A1 deletion in mice causes female-specific steatosis. Epigenetics & Chromatin: 3(8), 1-13, 2010 Cell Biolabs, Inc. Product Manual for "Global DNA Methylation ELISA Kit (5'-metil-2'-deoksicytidine Quantitation", 2011

30

Dai et al, Detection of Post-translational Modifications on Native Intact Nucleosomes by ELISA. <http://www.jove.com/details.php?id=2593> doi: 10.3791/2593. J Vis Exp. 50 (2011).

Deligezer et al, Sequence-Specific Histone Methylation Is Detectable on Circulating Nucleosomes in Plasma. Clinical Chemistry 54(7), 1125-1131, 2008

Epigentek Group Inc, Metilamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit, User Guide, Version 2.0802, 2009

Esteller, Cancer epigenomics: DNA metilomes and histone-modification maps Nature Reviews Genetics: 8, 286-298, 2007
Feinberg and Vogelstein, Hypometilation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.

5 Nature: 301, 89-92, 1983

Grutzmann et al, Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Metilation Assay. PLoS ONE 3(11): e3759. doi:10.1371/journal.pone.0003759, 2008

10 Hervouet et al, Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 Interactions Promotes Tumorigenesis from Human and Mice Glial Cells PLoS ONE 5(6): e11333. doi:10.1371/journal.pone.0011333, 2010

Hua et al, Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with meme cancer progression. Molecular Systems Biology 4; Article number 188; doi:10.1038/msb.2008.25, 2008

15 Herranz and Esteller, DNA metilation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. Methods Mol Biol.361:25-62, 2007
Holdenrieder et al, Nucleosomes in serum of patients with
20 benign and malignant diseases. Int. J. Cancer (Pred. Oncol.): 95, 114-120, 2001

*Holdenrieder et al, Nucleosomes in Serum as a Marker for Cell Death. Clin Chem Lab Med; 39(7), 596-605, 2001

25 Holdenrieder et al, Cell-Free DNAin Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR. Clinical Chemistry: 51(8), 1544-1546, 2005

Holdenreider and Stieber, Clinical use of circulating nucleosomes. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences; 46(1): 1-24, 2009

30 Kapoor et al, The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. Nature: 468, 1105-1111, 2010

Mansour et al, The Prognostic Significance of Whole Blood Global and Specific DNA Metilation Levels in Gastric

Adenocarcinoma. PLoS ONE 5(12): e15585.
doi:10.1371/journal.pone.0015585, 2010

Moore et al, Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for
mesane cancer susceptibility in the Spanish Mesane Cancer
Study: a case-control study. The Lancet Oncology: 9(4), 359
- 366, 2008

Ogoshi et al, Genome-wide profiling of DNA methylation in
human cancer cells. Genomics: In Press, 2011

Pennings et al, DNA methylation, nucleosome formation and
positioning. Briefings in functional genomics and
proteomics: 3(4), 351-361, 2005

Rodriguez-Paredes and Esteller, Cancer epigenetics reaches
mainstream oncology. Nature Medicine: 17(3), 330-339, 2011

Salgame et al, An ELISA for detection of apoptosis. Nucleic
Acids Research, 25(3), 680-681, 1997

Sporn et al, Histone macroH2A isoforms predict the risk of
akciğer cancer recurrence. Oncogene: 28(38), 3423-8, 2009

Stroud et al, 5-Hidroksimetilsitozin is associated with
enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells.
Genome Biology: 12:R54, 2011

Tachiwana et al, Structures of human nucleosomes containing
major histone H3 variants. Acta Cryst: D67, 578-583, 2011

Ting Hsiung et al, Global DNA Methylation Level in Whole
Blood as a Biomarker in Head and Neck Squamous Cell
Carcinoma. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention:
16(1), 108-114, 2007

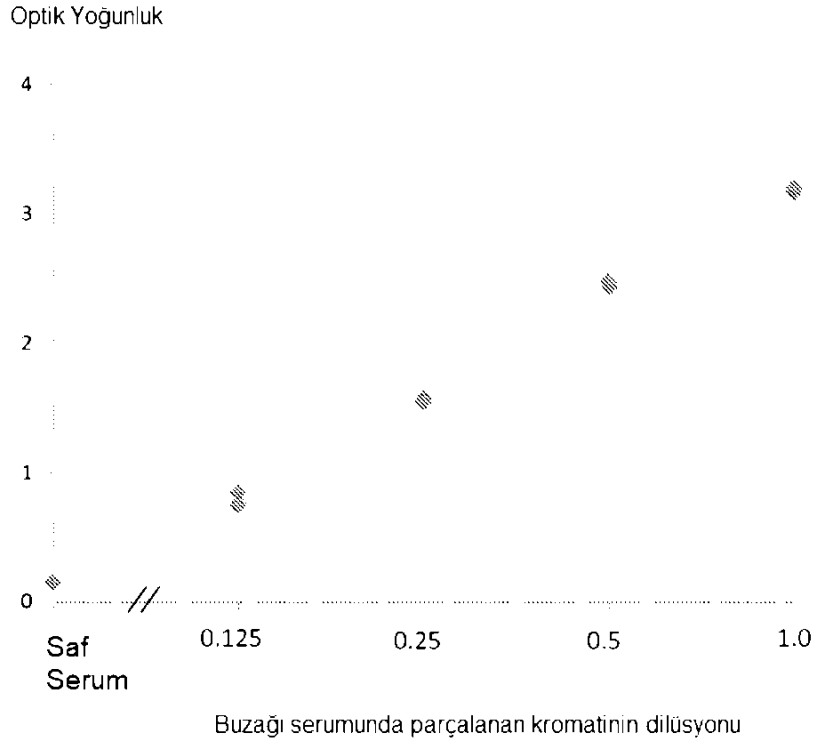
van Nieuwenhuijze et al, Time between onset of apoptosis
and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative
implications for systemic lupus erythematosus. Ann Rheum
Dis; 62: 10-14, 2003

Vasser et al, Measurement of Global DNA Methylation. Genetic
Engineering and Biotechnology News: 29(7), 2009

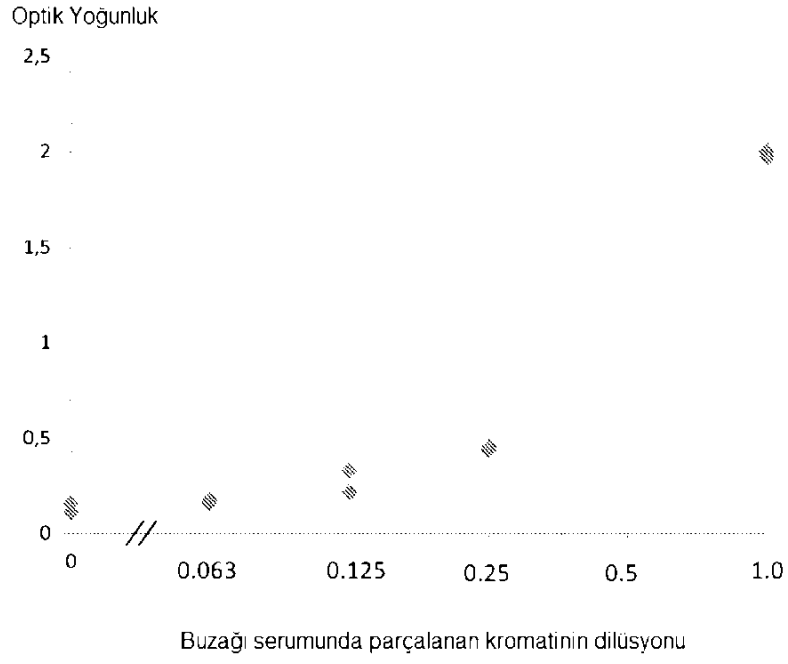
Whittle et al, The Genomic Distribution and Function of
Histone Variant HTZ-1 during C. elegans Embryogenesis. PLoS
Genet 4(9): 1-17, 2008

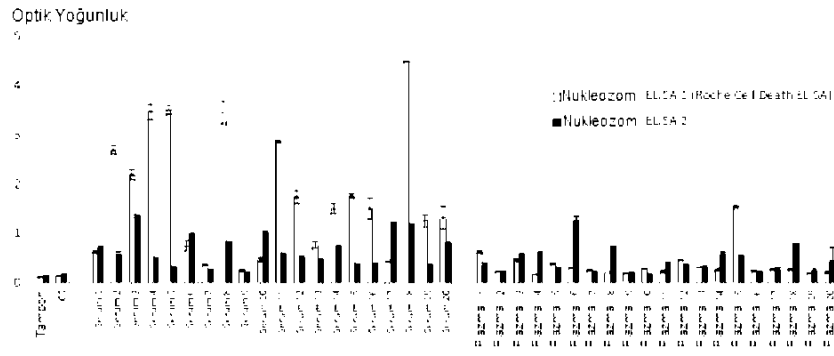
Zee et al, Global turnover of histone post-translational modifications and variants in human cells *Epigenetics & Chromatin*. 3(22): 1-11, 2010

5 Zhang et al, Analysis of global DNA metilation by hidrophilic interaction ultra highpressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*: 413(2), 164-170, 2011

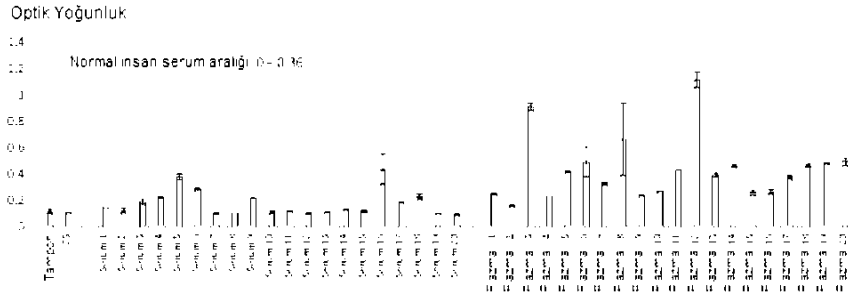


ŞEKİL 1

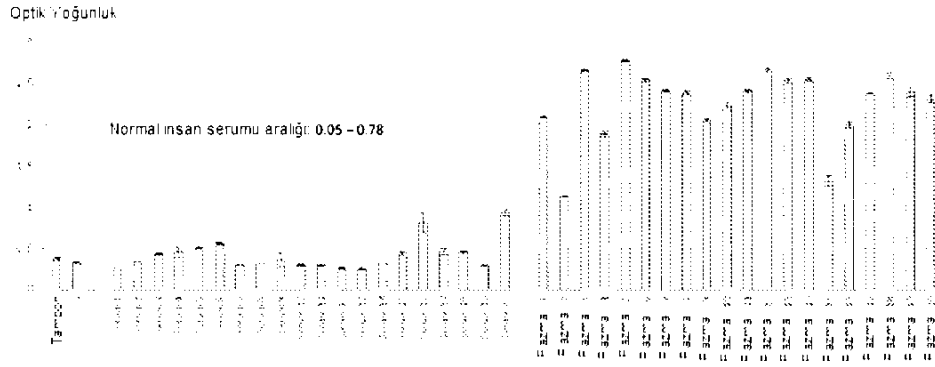
**ŞEKİL 2**



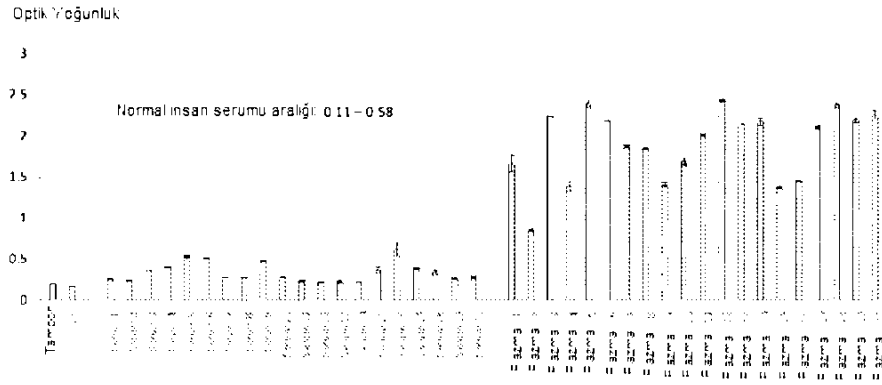
ŞEKİL 3



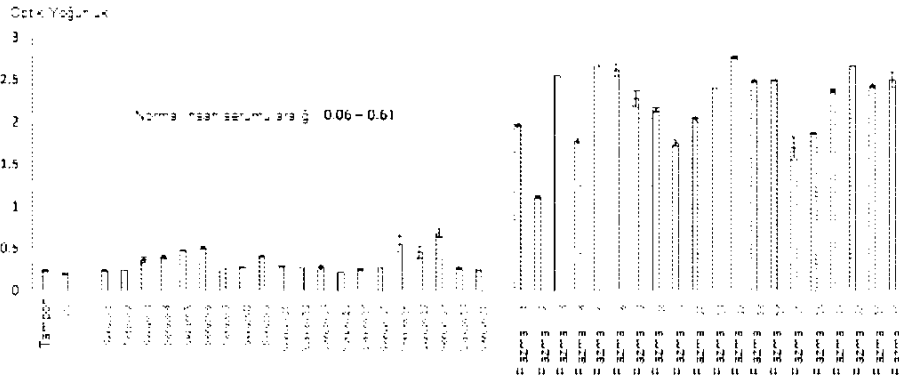
ŞEKİL 4



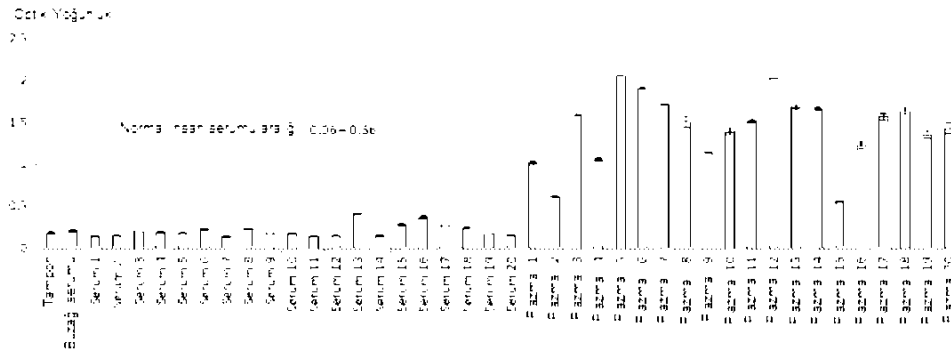
ŞEKİL 5



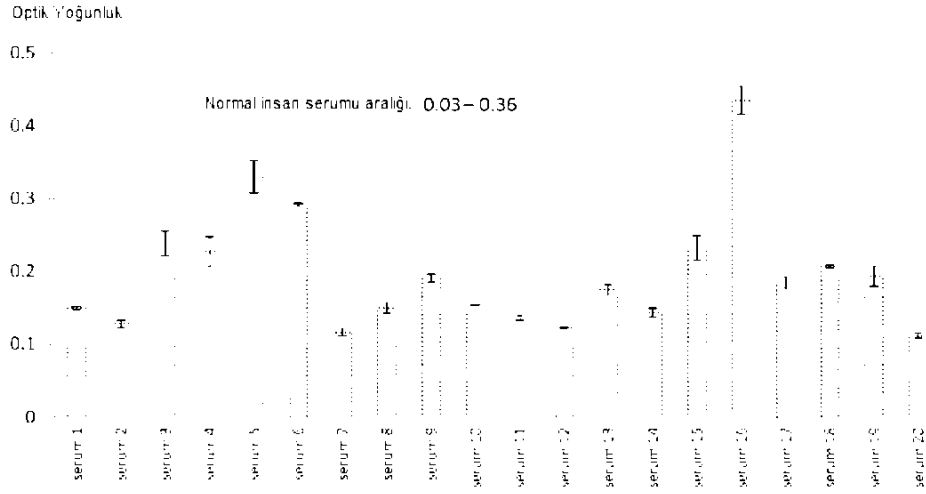
ŞEKİL 6



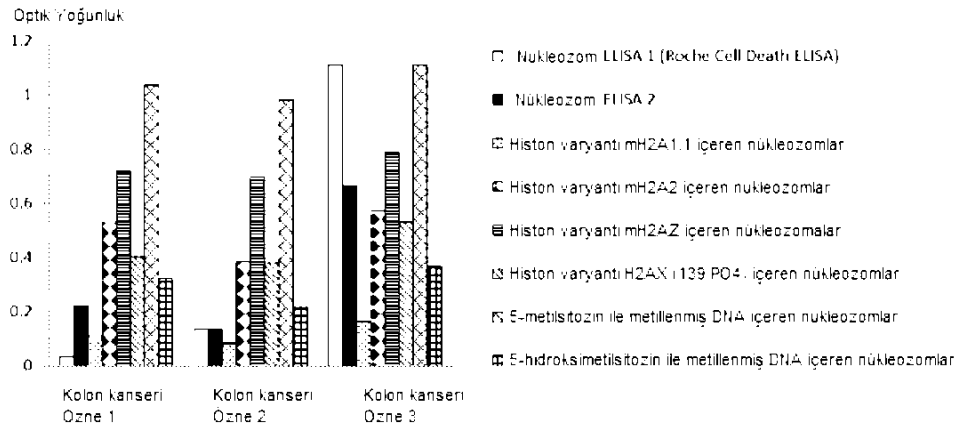
ŞEKİL 7



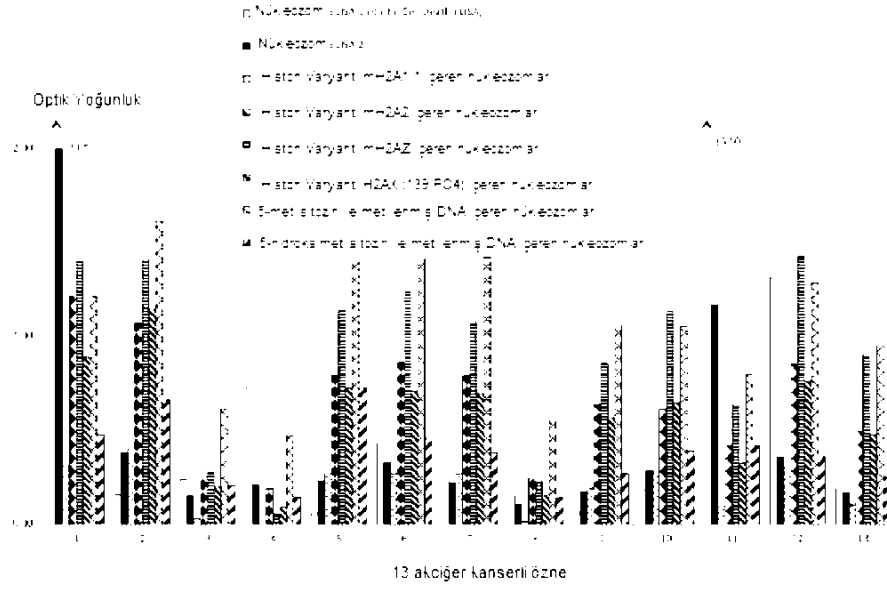
ŞEKİL 8



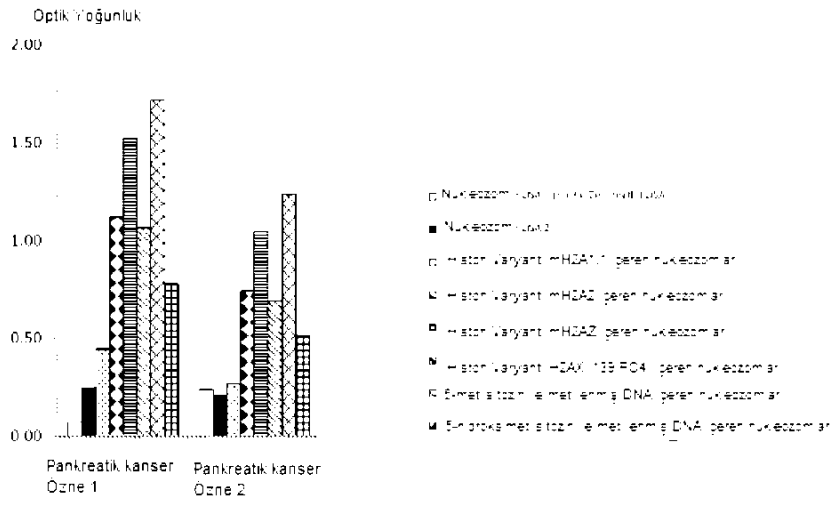
ŞEKİL 9



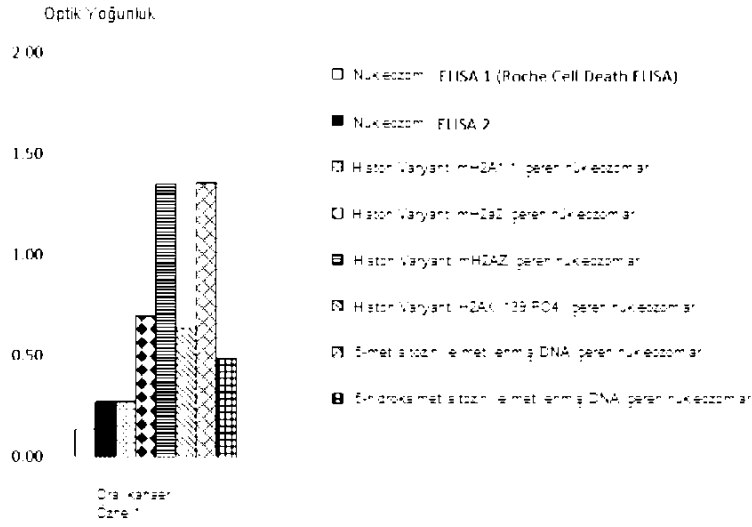
ŞEKİL 10



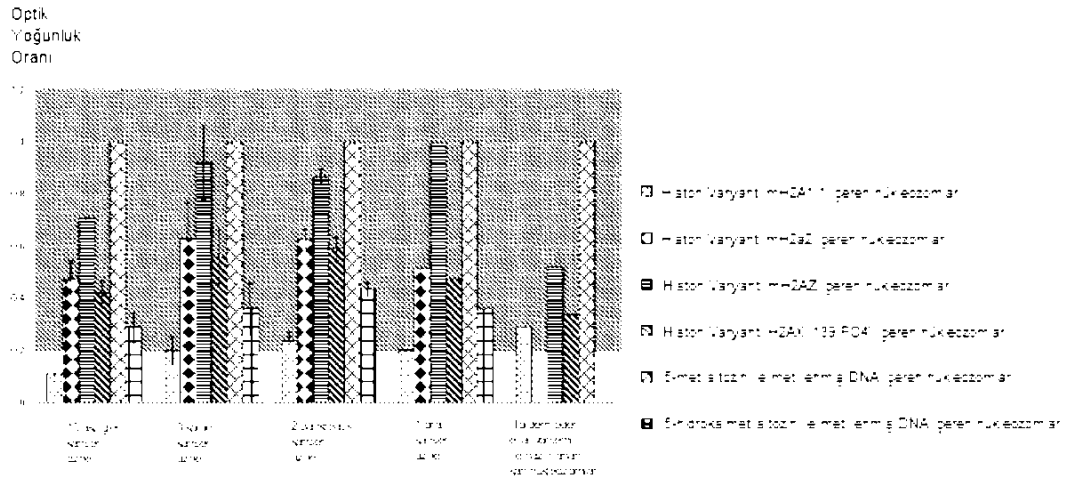
ŞEKİL 11



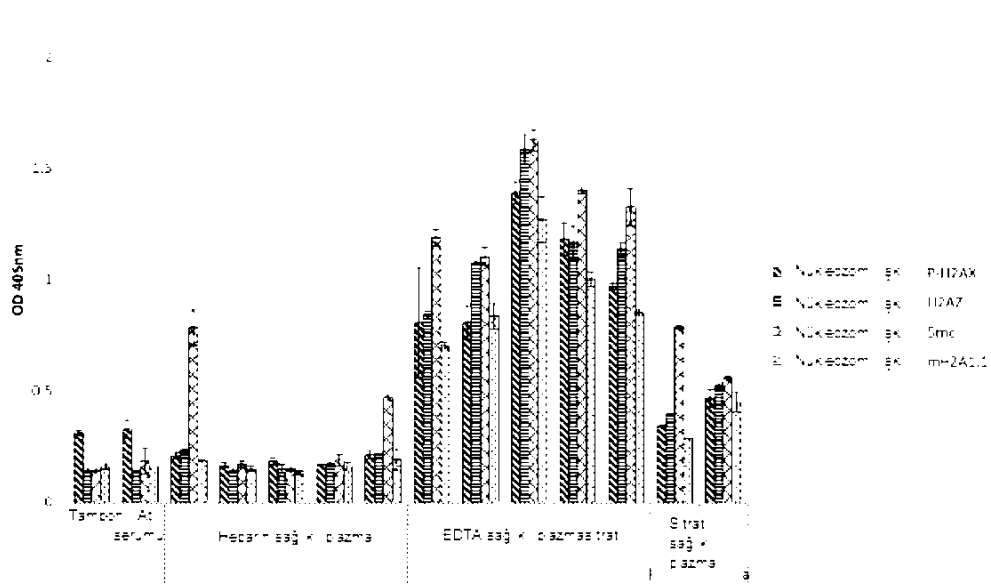
ŞEKİL 12



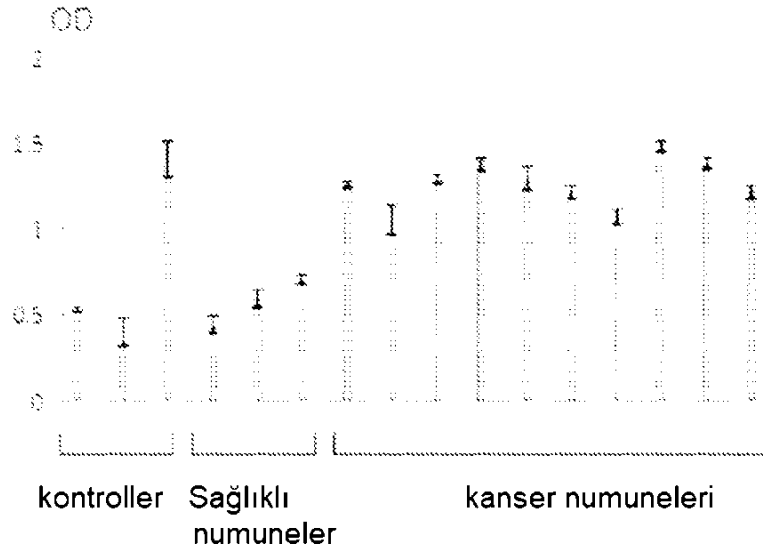
ŞEKİL 13



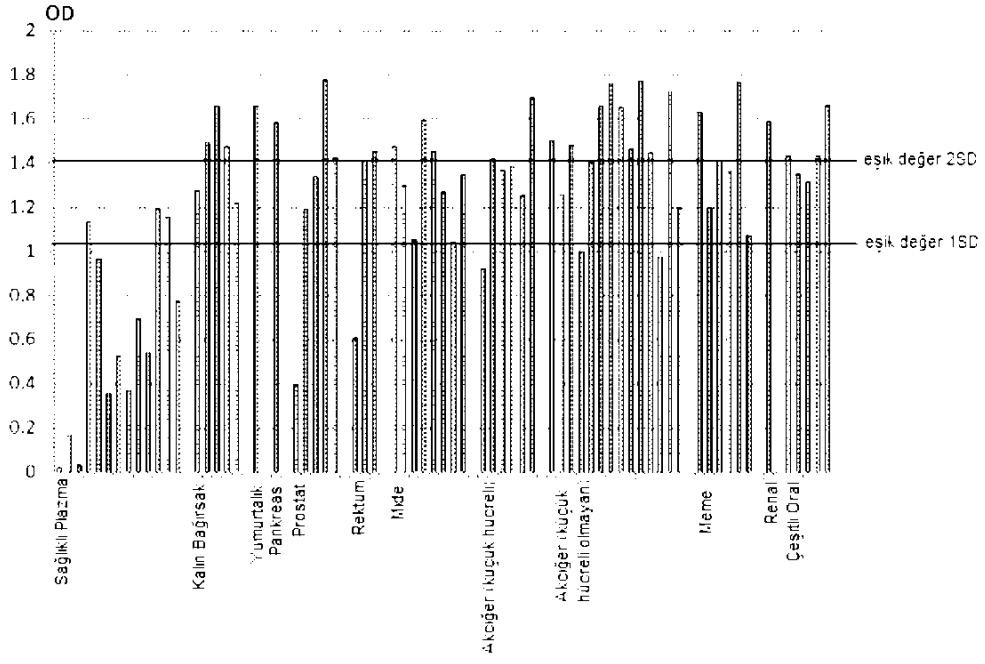
ŞEKİL 14



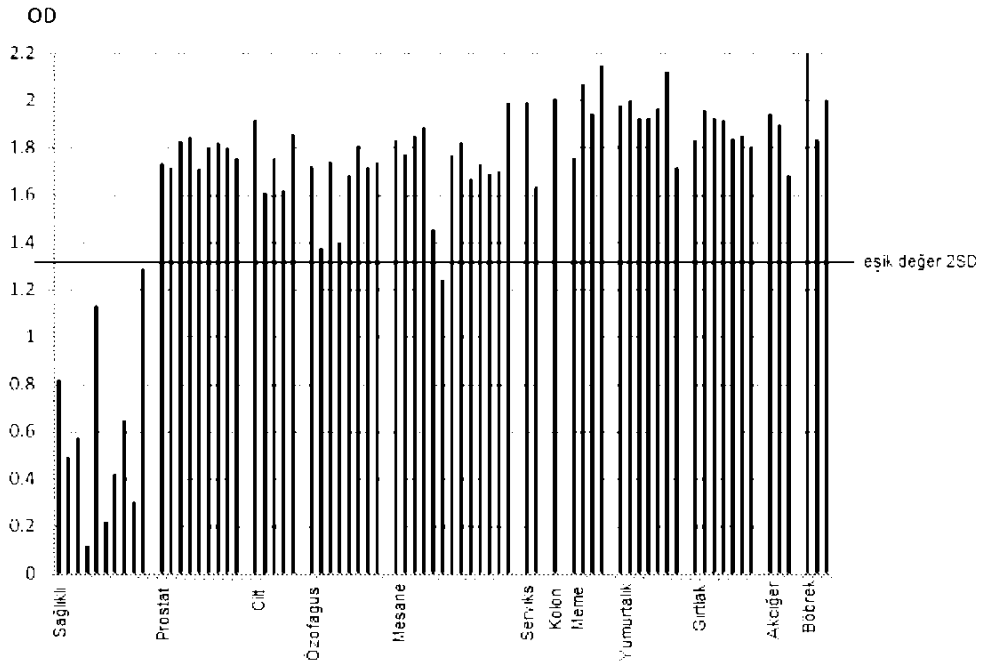
ŞEKİL 15



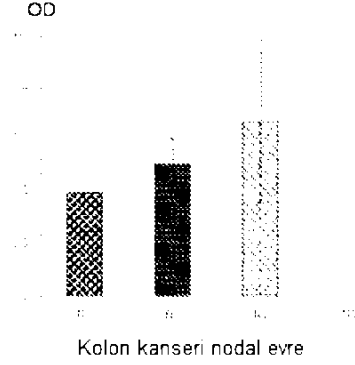
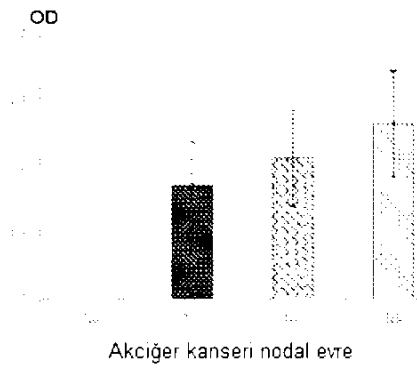
ŞEKİL 16



ŞEKİL 17



ŞEKİL 18



N0 Sıfır bölgesel lenf düğümü metastazı

N1 Direkt yayılım ile tutulum dahil ipsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hilar lenf düğümleri ve intrapulmoner düğümlerde metastaz

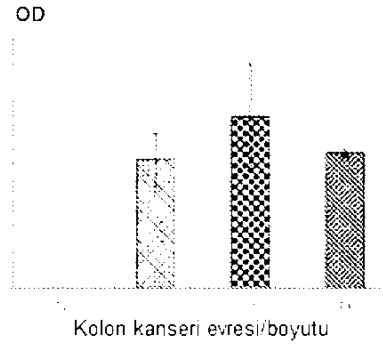
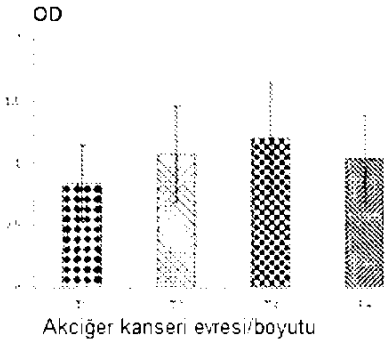
N2 Ipsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf düğümünde(düğümlelerinde) metastaz

N3 Kontralateral mediastinal, kontralateral hilar, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklavikular lenf düğümünde(düğümlelerinde) metastaz

N0 Sıfır bölgesel lenf düğümü metastazı

N1 1-3 bölgesel lenf düğümünde metastaz

N2 4 veya daha fazla bölgesel lenf düğümünde metastaz



T1: tümör<3cm

T2: 3cm <tümör< 7cm

T3:tümör > 7 cm

T4: diğer organ, dokuyu işgal eden herhangi boyutta tümör

T1:tümör, alt mukoza tabakasını işgal eder

T2:tümör, muskularis propriyayı işgal eder

T3: tümör perikolorektal dokularda muskularis propriyayı baştan sona işgal eder

T4: tümör, visseral periton yüzeyine penetre eder, diğer organları veya yapıları işgal eder veya bunlara yapışiktır

ŞEKİL 19

