

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2011-577

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.02.2011**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **22.08.2012**
(Věstník č. 34/2012)

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Ústav informatiky AV ČR, v. v. i. Centrum
biomedicínské informatiky, Praha 8, CZ

(72) Původce:

Zvárová Jana Prof. RNDr. DrSc., Praha 4, CZ
Mazura Ivan Doc. RNDr. CSc., Praha 3, CZ
Valenta Zdeněk Doc. Mgr. Ph.D., Velké Přílepy, CZ
Feglarová Petra Ing. Bc., Šestajovice, CZ
Grunfeldová Hana MUDr., Schořov, CZ

(74) Zástupce:

Inventia s.r.o., RNDr. Kateřina Hartvichová, Na Bělidle
3, Praha 5, 15000

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob identifikace osob se zvýšeným
genetickým rizikem úmrtí po infarktu
myokardu**

(57) Anotace:

Řešení popisuje způsob identifikace osob se zvýšeným genetickým rizikem úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací do 6 měsíců od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu, spočívající v tom, že se v biologickém vzorku odebraném z těla pacienta stanoví intenzita exprese genů a genetických lokusů ADORA3, (M97723), ERLIN1, CLYBL, TCEA3, (BC070337), HSD17B8, FLT3, AXIN2 a (CR596519). Logaritmovaná hodnota intenzity exprese při základu 2 se následně srovná s referenční hodnotou intenzity exprese, přičemž odchylka od referenční hodnoty rovná alespoň minimální odchylce u všech uvedených genů a genetických lokusů značí zvýšené riziko.

CZ 2011 - 577 A3

Způsob identifikace osob se zvýšeným genetickým rizikem úmrtí po infarktu myokardu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu identifikace osob v české populaci, které vykazují zvýšené genetické riziko úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací do 6 měsíců od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu. Identifikace je prováděna na základě stanovení profilu genové exprese vybraných genů lidského genomu.

Dosavadní stav techniky

Infarkt myokardu a cévní mozková příhoda jsou dvěma nejzávažnějšími klinickými projevy aterosklerózy. Riziko rozvoje těchto onemocnění se odhaduje na základě známých rizikových faktorů. Rozsah onemocnění je v současnosti zjišťován řadou vyšetření, jakými jsou např. scintigrafie, magnetická rezonance, katetrizační vyšetření. Každé z těchto vyšetření má však i svá omezení, např. radiační zátěž nebo invazivitu vyšetření. Aterosklerotické pláty jsou zkoumány na buněčné i molekulární úrovni, včetně sledování buněk v cirkulaci jako odpovědi na zánětlivý proces v cévách.

Identifikace genů pomocí molekulárně biologických metod znamenala v posledních letech výrazný posun nejen v odhalení příčin některých závažných, život ohrožujících, onemocnění člověka (např. některé onkologické diagnózy, závažné dědičné poruchy metabolismu člověka či další poruchy neuromuskulárního, gastrointestinálního a oběhového systému, včetně aterosklerózy atd.), ale v neposlední řadě také významně rozšířila naše znalosti o vzniku a rozvoji akutního infarktu myokardu (AIM) (Yukihiro Hojo, Uichi Ikeda, Yun Zhu, Motoi Okada, Shuichi Ueno, Hiroshi Arakawa, Hideyuki Fujikawa, Taka-aki Katsuki, and Kazuyuki Shimada. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 35(4):968-973, March 2000; Merry L. Lindsey. MMP Induction and Inhibition in Myocardial Infarction. *Heart Failure Reviews*, 9(1):7-19, January 2004). Detailnějším pochopením jednotlivých stádií IM se dostávají do popředí i otázky možnosti prevence a účinnější léčby onemocnění. S rozvojem moderních technologií se molekulárně biologický výzkum obecně posouvá od klasického modelu odhalování konkrétních genetických lokusů, resp. genetických polymorfismů, působících poruchu

jednoho genu ke snaze monitorovat polygenní a multifaktoriální poruchy člověka pomocí genomických a expresních čipů, jejichž analýza v současnosti poskytuje komplexnější obraz onemocnění (Joseph S. Verducci, Vincent F. Melfi, Shili Lin, Zailong Wang, Sashwati Roy, and Chandan K. Sen. Microarray analysis of gene expression: considerations in data mining and statistical treatment. *Physiological Genomics*, 25(3):355^{12'}*363, May 2006). Především studium tzv. expresních čipů zažívá v lékařských vědách velký rozvoj, protože umožňuje posoudit mnoho genových transkriptů a jejich expresních variant najednou v kritickém stádiu onemocnění (multivarianní analýza, randomizační studie) (Lawrence W. Stanton, Lisa J. Garrard, Deborah Damm, Brett L. Garrick, Andrew Lam, Ann M. Kapoun, Qiang Zheng, Andrew A. Protter, George F. Schreiner, and R. Tyler White. Altered Patterns of Gene Expression in Response to Myocardial Infarction. *Circ Res*, 86(9):939^{12'}*945, May 2000; Matthew B. Lanktree and Robert A. Hegele. Gene-gene and gene-environment interactions: new insights into the prevention, detection and management of coronary artery disease. *Genome medicine*, 1(2):28, February 2009).

Recentní práce posledních 5 let se intenzivně zabývají z mnoha úhlů pohledu nejen expresními profily osob s aterosklerózou, ale také osob s ischemickou chorobou srdeční ve vztahu ke vznikajícím zánětlivým procesům v cévách (Gemma Satterthwaite, Sheila E. Francis, Kim Suvarna, Stephen Blakemore, Chantelle Ward, Don Wallace, Martin Braddock, and David Crossman. Differential gene expression in coronary arteries from patients presenting with ischemic heart disease: further evidence for the inflammatory basis of atherosclerosis. *American heart journal*, 150(3):488^{12'}*499, September 2005), osob s ischemickou a neischemickou kardiomyopatií při srdečním selhání (Michelle M. Kittleson, Khalid M. Minhas, Rafael A. Irizarry, Shui Q. Ye, Gina Edness, Elayne Breton, John V. Conte, Gordon Tomaselli, Joe G. Garcia, and Joshua M. Hare. Gene expression analysis of ischemic and nonischemic cardiomyopathy: shared and distinct genes in the development of heart failure. *Physiological genomics*, 21(3):299^{12'}*307, May 2005; Michelle M. Kittleson, Shui Q. Ye, Rafael A. Irizarry, Khalid M. Minhas, Gina Edness, John V. Conte, Giovanni Parmigiani, Leslie W. Miller, Yingjie Chen, Jennifer L. Hall, Joe G. Garcia, and Joshua M. Hare. Identification of a gene expression profile that differentiates between ischemic and nonischemic cardiomyopathy. *Circulation*, 110(22):3444^{12'}*3451, November 2004) a dále také osob s poškozením koronárních cév (James A. Wingrove, Susan E. Daniels, Amy J. Sehnert, Whittemore Tingley, Michael R. Elashoff, Steven Rosenberg, Lutz Buellesfeld, Eberhard Grube, L. Kristin Newby, Geoffrey S. Ginsburg, and William E. Kraus. Correlation of

Peripheral-Blood Gene Expression With the Extent of Coronary Artery Stenosis / CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 1(1):31-38, October 2008; Ramachandran S. Vasan and Calum A. MacRae. A dream, a journey, and a promise: the inauguration of *Circulation: Cardiovascular Genetics*. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 1(1):1-2, October 2008; Daphne, Maroeska M. Rovers, Diederick E. Grobbee, Joannes J. Marx, Jill Waalen, Christina Ellervik, Børge G. Nordestgaard, John K. Olynyk, Peter R. Mills, James Shepherd, Bernard Grandchamp, Jolanda M. Boer, Calogero Caruso, Marcello Arca, Beat J. Meyer, and Yvonne T. van der Schouw. Mutations in the HFE gene and cardiovascular disease risk: an individual patient data meta-analysis of 53 880 subjects. *Circulation. Cardiovascular genetics*, 1(1):43-50, October 2008).

Nárůst četnosti vědeckých prací v roce 2009, zabývajících se akutním infarktem myokardu, ukazuje nejen narůstající zájem o tuto problematiku, ale také závažnost studovaného tématu (Kahraman Tanriverdi and Jane E. Freedman. Blood and Cardiovascular Disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 1(1):7-9, October 2008). Také další vědecké práce hledají v poslední době příčinné vztahy mezi projevy některých genů a vznikem akutního infarktu myokardu (AIM). To, že se jedná o komplexní proces, zahrnující celou řadu genů či pouze jejich částí (polymorfni místa), je všeobecně známo. Jsou popsány polymorfismy ve struktuře endoteliálního růstového faktoru, diskriminující pacienty s AIM, u nichž se vyvinulo srdeční selhání (Panagiotis Douvaras, Dionisios G. Antonatos, Kiriaki Kekou, Sotirios Patsilinos, George Chouliaras, Apostolos Christou, Anastasios Andrikou, and Emmanuel Kanavakis. Association of VEGF gene polymorphisms with the development of heart failure in patients after myocardial infarction. *Cardiology*, 114(1):11-18, 2009).

Je popsán vliv akutní koronární okluze na uvolňování ateriálního natriuretického peptidu, který působí na vasodilataci, natriurézu a zánětlivou odpověď, čímž zvyšuje rozsah infarktu myokardu a mortalitu (Aiilyan K. Houg, Rachel A. McNamee, Attila Kerner, Pallavi Sharma, Almois Mohamad, Jonathan Tronolone, and Guy L. Reed. Atrial natriuretic peptide increases inflammation, infarct size, and mortality after experimental coronary occlusion. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 296(3):H655-H661, March 2009). Popisována je rovněž exprese kininových a jiných receptorů (June Yun, Michael J. Zuscik, Pedro Gonzalez-Cabrera, Dan F. McCune, Sean A. Ross, Robert Gaivin, Michael T. Piascik, and Dianne M. Perez. Gene expression profiling of alpha(1b)-adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy by oligonucleotide arrays. *Cardiovascular research*,

57(2):443-455, February 2003), které podporují aktivaci cirkulujících mononukleárů u pacientů s akutním koronárním syndromem (AKS).

Změny nalézané v extracelulární matrix jsou určující pro myokardiální remodelaci po IM. Mohou být významným faktorem pro zánětlivou odpověď a mohou přispívat ke stabilizaci a kompenzatorním mechanismům pro udržení srdečního výdeje. Ovlivňují též angiogenezi, proliferaci a diferenciaci buněk (Fabio D'Aguiar D. Mataveli, Sang Won W. Han, Helena Bonciani B. Nader, Aline Mendes, Rose Kanishiro, Paulo Tucci, Antonio Carlos C. Lopes, Jose Carlos Costa C. Baptista-Silva, Ana Paula Cleto P. Marolla, Leonardo Pinto P. de Carvalho, Priscila Martins Andrade M. Denapoli, and Maria Aparecida da Silva A. Pinhal. Long-term effects for acute phase myocardial infarct VEGF165 gene transfer cardiac extracellular matrix remodeling. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 27(1):22-31, February 2009). Objevují se i studie zaměřené na hledání konkrétních polymorfismů ve struktuře DNA, které by mohly mít přímou souvislost s vývojem ischemické choroby srdeční (C. Federici, N. Botto, S. Manfredi, A. Rizza, M. Fiandra, and M. Andreassi. Relation of Increased Chromosomal Damage to Future Adverse Cardiac Events in Patients With Known Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology*, 102(10):1296-1300, November 2008).

Recentní molekulárně genetické (expresní) studie jsou prováděny např. na desítkách osob s chronickým srdečním selháním (Cappuzzello C., Napolitano M., Arcelli D., Melillo G., Melchionna R., DiVito L., Karlini D., Silvestri L., Brugaletta S., Liuzzo G., Crea F., Capogrosso M.C.: Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients, *Physiol. Genomics*, 2009, 38:233-240), na pacientech s onemocněním koronárních artérií (Meier P., Antonov J., Zbinden R., Kun A., Zbinden S., Gloekler S., Delorenzi M., Maggi R., Seiler C.: Non-invasive gene-expression-based detection of well-developed collateral function in individuals with and without coronary artery disease, *Heart*, 2009, 95:900-908; Erdmann J., Grosshennig A., Braund P.S., et al.: New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3, *Nat. Genet.*, 2009, DOI:10.1038/ng.307; Tregouet D.A., Konig I.R., Erdmann J., et al.: Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease, *Nat Genet*, 2009, DOI:10.1038/ng.314) či na sekrečním materiálu osob s chronickou ischemií (Józefa Dabek, Aleksander Owczarek, Zbigniew Gasior, Rafal Ulczok, Mariusz Skowerski, Andrzej Kulach, Urszula Mazurek, and Andrzej Bochenek. Oligonucleotide microarray analysis of genes regulating apoptosis in chronically ischemic and postinfarction myocardium. *Biochemical genetics*, 46(5-6):241-247, June 2008).

Několik vědeckých týmů v čele s mezinárodním konsorciem pro genetiku infarktu myokardu (Myocardial Infarction Genetics Consortium, <http://www.nature.com/ng>; David Seo, Geoffrey S. Ginsburg, and Pascal J. Goldschmidt-Clermont. Gene Expression Analysis of Cardiovascular Diseases: Novel Insights Into Biology and Clinical Applications. *J Am Coll Cardiol*, 48(2):227-235, July 2006; David Seo, Tao Wang, Holly Dressman, Edward E. Herderick, Edwin S. Iversen, Chunming Dong, Korkut Vata, Carmelo A. Milano, Fabio Rigat, Jennifer Pittman, Joseph R. Nevins, Mike West, and Pascal J. Goldschmidt-Clermont. Gene Expression Phenotypes of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(10):1922-1927, October 2004) se zabývá genetickými asociačními studiemi ve vztahu k infarktu myokardu (Iris M. Heid, Eva Boes, Martina Müller, Barbara Kollerits, Claudia Lamina, Stefan Coassin, Christian Gieger, Angela Döring, Norman Klopp, Ruth Frikke-Schmidt, Anne Tybjærg-Hansen, Anita Brandstätter, Andreas Luchner, Thomas Meitinger, Wichmann, and Florian Kronenberg. Genome-Wide Association Analysis of High-Density Lipoprotein Cholesterol in the Population-Based KORA Study Sheds New Light on Intergenic Regions / CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 1(1):10-20, October 2008; Gudbjartsson D.F., Bjornsdittir U.S., Halapi E., et al.: Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction, *Nat.Genet.*, 2009, DOI: 10.1038/ng.323; Ozaki K., Sato H., Inoue K., et al.: SNPs in BRAP associated with risk of myocardial infarction in Asian population, *Nat. Genet.*, 2009, DOI:10.1038/ng.326).

Snaha včas predikovat nastupující příznaky infarktu myokardu (postupně nastupující stres vyvíjející se až do šoku) je dnes řešena klinickou diferencíální diagnostikou, funkčními testy, resp. statimovým měřením základních biochemických markerů pro AIM. Toto užívané schéma diagnostiky je používáno (u pacienta při první události) bez jakékoliv možnosti monitorovat (predikovat) celkový stav organismu v období před AIM. Přesnějším charakterizováním základního expresního profilu pacienta přežívajícího i nepřežívajícího akutní stadium infarktu myokardu a jeho porovnáním s vybranými osobami kontrolního souboru české populace, se otevírá do budoucna reálná možnost průběžného, ekonomicky dostupného sledování osob přežívajících infarkt myokardu (období do 3-6 měsíců po první a další události).

Pokusy o expresní analýzu a průběžné monitorování nejruznějších, především ale nádorových, onemocnění člověka byly již učiněny. Jsou dnes připravovány nejruznější selektivní expresní sady genů, které charakterizují nejen aktuální stav organismu, ale také mohou monitorovat úspěšnost a adekvátnost léčby (David T. Miller, Paul M. Ridker, Peter

Libby, and David J. Kwiatkowski. Atherosclerosis: The Path From Genomics to Therapeutics. *J Am Coll Cardiol*, 49(15):1589-1599, April 2007). Tyto snahy jsou zřejmě v posledních letech i v oblasti diagnostiky některých kardiovaskulárních poruch člověka (P. Meier, J. Antonov, R. Zbinden, A. Kuhn, S. Zbinden, S. Gloekler, M. Delorenzi, R. Jaggi, and C. Seiler. Non-invasive gene-expression-based detection of well-developed collateral function in individuals with and without coronary artery disease. *Heart*, 95(11):900-908, June 2009; Józefa Dabek, Aleksander Owczarek, Zbigniew Gasior, Rafal Ulczok, Mariusz Skowerski, Andrzej Kulach, Urszula Mazurek, and Andrzej Bochenek. Oligonucleotide microarray analysis of genes regulating apoptosis in chronically ischemic and postinfarction myocardium. *Biochemical genetics*, 46(5-6):241-247, June 2008; Claudia Cappuzzello, Monica Napolitano, Diego Arcelli, Guido Melillo, Roberta Melchionna, Luca Di Vito, Daniele Carlini, Lorena Silvestri, Salvatore Brugaletta, Giovanna Liuzzo, Filippo Crea, and Maurizio C. Capogrossi. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients. *Physiological genomics*, 38(3):233-240, August 2009), dosud však není známa studie snažící se predikovat prognózu pacienta s AIM.

V posledních letech celosvětově vzrůstající prevalence kardiovaskulárních chorob člověka motivuje stále intenzivněji vědeckou veřejnost k hledání nových strategií diagnostiky a léčby (James A. Wingrove, Susan E. Daniels, Amy J. Sehnert, Whittemore Tingley, Michael R. Elashoff, Steven Rosenberg, Lutz Buellesfeld, Eberhard Grube, L. Kristin Newby, Geoffrey S. Ginsburg, and William E. Kraus. Correlation of Peripheral-Blood Gene Expression With the Extent of Coronary Artery Stenosis / CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 1(1):31-38, October 2008; Peter R. Sinnaeve, Mark P. Donahue, Peter Grass, David Seo, Jacky Vonderscher, Salah-Dine D. Chibout, William E. Kraus, Michael Sketch, Charlotte Nelson, Geoffrey S. Ginsburg, Pascal J. Goldschmidt-Clermont, and Christopher B. Granger. Gene expression patterns in peripheral blood correlate with the extent of coronary artery disease. *PloS one*, 4(9), 2009; Ruby C. Y. Lin, Kate L. Weeks, Xiao-Ming Gao, Rohan B. H. Williams, Bianca C. Bernardo, Helen Kiriazis, Vance B. Matthews, Elizabeth A. Woodcock, Russell D. Bouwman, Janelle P. Mollica, Helen J. Speirs, Ian W. Dawes, Roger J. Daly, Tetsuo Shioi, Seigo Izumo, Mark A. Febbraio, Xiao-Jun Du, and Julie R. McMullen. Pi3k(p110alpha) protects against myocardial infarction-induced heart failure: Identification of pi3k-regulated mirna and mrna. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(4):724-732, April 2010; Orfeas Liangos, Sophie Domhan, Christian Schwager, Martin Zeier, Peter E. Huber, Francesco Addabbo, Michael S. Goligorsky, Lynn Hlatky,

Bertrand L. Jaber, and Amir Abdollahi. Whole blood transcriptomics in cardiac surgery identifies a gene regulatory network connecting ischemia reperfusion with systemic inflammation. *PloS one*, 5(10), 2010) a využívání nových technologií, jakými jsou na příklad meta-analýzy velkých souborů studovaných osob či tzv. GWAS (Genome-wide association studies) studií (John P. A. Ioannidis. Prediction of Cardiovascular Disease Outcomes and Established Cardiovascular Risk Factors by Genome-Wide Association Markers / CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(1):7-15, February 2009; Jeanette Erdmann, Patrick Linsel-Nitschke, and Heribert Schunkert. Genetic causes of myocardial infarction: new insights from genome-wide association studies. *Deutsches Ärzteblatt international*, 107(40):694-699, October 2010).

Výsledky rozsáhlé GWAS studie (Myocardial Infarction Genetics Consortium, Sekar Kathiresan, Benjamin F. Voight, Shaun Purcell, Kiran Musunuru *et al.* Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics*, 41(3):334-341, March 2009) potvrdily asociaci několika genů s ranným výskytem akutního infarktu myokardu, z nichž některé byly též potvrzeny analýzami našich dat. Jedná se především o gen PHACTR1 (fosfatáza a regulátor aktinu 1), který se ve srovnání s obecnou českou populací ukazuje na základě našich dat jako prediktivní u pacientů, kteří z kardiovaskulárních příčin zemřeli v průběhu 6-měsíčního sledování po primární srdeční příhodě, dále též gen MRPS6 (mitochondriální ribozomální protein), jehož varianty MRPL9, MRPL39, MRPL48, MRPS33 a MRPS30 byly statisticky významné také v našich datech, nikoliv však klinicky a neprosadily se do množin genů s prediktivními vlastnostmi. Nejsou proto uváděny v našich konečných výsledcích. Varianty WDR57, WDR61 a WDR75 genu WDR12 identifikovaného v této publikaci byly podobně statisticky, nikoliv však klinicky významné v našich datech. Naopak geny CDKN2A, CDKN2B identifikované v souvislosti s incidencí akutního infarktu myokardu ve výše zmíněné publikaci a dále např. v publikaci autorů Anna Helgadóttir, Gudmar Thorleifsson, Andrei Manolescu, Solveig Gretarsdóttir, Thorarinn Blondal, Aslaug Jonasdóttir, Adalbjorg Jonasdóttir, Asgeir Sigurdsson, Adam Baker, Arnar Pálsson, Gisli Masson, Daniel F. Gudbjartsson, Kristinn P. Magnusson, Karl Andersen, Allan I. Levey, Valgerdur M. Backman, Sigurborg Matthíasdóttir, Thorbjorg Jonsdóttir, Stefan Pálsson, Helga Einarsdóttir, Steinunn Gunnarsdóttir, Arnaldur Gylfason, Viola Vaccarino, W. Craig Hooper, Muredach P. Reilly, Christopher B. Granger, Harland Austin, Daniel J. Rader, Svati H. Shah, Arshed A. Quyyumi, Jeffrey R. Gulcher, Gudmundur Thorgeirsson, Unnur Thorsteinsdóttir, Augustine

Kong, and Kari Stefansson. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5830):1491-1493, June 2007, nebyly v našich datech v souvislosti s výskytem akutního infarktu myokardu zjištěny.

Recentní publikace z roku 2010 naznačují stoupající zájem o aplikaci moderních metod pro studium kardiovaskulárního systému člověka, mezi něž se zařazuje i technologie celogenomové expresní analýzy. Tato technologie umožňuje získávat informace o okamžité odpovědi organismu na akutní stádia závažných, život ohrožujících, onemocnění, jakými jsou např. mrtvice či infarkt myokardu. Dovoluje nám současně i nový pohled na desetiletí známý proces. Využitím mononukleárních buněk periferní krve jako zkoumaného materiálu se naskýtá reálná možnost získat expresní profily ze snadno a rutinně dostupného biologického materiálu a z těchto profilů poté vytipovat ty signifikantní hladiny genové exprese, které by mohly charakterizovat určitá stádia onemocnění. Takto získaná data se dají v budoucnu použít jako základ pro zlepšení diagnostického komfortu pacienta. Ze studií publikovaných na konci roku 2009 a v průběhu roku 2010 lze zmínit práce, zabývající se úlohou hladin HDL a LDL frakcí cholesterolu či celkového cholesterolu ve vztahu ke genetické predispozici kardiovaskulárních chorob (Anna C. Calkin and Peter Tontonoz. Genome-Wide Association Studies Identify New Targets in Cardiovascular Disease. *Science Translational Medicine*, 2(48):48-94, 2010; Rong Yang, Lin Li, Sara Bretschger B. Seidelmann, Gong-Qing Q. Shen, Sonia Sharma, Shaoqi Rao, Kalil G. Abdullah, Kenneth G. Mackinlay, Robert C. Elston, Qiuyun Chen, Eric J. Topol, and Qing Kenneth K. Wang. A genome-wide linkage scan identifies multiple quantitative trait loci for HDL-cholesterol levels in families with premature CAD and MI. *Journal of lipid research*, 51(6):1442-1451, June 2010), nebo práce snažící se predikovat významné geny exprimující se v akutním stádiu mrtvice (Boryana Stamova, Huichun Xu, Glen Jickling, Cheryl Bushnell, Yingfang Tian, Bradley P. Ander, Xinhua Zhan, DaZhi Liu, Renee Turner, Peter Adamczyk, Jane C. Khoury, Arthur Pancioli, Edward Jauch, Joseph P. Broderick, and Frank R. Sharp. Gene Expression Profiling of Blood for the Prediction of Ischemic Stroke. *Stroke*, 41(10):2171-2177, October 2010).

Několik prací se v roce 2010 zabývalo hledáním genetických příčin či nejruznějších nových biomarkerů ventrikulární fibrilace, která bývá pozorována v akutním stádiu infarktu myokardu a může mít vliv na přežití pacienta (Connie R. Bezzina, Raha Pazoki, Abdennasser Bardai, Roos F. Marsman, Jonas S. de Jong, Marieke T. Blom, Brendon P. Scicluna, J. Wouter Jukema, Navin R. Bindraban, Peter Lichtner, Arne Pfeufer, Nanette H. Bishopric, Dan M. Roden, Thomas Meitinger, Sumeet S. Chugh, Robert J. Myerburg, Xavier Jouven,

Stefan Kääh, Lukas R. Dekker, Hanno L. Tan, Michael W. Tanck, and Arthur A. Wilde. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus at 21q21 for ventricular fibrillation in acute myocardial infarction. *Nature genetics*, 42(8):688-691, August 2010; Feng Dong, Mazen Khalil, Matt Kiedrowski, Caitlin O'Connor, Erin Petrovic, Xiaorong Zhou, and Marc S. Penn. Critical role for leukocyte hypoxia inducible factor-1alpha expression in post-myocardial infarction left ventricular remodeling. *Circulation research*, 106(3):601-610, February 2010; Yvan Devaux, Francisco Azuaje, Mélanie Vausort, Céline Yvorra, and Daniel R. Wagner. Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction. *Functional & integrative genomics*, 10(3):329-337, August 2010).

Do popředí zájmu se v posledním roce dostává i otázka, zda celkový stres organismu při akutní fázi infarktu myokardu nezhoršuje vlastní prognózu přežití (Jessica M. Berthiaume, Molly S. Bray, Tracy A. McElfresh, Xiaoqin Chen, Salman Azam, Martin E. Young, Brian D. Hoit, and Margaret P. Chandler. The myocardial contractile response to physiological stress improves with high saturated fat feeding in heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 299(2), August 2010). Jsou hledány souvislosti mezi genetickými příčinami infarktu myokardu a chronickým onemocněním ledvin (Tetsuo Fujimaki, Kimihiko Kato, Kiyoshi Yokoi, Mitsutoshi Oguri, Tetsuro Yoshida, Sachiro Watanabe, Norifumi Metoki, Hidemi Yoshida, Kei Satoh, Yukitoshi Aoyagi, Yoshinori Nozawa, Genjiro Kimura, and Yoshiji Yamada. Association of genetic variants in SEMA3F, CLEC16A, LAMA3, and PCSK2 with myocardial infarction in Japanese individuals. *Atherosclerosis*, 210(2):468-473, June 2010) či atherotrombózou (Luca Andrea A. Lotta. Genome-wide association studies in atherothrombosis. *European journal of internal medicine*, 21(2):74-78, April 2010).

Studován byl rovněž vliv microRNA-molekul, které jsou popisovány jako negativní regulátory genové exprese a recentní studie naznačují, že mohou hrát významnou roli nejen v rozvoji infarktu myokardu, ale i u dalších kardiovaskulárních poruch člověka (Emanuela Bostjancic, Nina Zidar, and Damjan Glavac. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction. *Disease markers*, 27(6):255-268, 2009). Stále je diskutována biologická role interleukinu 1 ve vztahu k dyslipidémii a riziku vzniku infarktu myokardu (Bernard Keavney. The interleukin-1 cluster, dyslipidaemia and risk of myocardial infarction. *BMC medicine*, 8(1):6+, January 2010).

Populačně charakteristický obraz rizikových genetických markerů je diskutován v řadě recentních publikací (Paul M. Ridker, Guillaume Paré, Alex N. Parker, Robert Y. Zee, Joseph P. Miletich, and Daniel I. Chasman. Polymorphism in the CETP gene region, HDL cholesterol, and risk of future myocardial infarction: Genomewide analysis among 18 245 initially healthy women from the Women's Genome Health Study. *Circulation Cardiovascular genetics*, 2(1):26^{12'}33, February 2009; Tetsuo Fujimaki *et al.* Association of genetic variants in SEMA3F, CLEC16A, LAMA3, and PCSK2 with myocardial infarction in Japanese individuals. *Atherosclerosis*, 210(2):468^{12'}473, June 2010). Jsou studovány i další typy genetických variací (SNP-single nucleotide polymorphisms a CNV-copy number variations) ve vztahu ke vzniku a rozvoji infarktu myokardu (Myocardial Infarction Genetics Consortium, Sekar Kathiresan, Benjamin F. Voight, Shaun Purcell, Kiran Musunuru *et al.* Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics*, 41(3):334^{12'}341, March 2009).

V neposlední řadě je nutno zmínit také práce zabývající se infarktem myokardu na experimentálním zvířeti (Jessica M. Berthiaume *et al.* The myocardial contractile response to physiological stress improves with high saturated fat feeding in heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 299(2), August 2010; Dongsheng zHong, Xiaowei Zeng, Wei Xu, Jing Ma, Yinghui Tong, and Yan Chen. Altered profiles of gene expression in curcumin-treated rats with experimentally induced myocardial infarction. *Pharmacological Research*, 61(2):142^{12'}148, February 2010; Zongjin Li, Kitchener D. Wilson, Bryan Smith, Daniel L. Kraft, Fangjun Jia, Mei Huang, Xiaoyan Xie, Robert C. Robbins, Sanjiv S. Gambhir, Irving L. Weissman, and Joseph C. Wu. Functional and transcriptional characterization of human embryonic stem cell-derived endothelial cells for treatment of myocardial infarction. *PloS one*, 4(12):e8443+, December 2009; Lisheng Zhang, Jessica J. Connelly, Karsten Peppel, Leigh Brian, Svati H. Shah, Sarah Nelson, David R. Crosslin, Tianyuan Wang, Andrew Allen, William E. Kraus, Simon G. Gregory, Elizabeth R. Hauser, and Neil J. Freedman. Aging-related atherosclerosis is exacerbated by arterial expression of tumor necrosis factor receptor-1: evidence from mouse models and human association studies. *Human Molecular Genetics*, 19(14):2754^{12'}2766, July 2010; Lars Bochmann, Padmini Sarathchandra, Federica Mori, Enrique Lara-Pezzi, Domenico Lazzaro, and Nadia Rosenthal. Revealing new mouse epicardial cell markers through transcriptomics. *PloS one*, 5(6), 2010).

- Přihláška vynálezu PV 2009-872 navrhuje stanovení prognózy pacientů v akutním stadiu primárního infarktu myokardu stanovením exprese alespoň jednoho genu či genetického

lokusu vybraného ze skupiny zahrnující TCRA, LOC650751, LOC650761, PRR6 a TMEM98 ve vzorku periferní krve.

Níže popsaný vynález poskytuje sadu genů, která umožňuje stanovení prognózy s vyšší přesností a lepší klinickou shodou.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je způsob identifikace osob v české populaci se zvýšeným genetickým rizikem úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací do 6 měsíců od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že se v biologickém vzorku odebraném z těla pacienta, do 24 hodin od výskytu akutního infarktu myokardu, stanoví intenzita exprese sady genů a genetických lokusů:

Název / Lokus genu	RefSeq_ID	SEQ ID No.	Referenční hodnota intenzity exprese (nízké riziko) stanovená na celogenomovém / oligonukleotidovém čipu	Min. odchylka od ref. hodnoty exprese, značící zvýšené riziko
ADORA3	NM_020683.5	1	6,30	+1
(M97723)	M97723	2	7,26	-1
ERLIN1	NM_006459.2	3	6,81	+1
TCEA3	NM_003196.1	5	7,08	-1
(BC070337)	BC070337	6	10,87	-1
CLYBL	NM_206808.1	4	6,55	-1
HSD17B8	NM_014234.3	7	7,31	-1
FLT3	NM_004119.1	8	5,99	+1
AXIN2	NM_004655.2	9	7,15	-1
(CR596519)	CR596519	10	11,57	-1

Postup stanovení míry genetického rizika spočívá v tom, že se změří intenzita genové exprese v biologickém vzorku a její logaritmovaná hodnota při základu 2 se srovná s referenční hodnotou intenzity exprese uvedenou pro jednotlivé geny a genetické lokusy. V posledním sloupci tabulky je pro každý gen/lokus uvedena minimální odchylka od referenční hodnoty exprese, značící zvýšené riziko. má sada jako celek, nikoliv jednotlivé geny/lokusy, a tedy pro naplnění kritéria zvýšeného genetického rizika je nutné, aby se u sledovaného pacienta

hodnoty genové exprese lišily od hodnot referenčních alespoň o požadovanou hodnotu u všech genů/lokusů v sadě.

Biologickým vzorkem odebraným z těla pacienta mohou být například buňky periferní krve, které jsou výhodné především pro minimální invazivitu získání potřebného materiálu.

V případě všech zde uváděných genů a genetických lokusů jsou míněny geny a genetické lokusy hybridizující s odpovídajícími sondami na celogenomových čipech Illumina. Sekvence DNA kódující mRNA uváděné v předkládané přihlášce jsou uváděny podle dostupných katalogů pouze pro informaci.

Expres genů a genetických lokusů může být stanovena jakýmkoliv způsobem známým odborníkovi v daném oboru, například na celogenomovém nebo oligonukleotidovém čipu (čipová microarray analýza, např. i tiling čipy), RT-PCR a qPCR, Northern blot, RNA-Seq (RNA sekvenční zpracování, Whole Transcriptome Shotgun Sequencing), SAGE (mnohonásobná analýza genové exprese, serial analysis of gene expression), FISH (fluorescenční in-situ hybridizace), využitím reportérových genů, analýzou ribonukleasové ochrany (Ribonuclease Protection Assay) či na úrovni exprese translatovaných proteinů metodou western blot, ELISA (enzymová imunoanalýza, enzyme-linked immunosorbent assay), využitím GFP (zelený fluorescenční protein, green fluorescent protein), průtokovou cytometrií či imunohistologicky.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále oligonukleotidový čip pro identifikaci osob se zvýšeným genetickým rizikem úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací do 6 měsíců od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu, obsahující právě sondy hybridizující s DNA či RNA uvedené sady genů či genetických lokusů. Oligonukleotidový čip může být připraven např. spotováním či jakýmkoliv jiným způsobem známým odborníkovi v daném oboru.

Předkládaný vynález přináší možnost identifikovat v české populaci jedince, kteří mají zvýšené genetické riziko úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací do 6 měsíců od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu, což umožní efektivní využití lůžkových kapacit a prevenčních a sledovacích programů.

Vynález je dále osvětlen na následujících příkladech provedení, aniž je jimi jeho rozsah jakkoliv omezen.

Přehled ^{obrázků} vyobrazení na výkreszech

Obr. 1 ukazuje teplotní mapu genů identifikovaných v rámci experimentu genové exprese pro kontrast AIMD6 vs AIM.

Obr. 2 ukazuje kvantilovou diagnostiku lineárního modelu pro logaritmovaná data intenzit genové exprese při základu 2 (Q-Q grafy) a dále vulkánové grafy, které charakterizují data na základě logaritmu podílů intenzit genové exprese ve studované a srovnávací populaci (viz daný kontrast) a na základě logaritmu šance na diferenciální expresi pro daný gen či transkript. Dává komplexní představu o povaze diferenciální exprese pro daný kontrast.

Seznam sekvencí

- SEQ ID No. 1: sekvence DNA kódující mRNA genu ADORA3
- SEQ ID No. 2: sekvence DNA odpovídající RefSeq_ID M97723
- SEQ ID No. 3: sekvence DNA kódující mRNA genu ERLIN1
- SEQ ID No. 4: sekvence DNA kódující mRNA genu CLYBL
- SEQ ID No. 5: sekvence DNA kódující mRNA genu TCEA3
- SEQ ID No. 6: sekvence DNA odpovídající RefSeq_ID BC070337
- SEQ ID No. 7: sekvence DNA kódující mRNA genu HSD17B8
- SEQ ID No. 8: sekvence DNA kódující mRNA genu FLT3
- SEQ ID No. 9: sekvence DNA kódující mRNA genu AXIN2
- SEQ ID No. 10: sekvence DNA odpovídající RefSeq_ID CR596519

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Čipová analýza buněk periferní krve pacientů smíchané s RNA later na lidském celogenomovém čipu Human WG6-v2 Expression BeadChip firmy Illumina

Pozn. Kurzívou jsou označeny přesné obchodní názvy produktů či specifické komponenty produktů, které nemají odpovídající jednoznačné české ekvivalenty.

Sběr vzorků plné krve do *RNAlater*[®] (kat. č. AM7024, Ambion, Applied Biosystems) byl prováděn tak, že vzorek nesrážlivé plné krve (2,4 ml) byl nejpozději do 15 min od odběru smíchán s *RNAlater*[®] *Tissue Collection: RNA Stabilization Solution* (7,6 ml). Vzorek byl řádně promíchán a poté přesunut do mrazicího boxu -70 °C k dlouhodobému skladování.

Izolace RNA pomocí kitu *RiboPure*[™] – *Blood*, Ambion Inc. (kat. č. AM1928, Ambion, Applied Biosystems) byla prováděna tak, že vzorky byly vyndány z mrazicího boxu a ponechány na ledu rozmrazit. Snažili jsme se vždy šestice vzorků jdoucí na jeden čip připravovat najednou. Pro izolaci RNA bylo pipetováno 1,8 ml vzorku krve s *RNAlater*[®] do 2 ml zkumavky bez RNase. Vzorek krve v roztoku *RNAlater*[®] byl centrifugován na 16 100 g (13 200 rpm) 1 min. Supernatant byl odstraněn včetně bílé fáze těsně nad peletem. Buňky byly lyzovány v 800 µl lyzačního roztoku a 50 µl roztoku acetátu sodného. Směs byla řádně promíchána na vortexu. Lyzát buněk byl extrahován s 500 µl kyselého fenol:chloroformu. Směs byla promíchána 30 s na vortexu a ponechána stát 5 min při laboratorní teplotě. Směs byla centrifugována na 16 100 g 1 min. Celá vodná fáze, které bylo kolem 1,2 ml, byla přenesena do nové 2 ml zkumavky bez RNase, znovu centrifugována a vodná fáze bez jakékoli pelety odebrána do čisté zkumavky bez RNase. Bylo přidáno 600 µl 100% etanolu a promícháno na vortexu.

700 µl vzorku bylo přeneseno na dodanou kolonku umístěnou v kolekční zkumavce a 5 × 10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a znovu do nich byly nasazeny kolonky. Do kolonek bylo nanášeno dalších 700 µl a poté zbytek vzorku a vždy 5 × 10 s centrifugováno na 16 100 g. Na filtry kolonek bylo nanášeno 700 µl promývacího roztoku 1 a 5 × 10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a znovu do nich byly vsazeny kolonky. Do kolonek bylo 2x nanášeno 700 µl promývacího roztoku 2/3 (láhev musí být doplněna o 56 ml 100% etanolu) a 5 × 10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a znovu do nich byly vsazeny kolonky, centrifugovány, aby byla odstraněna veškerá kapalina. Kolonky byly přeneseny na označenou kolekční zkumavku a nanášeno 50 µl elučního roztoku (předehřátého na 75 °C). 20 s ponecháno stát při laboratorní teplotě a 20 × 30 s centrifugováno na maximum. Při druhé eluci dalšími 50 µl elučního roztoku centrifugováno 1 min.

K RNA ve 100 µl elučního pufru bylo přidáno 5 µl DNase pufru a 1 µl DNase I a ponecháno 30 min inkubovat při 37 °C. K RNA po odstranění DNA bylo přidáno 20 µl DNase

inaktivační reagentie. Směs byla jemně promíchána na vortexu a ponechána 2 min stát při laboratorní teplotě. Během této doby ještě byla směs dvakrát promíchána.

Vzorek byl centrifugován 1 min na 16 100 g. V peletě byla DNase inaktivační reagentie. Roztok RNA byl přenesen do nové zkumavky bez RNase.

Byla změřena koncentrace RNA na Nanodropu, Thermo Scientific (1 μ l), případně ponechán alikvot pro analýzu na Bioanalyzeru 2100, Agilent Technologies.

Po provedení čipové analýzy s takto ošetřenými vzorky RNA bylo zjištěno, že díky použití plné krve dochází k preferenční amplifikaci globinových RNA a nedostatečné intenzitě signálu ostatních genů. Proto byly vzorky RNA přečištěny pomocí *GLOBINclear*TM Kitu firmy Ambion (kat. č. AM1980, Applied Biosystems):

K cca 110 μ l vzorku RNA izolované pomocí *RiboPure*TM *Blood Kit*, Ambion z plné krve s *RNAlater*[®] bylo přidáno 11 μ l octanu sodného (*RiboPure*TM), případně 0,35 μ l *GlycoBlue* (AM9515, Ambion, Applied Biosystems) a 300 μ l 100% ethanolu, vše bylo řádně promícháno. Vzorky byly uskladněny na 1 h~~pe~~ v mrazicím boxu při teplotě -20°C . Pak byly centrifugovány při 16 100 g 30 min, 4°C , a supernatant byl opatrně odstraněn. Bylo přidáno 0,7 ml ledového 70% ethanolu, vzorek vortexován, centrifugován 10 min při 4°C a supernatant opatrně odstraněn. Peleta byla rozpuštěna ve 14 μ l vody bez nukleas (v 15 μ l pokud chceme v tomto kroku měřit koncentraci na Nanodropu).

V průběhu točení byly připraveny potřebné roztoky:

RNA vazebný pufr: Byly přidány 2 ml 100% isopropanolu do koncentráту vazebného pufru, promícháno a skladováno při laboratorní teplotě.

RNA promývací roztok: Byly přidány 4 ml 100% etanolu do koncentráту promývacího roztoku, promícháno a skladováno při laboratorní teplotě.

Kuličky resuspendující směs (1 reakce / 6 reakcí): 10 μ l / 60 μ l RNA vazebné kuličky, 4 μ l / 24 μ l pufru pro RNA kuličky, 6 μ l / 36 μ l 100% isopropanolu. Směs byla homogenizována a skladována při laboratorní teplotě.

Streptavidinové magnetické kuličky (30 μ l / vzorek): do inkubátoru (50°C) byly vloženy zkumavky s 2x hybridizačním pufrém a pufrém pro streptavidinové kuličky minimálně na 15 min, před použitím řádně vortexovány. 6x 30 μ l (180 μ l) homogenizovaných streptavidinových magnetických kuliček bylo pipetováno do čisté 1,5 ml zkumavky, centrifugováno cca 2 s na méně než 1000 g a zkumavka byla umístěna do magnetického stojánku na dobu 3 \times 5 minut (dokud není roztok průsvitný). Supernatant byl opatrně odstraněn

a přidáno 6 x 30 μ l (180 μ l) pufru pro streptavidinové kuličky předehřátého na 50°C, řádně vortexováno a ponecháno inkubovat po dobu nejméně 15 min při 50 °C před dalším použitím. Ke vzorkům RNA ve 14 μ l (1^{12'}10 μ g) byl přidán 1 μ l *Capture Oligo Mix*. Ke směsi bylo přidáno 15 μ l 2x hybridizačního pufru předehřátého na 50°C. Vzorky byly krátce vortexovány a rychle centrifugovány při max. 1000 g a ponechány inkubovat při 50°C po dobu 15 minut (dojde k hybridizaci s globinovou mRNA).

Připravené streptavidinové magnetické kuličky umístěné v inkubátoru byly jemně vortexovány a centrifugovány méně než 2 s na max. 1000 g. Ke každému vzorku RNA bylo přidáno 30 μ l připravených streptavidinových magnetických kuliček, směsi řádně promíchány vortexováním, stočeny cca 2 s na 1000 g a ponechány inkubovat 30 min při teplotě 50°C. Po vyjmutí z inkubátoru jemně vortexovány, centrifugovány cca 2 s na max. 1000 g a zkumavky umístěny do magnetického stojánu na 3^{12'}5 min (dokud není roztok průsvitný). Supernatanty obsahující celkovou RNA bez globinové mRNA opatrně odstraněny a přeneseny do čistých 1,5 ml zkumavek.

Byl předehřát eluční pufr na 58°C. Ke každému RNA vzorku bylo přidáno 100 μ l RNA vazebného pufru. Kuličky resuspendující směs řádně homogenizována vortexováním a následně přidáno 20 μ l směsi ke každému vzorku. Směs 10 s řádně vortexována, aby došlo k navázání RNA na kuličky, centrifugována cca 2 s na 1000 g. Zkumavky byly umístěny do magnetického stojánu na 3^{12'}5 minut (dokud není roztok průsvitný). Opatrně byly odstraněny veškeré supernatanty. Zkumavky byly vyjmuty z magnetického stojánu. Až poté bylo ke každému vzorku přidáno 200 μ l RNA promývacího roztoku, řádně 10 s vortexováno, krátce a jemně stočeno (viz výše). Zkumavky se vzorky umístěny do magnetického stojánu na 3^{12'}5 minut než došlo k usazení magnetických kuliček s navázanou RNA, opatrně byl odstraněn veškerý supernatant a zkumavky vyjmuty ze stojánu. Zkumavky krátce a jemně stočeny, umístěny zpět do magnetického stojánu a malou špičkou byla odstraněna veškerá kapalina. Zkumavky se vzorky vyndány z magnetického stojánu a otevřené nechány 5 min na vzduchu oschnout. Ke každému vzorku přidáno 30 μ l elučního pufru předehřátého na 58°C, řádně 10 s vortexováno a směs inkubována 5 min při 58°C. Řádně 10 s vortexováno a krátce a jemně centrifugováno (cca 2 s na 1000 g). Vzorky byly umístěny do magnetického stojánu na 3 až 5 minut než došlo k usazení magnetických kuliček. Supernatant obsahující přečištěnou celkovou RNA byl opatrně odebrán do čistých 1,5 ml zkumavek.

Kritickým parametrem se stal poměr absorbancí u 260 nm ku 230 nm, který má být pro čípkovou analýzu vyšší než 1,5. Pro zajištění dostatečné kvality musela být prováděna finální

etanolová precipitace. K cca 30 μl vzorku RNA izolované pomocí *RiboPureTM Blood Kit*, Ambion z plné krve s *RNAlater[®]* přečištěné kitem *GLOBINclearTM Whole Blood Kit* byly přidány 3 μl octanu sodného (*RiboPureTM*) a 85 μl 100% etanolu. Řádně promícháno a vzorky uskladněny přes noc v mrazicím boxu při teplotě -20°C . Ráno centrifugováno při 16 100 g 30 min, 4°C , supernatant opatrně odstraněn, peleta promyta 0,7 ml vychlazeného 70% etanolu, vzorek vortexován, centrifugován 15 min při 4°C a poté veškerý supernatant opatrně odstraněn. Pelety rozpuštěny ve 14 μl vody bez nukleas či dle velikosti pelety a vstupní koncentrace ve větším objemu. Byla změřena koncentrace přečištěné a přesrážené RNA na Nanodropu (1 μl), integrita stanovena pomocí Bioanalyzeru 2100, Agilent Technologies (1 μl) - *Agilent RNA 6000 Nano/Pico Kit* (kat. č. 5067-1511/5067-1513).

Pokud to bylo z hlediska výchozího materiálu možné, aby kvantitativní i kvalitativní parametry byly v pořádku ($\text{RIN} > 7$; $A_{260/280\text{nm}} > 1,8$; $A_{260/230\text{nm}} > 1,5$), byla připravená RNA dále amplifikována pomocí *Illumina[®] TotalPrep RNA Amplification Kit*, Ambion (kat. č. IL1791). Systém biotinem označí amplifikovanou RNA k hybridizaci na čípech. Protokol se skládá z reversní transkripce s využitím oligo(dT) primeru pro syntézu cDNA obsahující T7 promotorovou sekvenci. K získané cDNA je syntetizován druhý řetězec při využití DNA polymerasy a RNasy H. Přečištěný cDNA produkt vstupuje do in-vitro transkripce s T7 RNA polymerasou. Výsledná cRNA je následně přečištěna od neinkorporovaných nukleotidů, solí, enzymů a anorganického fosfátu. Vstupní množství RNA, které jsme využívali pro amplifikaci, bylo 150 ng v maximálně 11 μl . Pro jednotlivé kroky byl využit *DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler*, Bio-Rad Laboratories.

RNA vzorky o objemu 11 μl (150 ng RNA) byly umístěny do sterilních 0,2 ml zkumavek bez RNas. Případně byly do daného objemu naředěny vodou bez nukleas. Při laboratorní teplotě byl připraven master mix pro reversní transkripci - syntézu jednořetězcové DNA:

- 1 μl T7 oligo(dT) primer
- 2 μl 10x pufr pro první řetězec (objemy jsou udány na jednu 20 μl reakci)
- 4 μl směs dNTP (složky byly přidávány v daném pořadí)
- 1 μl inhibitor RNas
- 1 μl ArrayScript (enzym).

Master mix byl jemně vortexován a krátce centrifugován (5s). Bylo přidáno 9 μl master mixu do každého vzorku RNA, důkladně promícháno pipetováním (2-3x) a 3-4x cvrnkuto do zkumavek. Krátce centrifugováno a umístěno do bloku cykleru (42°C). Reakce byly inkubovány 2 hod při 42°C , poté krátce stočeny a dány na led (4°C).

Na ledu byl připraven master mix pro syntézu druhého řetězce cDNA:

- 63 μ l voda bez nukleas
- 10 μ l 10x pufr pro druhý řetězec (objemy jsou udány na jednu 100 μ l reakci)
- 4 μ l směs dNTP (složky byly přidávány v daném pořadí)
- 2 μ l DNA polymerasy
- 1 μ l RNasy H.

Master mix byl jemně vortexován a krátce stočen (5s). Bylo přidáno 80 μ l master mixu ke každému vzorku, důkladně promícháno pipetováním (2-3x) a 3-4x cvrknuto do zkumavek. Krátce centrifugováno, umístěno do předem vychlazeného bloku cykleru na 16°C. Reakce byly inkubovány 2 h při 16°C, poté 4°C.

Získaná cDNA byla přečištěna. Centrifugace byly prováděny při 10 000 g a laboratorní teplotě (otáčky nesmí překročit 16 000 g, došlo by k poškození skleněného filtru a vlákna filtru by mohla kontaminovat eluát). Bylo přehřáto dostatečné množství vody bez nukleas pro eluci na 55°C (při teplotě \geq 58°C dochází k částečné denaturaci cDNA) nejméně 10 min před použitím. Do promývacího pufru bylo přidáno 24 ml etanolu.

Ke vzorkům cDNA bylo přidáno 250 μ l cDNA vazebného pufru, důkladně promícháno pipetováním (2-3x), 3-4x poklepáno na zkumavky a krátce stočeno. Kolonky byly umístěny do dodaných promývacích zkumavek a na jejich střed naneseny vzorky (cDNA s cDNA vazebným pufrům). Centrifugováno 1 min 10 000 g, eluát byl zlikvidován. Na každou kolonku bylo aplikováno 500 μ l promývacího pufru, centrifugováno 1 min 10 000 g a eluát byl zlikvidován. Vzorky na kolonkách byly opětovně 1 min centrifugovány 10 000 g (odstranění veškerého promývacího pufru). Kolonky s cDNA byly přendány do elučních zkumavek. Na střed kolonek bylo naneseno 10 μ l vody bez nukleas vytemperované na 55°C, necháno 2 min stát při laboratorní teplotě a poté centrifugováno 1,5 min 10 000 g. Na střed kolonek byl nanesen druhý alikvot přehřáté vody bez nukleas - 9 μ l, centrifugováno 2 min 10 000 g.

Získaná dvouřetězcová DNA v cca 17,5 μ l vody z výsledného eluátu byla použita pro in-vitro transkripci. Při laboratorní teplotě byl připraven master mix pro syntézu cRNA:

- 2,5 μ l T7 10x reakční pufr (objemy jsou udány na jednu 25 μ l reakci)
- 2,5 μ l směs T7 enzymu (složky byly přidávány v daném pořadí)
- 2,5 μ l směs biotinem značených NTP.

Master mix byl jemně vortexován a krátce stočen (5s). Bylo přidáno 7,5 μ l master mixu ke každému vzorku cDNA, důkladně promícháno pipetováním (2-3x) a 3-4x cvrknuto do

zkumavek. Vzorky krátce centrifugovány a umístěny do bloku cykleru, kde byly inkubovány při 37°C po dobu 14 hod, poté 4°C. Reakce byly ukončeny přidáním 75 µl vody bez nukleas ke každému vzorku cRNA a důkladně, ale jemně, vortexovány.

Při následném přečištění došlo k odstranění enzymů, solí a neinkorporovaných nukleotidů. Centrifugace byly prováděny při 10 000 g při laboratorní teplotě (otáčky nesmí překročit 16 000 g, došlo by k poškození skleněného filtru a vlákna filtru by mohla kontaminovat eluát). Bylo přehřáto dostatečné množství vody bez nukleas pro eluci na 60°C nejméně 10 min před použitím a byly připraveny kolonky do sběrných zkumavek. Ke každému vzorku ve 100 µl bylo přidáno 350 µl cRNA vazebného pufru. Ihned bylo přidáno 250 µl 100% etanolu, vzorky 3x promíchány pipetováním, ale nevortexovány a necentrifugovány. Po smísení etanolu se vzorkem byla směs přenesena na střed připravených kolonek, centrifugováno 1 min 10 000 g, eluát byl zlikvidován. Na střed každé cRNA kolonky bylo aplikováno 650 µl promývacího pufru, centrifugováno 1 min 10 000 g a eluát byl zlikvidován.

Zkumavky

s kolonkami byly centrifugovány další 1 min 10 000 g (odstranění veškerého promývacího pufru) a kolonky poté byly umístěny do nových sběrných zkumavek. Na střed kolonky bylo nanášeno 100 µl vody bez nukleas vytemperované na 60°C, necháno 2 min stát při laboratorní teplotě a centrifugováno 1,5 min 10 000 g.

Byla změřena koncentrace amplifikované cRNA na Nanodropu (1 µl). Pokud byla nižší než 150 ng/µl či byl nízký poměr absorbancí u 260 nm ku 230 nm, tak byly vzorky precipitovány. Ke vzorku přečištěné cRNA byla přidána 1/10 objemu 3M CH₃COONa, pH 5,2, *RiboPure*TM (10 µl) a 2,5 násobek objemu 100% etanolu (275 µl), důkladně promícháno a ponecháno 60 min v mrazicím boxu při -20°C. Vzorky byly centrifugovány na 16 100 g po dobu 30 až 60 min při 4°C a opatrně byl odstraněn supernatant. Pelety byly promyty 500 µl 70% etanolu, zkumavky centrifugovány na 16 100 g po dobu 15 min při 4°C, supernatant opatrně odstraněn, případně byly znovu rychle centrifugovány a odstraněny i zbytky etanolu. Pelety cRNA byly ponechány cca 2 min na vzduchu, aby oschly. Poté byly suspendovány v požadovaném objemu vody bez nukleas (≥ 12 µl).

Výtěžek závisel na množství a kvalitě poly(A)RNA v celkové RNA. Byla změřena koncentrace na NanoDropu (1 µl) a stanoven profil délek cRNA pomocí Bioanalyzery 2100, Agilent (1 µl), který má být mezi 250-5500 nt s většinou cRNA mezi 1000-1500 nt.

Pokud byla finální koncentrace cRNA ≥ 150 ng/µl a profil v pořádku, byly vzorky použity pro hybridizaci na *Human WG6-v2 Expression BeadChip* firmy Illumina.

Byla předehřáta hybridizační pec s výkyvnou plošinou na 58°C alespoň 1 hod před použitím. Vzorky byly připraveny tak, aby vstupní množství cRNA do hybridizace bylo 1,5 µg. Maximální možný objem je 10 µl, případně vzorky na tento objem byly doplněny vodou bez nukleas a promíchány. Po dobu 10 min nechány stát při laboratorní teplotě, aby došlo k řádnému rozpuštění. Do hybridizační pece vytemperované na 58°C byly na 10 min vloženy zkumavky s *GEX-HYB* a *GEX-HCB* (pro rozpuštění skladováním precipitovaných solí). Ke každému vzorku 1,5 µg cRNA v 10 µl vody bez nukleas bylo přidáno 20 µl *GEX-HYB*, byly jemně vortexovány a rychle centrifugovány.

Illumina Hyb Chamber Basket byl umístěn do *BeadChip Hyb Chamber*. Bylo pipetováno 200 µl *GEX-HCB* do každého ze dvou reservoárů pro zvlhčující pufr v každé *Hyb Chamber*. Pufr byl dáván pouze do komor, které byly použity. *Hyb Chamber* byl utěsněn víkem a nechán při laboratorní teplotě (~22°C) než byly čipy dány do *Hyb Chamber*. Na laboratorní teplotu vytemperované čipy byly vyndány z jejich obalů (*Human WG6-v2 Expression BeadChip*). Byly používány výhradně rukavice bez pudru. Čipy byly pinzetou drženy za krycí fólii v oblasti barkódu, vloženy do *Hyb Chamber Insert* tak, aby jejich směr souhlasil se symbolem barkódu na *Insertu*.

Analyzované vzorky cRNA smíchané s *GEX-HYB* byly zahřáty na 65°C po dobu 5 min. Jemně vortexovány a rychle centrifugovány, aby byla kapalina shromážděna na dně zkumavky. Před dalším použitím vzorky ponechány při laboratorní teplotě vychladnout a ihned poté byly pipetovány na čipy.

Hyb Chamber Inserts obsahující čipy byly umístěny do *Hyb Chamber* a bylo pipetováno 30 µl analyzovaného vzorku na vstupní otvor každého pole. *Hyb Chamber* opatrně uzavřen víkem a inkubován v hybridizační peci při 58°C po dobu 16 hodin s rychlostí kyvů plošiny nastavenou na 5. Před ukončením práce v daný den byl ještě připraven 1x vysokoteplotní promývací pufr přidáním 50 ml 10x koncentrovaného zásobního roztoku ke 450 ml vody bez RNAs. Teplota zahřívacího bloku naplněného 500 ml 1x vysokoteplotního promývacího pufru byla nastavena na 55°C, víko bylo zavřeno a ponecháno hřát přes noc.

Další den byl připraven promývací roztok E1BC přidáním 3 ml E1BC pufru do 1 l vody bez RNAs. Na laboratorní teplotu byl předehřát blokovací pufr E1 (4 ml/čip). Bylo připraveno odpovídající množství blokovacího pufru E1 (2 ml/čip) se streptavidin-Cy3 (2 µl zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml na jeden čip). Byla použita jedna kónická zkumavka pro všechny aktuálně zpracovávané čipy a před detekcí byl tento roztok uchováván v temnu.

Z hybridizační pece byla vyndána *Hyb Chamber* a rozebrána. Čipy byly ponořeny do 250 ml promývacího roztoku E1BC a byla z nich opatrně oddělena krycí fólie. Rozebrání a umístění v E1BC promývacím roztoku bylo opakováno pro všechny aktuálně zpracovávané čipy. Čipy byly následně umístěny do držáku, který byl za rukojeť přemístěn do *Hybex Waterbath Insert* obsahujícího 1x vysokoteplotní promývací pufr přes noc přehřátý na 55°C. Se zavřeným víkem byly čipy bez třepání inkubovány 10 min. Během této inkubace bylo připraveno 250 ml promývacího roztoku E1BC v čisté barvicí nádobě. Ihned po 10 min inkubaci s vysokoteplotním promývacím pufrům byl držák s čipy přesunut do připraveného čerstvého promývacího roztoku E1BC. Držák krátce a intenzivně v nádobě protřepán pohybem nahoru a dolů, poté na 5 min umístěn na rotační třepačku na maximální rychlost, při které nedocházelo k vyšplíchnutí roztoku z nádoby (120 rpm). Přemístěn do čisté barvicí nádoby s 250 ml 100% etanolu. Krátce a důsledně pomocí rukojeti držáku byly čipy proprány a poté 10 min třepány na orbitální třepačce při maximální rychlosti. Čipy byly přemístěny do čisté barvicí nádoby s 250 ml promývacího roztoku E1BC, krátce a intenzivně promíchány a třepány na orbitální třepačce po dobu 2 min. Čipy byly přemístěny do připravených *Wash Tray* se 4 ml blokovacího pufru E1, dány na výkyvnou desku (analyzovaná plocha se vzorky musí vždy směřovat nahoru) a kývány na střední rychlost po dobu 10 min. Čipy byly přendány do čisté *Wash Tray* se 2 ml blokovacího pufru E1 + streptavidin-Cy3, přikryty víkem a kývány na střední rychlost dalších 10 min. Čipy byly přesunuty do připravené čisté barvicí nádoby s 250 ml promývacího roztoku E1BC, krátce proprány a poté 5 min rotačně třepány při laboratorní teplotě. Čipy v držáku byly přesunuty do centrifugy s rotorem na mikrodestičky a točeny při laboratorní teplotě na 270 rev po dobu 4 min. Usušené čipy byly ihned skenovány pomocí *Illumina® BeadArray Readeru* na skenování faktor 1,0 a 1,5 a získaná data jsou uchovávána na DVD a webovém úložišti dat.

Příklad 2: Statistické vyhodnocení expresního profilu

Předkládaný vynález je doložen výsledky, které jsme obdrželi na základě celogenomové analýzy vzorků periferní krve získaných od jedinců hospitalizovaných v letech 2006-2009 v Městské nemocnici Čáslav či kardiologické klinice v Pardubicích s diagnózou primárního akutního infarktu myokardu a párových kontrolních osob hospitalizovaných v Městské nemocnici v Čáslavi ve stejném období z důvodu komplikací pohybového ústrojí. Věk případů byl omezen hranicí 80 let. Párové kontrolní osoby nesměly mít pozitivní historii

výskytu závažných kardiovaskulárních onemocnění a byly k odpovídajícím případům vybírány tak, aby docházelo k podstatné shodě v rizikových faktorech výskytu akutního infarktu myokardu. Zejména byla požadována shoda v pohlaví, věku (kontroly mohly být o maximálně 5 let starší než případy) a shodný musel být též status diabetu mellitu a kuřácký status. Vzorky byly analyzovány pomocí technologie firmy Illumina, přičemž byly použity čipy verze 2 (*Human WG6-v2 Expression BeadChip*).

Ke genetickému vyšetření pacientů s akutním infarktem myokardu byly zařazovány osoby, které byly přijaty či ambulantně ošetřeny s diagnosou akutního infarktu myokardu (AIM) na příjmové ambulanci Interního oddělení MN Čáslav. Do souboru byli rovněž zařazováni pacienti, kteří byli vezeni posádkou rychlé záchrané služby přímo na Kardiologickou kliniku v Pardubicích, kde byl na koronární jednotce proveden odběr krevního vzorku. Odběr byl vždy proveden po podepsání „Informovaného souhlasu“ pacientem. Smíchání vzorků venózní krve s *RNAlater*[®], jejich uskladnění a transport krevních vzorků byly prováděny dle pracovních protokolů v souladu s platnými právními předpisy a veškerá data ke vzorkům jsou uložena v příslušných databázích.

Akutní infarkt myokardu byl diagnostikován na základě anamnestických údajů, EKG křivky a laboratorního průkazu nekrosy myokardu. Byl definován jako bolest na hrudi nebo její ekvivalent trvající alespoň 10 min v posledních 24-ti hodinách s elevací úseku ST na EKG křivce (STEMI), či bez elevací ST (NONSTEMI). Biochemický průkaz nekrózy byl stanovován v naší laboratoři vyšetřením Troponinu I. Jako pozitivní hodnotu Troponinu I bylo považováno překročení horního limitu normální hodnoty v čáslavské laboratoři, tj. 0,3 µg/l. Jako pomocná diagnostická metoda byla používána echokardiografie k průkazu regionální poruchy kinetiky levé komory v povodí „infarktové tepny“. Jako standardní panel vyšetření pacientů s podezřením na AIM byl vyšetřován Troponin I okamžitě při přijetí a dále ve 4^{1/2} hodinovém intervalu v prvních 24 hodinách, AST, ALT, KO, koagulace (QT, APTT), glykémie, iontogram, urea, kyselina močová, lipidogram, CRP, u diabetiků HBA1c. Vyšetření CK a CK-MB mass a LD bylo prováděno nepravidelně dle uvážení lékaře.

Studie zahrnovala šestiměsíční sledování pacientů s akutním infarktem myokardu od okamžiku jeho výskytu. V návaznosti na zvolený statistický design byla skupina pacientů s výskytem akutního infarktu myokardu rozdělena na osoby, které z kardiovaskulárních příčin zemřely v průběhu šestiměsíčního sledování (**AIMD6**, 4 osoby) a na osoby, které přežily déle (**AIM**, 41 osob), párové kontroly čítaly dalších 45 osob. Tabulka 1 ukazuje vybraná data osob v analyzovaném souboru a základní data ke zpracovaným vzorkům.

Tabulka 1: Základní data k osobám z analyzovaného souboru a k analyzovaným krevním vzorkům odebraným z těla těchto pacientů

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	μg cRNA
C129	AIM	Muž	1948	Ne	Ne	Ano (20)	243,68	7,8	8,522
C184	AIM	Muž	1947	Ne	Ne	Ano (10)	163,76	8,8	8,813
C056	AIM	Muž	1953	Ne	Ne	Ano (15)	109,2	7,4	13,577
P008	AIM	Žena	1949	Ne	Ne	Ne	41,9	8,1	8,752
P009	AIM	Muž	1951	Ne	Ne	Ano (2)	28,6	7,1	5,108
C029	AIM	Muž	1955	Ne	Ne	Ne	43,3	7,1	9,496
C048	AIM	Žena	1960	Ne	Ne	Ne	170,3	8,5	16,748
C099	AIM	Muž	1951	Ne	Ne	Ne	261,2	8,0	10,146
C170	AIM	Žena	1929	Ne	Ne	Ne	404,7	6,1	2,390
C172	AIM	Žena	1931	Ne	Ano	Ne	353,0	7,7	8,093
C181	AIM	Žena	1934	Ne	Ano	Ne	195,2	8,1	8,633
C069	AIM	Muž	1941	Ne	Ne	Ne	185,3	8,7	6,997
P011	AIM	Muž	1947	Ne	Ne	Ne	245,2	6,9	4,194
C147	AIM	Muž	1945	Ne	Ne	Ne	317,5	6,7	5,176
C005	AIMD6	Muž	1939	Ano	Ne	Ne	89,5	8,1	7,351
C053	AIMD6	Žena	1935	Ano	Ne	Ne	327,1	7,7	8,389
P010	AIMD6	Žena	1928	Ano	Ano	Ne	188,3	8,1	8,248
C185	AIM	Muž	1937	Ne	Ano	Ne	191,54	8,2	7,695
C195	AIM	Muž	1946	Ne	Ano	Ne	293,41	8,2	13,269
C284	AIM	Muž	1953	Ne	Ne	Ano (20)	210,06	7,4	8,364
C194	AIM	Muž	1933	Ne	Ne	Ne	160,62	8,0	15,856
C238	AIM	Muž	1934	Ne	Ano	Ne	204,88	7,8	8,750
C078	AIMD6	Muž	1937	Ano	Ano	Ne	170,38	8,2	15,901
C016	AIM	Muž	1944	Ne	Ne	Ne	84	7,1	6,802
C074	AIM	Muž	1943	Ne	Ne	Ne	209,2	6,9	7,509
P003	AIM	Žena	1936	Ne	Ne	Ano (10)	113,8	6,8	7,505
C037	AIM	Žena	1933	Ne	Ano	Ne	226,2	8,5	3,76
C036	AIM	Žena	1934	Ne	Ne	Ne	31,4	6,2	2,986
C030	AIM	Muž	1951	Ne	Ne	Ne	152,2	8,7	3,186
C108	AIM	Muž	1955	Ne	Ne	Ano (15)	197,9	7,5	10,566
C119	AIM	Muž	1948	Ne	Ne	Ano (2)	365	7,1	6,499
C065	AIM	Žena	1933	Ne	Ano	Ne	79,7	7,6	2,536
C039	AIM	Žena	1959	Ne	Ano	Ne	434,2	6,5	7,939
C125	AIM	Muž	1928	Ne	Ano	Ne	184,7	8,4	4,120
C139	AIM	Muž	1939	Ne	Ne	Ne	126,5	8,4	7,674
C120	AIM	Muž	1949	Ne	Ne	Ne	103,6	8,7	4,480
C063	AIM	Žena	1941	Ne	Ne	Ne	282,9	8,5	4,526

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	μg cRNA
C205	AIM	Muž	1944	Ne	Ano	Ano (10)	85,7	8,4	7,141
C174	AIM	Muž	1950	Ne	Ne	Ne	127,97	8,0	6,820
C182	AIM	Muž	1954	Ne	Ne	Ano (40)	97,47	8,1	12,236
C289	AIM	Muž	1957	Ne	Ne	Ne	213,42	8,0	9,322
C019	AIM	Žena	1930	Ne	Ne	Ne	36,59	7,7	3,043
C013	AIM	Muž	1939	Ne	Ano	Ne	194,74	7,9	4,813
C269	AIM	Muž	1938	Ne	Ne	Ne	320,41	8,2	4,974
P019	AIM	Žena	1931	Ne	Ano	Ne	86,65	7,9	4,535
C083	CTRL	Muž	1947	Ne	Ne	Ano (5)	186,6	8,4	15,045
C250	CTRL	Muž	1946	Ne	Ne	Ano (25)	10,04	7,7	1,907
C138	CTRL	Muž	1950	Ne	Ne	Ano (15)	290,9	7,1	6,189
C081	CTRL	Žena	1949	Ne	Ne	Ne	58,4	6,7	9,044
C149	CTRL	Muž	1949	Ne	Ne	Ano (20)	47,39	7,6	5,758
C014	CTRL	Muž	1955	Ne	Ne	Ne	51,74	7,2	2,403
C133	CTRL	Žena	1960	Ne	Ne	Ne	177,2	8,6	9,447
C101	CTRL	Muž	1951	Ne	Ne	Ne	237,38	8,7	10,019
C109	CTRL	Žena	1928	Ne	Ne	Ne	302,8	8,5	9,941
C022	CTRL	Žena	1929	Ne	Ano	Ne	232,48	7,6	8,534
C023	CTRL	Žena	1931	Ne	Ano	Ne	223,54	8,1	4,486
C213	CTRL	Muž	1941	Ne	Ne	Ne	124,24	7,8	7,42
C282	CTRL	Muž	1948	Ne	Ne	Ne	297,68	7,0	3,988
C260	CTRL	Muž	1946	Ne	Ne	Ne	147,18	8,5	8,003
C010	CTRL	Muž	1938	Ne	Ne	Ne	301,91	8,0	7,3
C163	CTRL	Žena	1934	Ne	Ne	Ne	112,15	7,9	6,127
C208	CTRL	Žena	1928	Ne	Ano	Ne	246,12	7,8	4,79
C348	CTRL	Muž	1937	Ne	Ano	Ne	94,68	7,8	14,11
C304	CTRL	Muž	1946	Ne	Ano	Ne	213,16	8,5	17,068
C302	CTRL	Muž	1952	Ne	Ne	Ano (10)	80,07	8,2	15,571
C098	CTRL	Muž	1932	Ne	Ne	Ne	200,5	7,3	8,272
C272	CTRL	Muž	1930	Ne	Ano	Ne	91,86	8,3	8,709
C287	CTRL	Muž	1936	Ne	Ano	Ne	145,6	8,3	8,272
C198	CTRL	Muž	1944	Ne	Ne	Ne	270,3	7,2	7,32
C204	CTRL	Muž	1943	Ne	Ne	Ne	249,8	6,6	8,982
C209	CTRL	Žena	1937	Ne	Ne	Ano (10)	191	7,4	13,377
C124	CTRL	Žena	1933	Ne	Ano	Ne	64,91	8,6	2,198
C110	CTRL	Žena	1934	Ne	Ne	Ne	207,59	8,0	4,37
C150	CTRL	Muž	1952	Ne	Ne	Ne	130,5	8,4	2,566
C058	CTRL	Muž	1954	Ne	Ne	Ano (8)	327,4	9,2	6,875
C066	CTRL	Muž	1947	Ne	Ne	Ano (10)	345,4	6,2	8,219
C118	CTRL	Žena	1934	Ne	Ano	Ne	79,4	6,0	9,242
C210	CTRL	Žena	1960	Ne	Ano	Ne	577,3	7,4	3,562

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	μg cRNA
C310	CTRL	Muž	1929	Ne	Ano	Ne	127,05	8,5	6,859
C294	CTRL	Muž	1939	Ne	Ne	Ne	120,56	7,0	7,361
C187	CTRL	Muž	1949	Ne	Ne	Ne	123,56	7,5	3,689
C011	CTRL	Žena	1940	Ne	Ne	Ne	28,12	7,3	2,632
C116	CTRL	Muž	1941	Ne	Ano	Ano (20)	111,21	7,9	10,515
C274	CTRL	Muž	1950	Ne	Ne	Ne	209,68	7,8	4,306
C168	CTRL	Muž	1953	Ne	Ne	Ano (20)	69,67	8,5	10,008
C061	CTRL	Muž	1955	Ne	Ne	Ne	164,27	8,3	8,27
C106	CTRL	Žena	1928	Ne	Ne	Ne	27,9	8,3	5,31
C207	CTRL	Muž	1937	Ne	Ano	Ne	82,02	8,7	10,79
C206	CTRL	Muž	1934	Ne	Ne	Ne	142,91	7,8	4,888
C221	CTRL	Žena	1929	Ne	Ano	Ne	210,16	8,0	4,3

Tabulky 2 a 3 shrnují popisné charakteristiky relevantních klinických a demografických údajů. Kompletní datový soubor obsahoval záznamy o 45 pacientech s primárním výskytem akutního infarktu, z toho 41 ve skupině AIM a 4 ve skupině AIMD6, a dále záznamy o 45 kontrolních pacientech. V datovém souboru bylo 60 mužů a 30 žen. Ve skupině AIM bylo 13 žen a 28 mužů, ve skupině AIMD6 2 muži a 2 ženy a ve skupině CTRL bylo 15 žen a 30 mužů. Ve skupině AIM bylo 10 kuřáků a 31 nekuřáků, ve skupině AIMD6 byly všechny osoby nekuřáci a ve skupině CTRL bylo 10 kuřáků a 35 nekuřáků. Co se týče diabetu mellitu II. typu, ve skupině AIM bylo 12 osob s touto diagnózou a 29 bez ní, ve skupině AIMD6 byly 2 osoby s touto diagnózou a 2 bez ní a konečně ve skupině CTRL (Kontroly) bylo 14 pacientů s touto diagnózou a 31 bez ní.

Tabulka 2: Počty pacientů a procentuální vyjádření zastoupení popisných charakteristik kategoriálních veličin

Proměnná		Počty a procentuální údaje ve skupinách		
		AIM	AIMD6	Kontroly
Pohlaví	Muži	28 (68 %)	2 (50 %)	30 (67 %)
	Ženy	13 (32 %)	2 (50 %)	15 (33 %)
Kouření	Kuřáci	10 (24 %)	0 (0 %)	10 (22 %)
	Nekuřáci	31 (76 %)	4 (100 %)	35 (78 %)

Diabetes mellitus II. typu	ANO	12 (29 %)	2 (50 %)	14 (31 %)
	NE	29 (71 %)	2 (50 %)	31 (69 %)

Tabulka 3: Popisné charakteristiky spojitých veličin

Skupina	Věk pacienta		
	N	Průměrná hodnota	Směrodatná odchylka
AIM	41	63,6	9,18
AIMD6	4	72,3	4,73
Kontroly	45	65,5	9,42

Vzorky venózní krve odebrané od pacientů byly zpracovávány postupem podle Příkladu 1. Data genové exprese byla analyzována pomocí lineárních modelů pro analýzu dat z microarray experimentů „limma“ (Smyth, G. K.: Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments, 2004, *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3, No. 1, Article 3, doi:10.2202/1544-6115.1027), navržených pro statistický a grafický systém R (<http://www.r-project.org>) v rámci projektu Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Data byla normalizována pomocí kvantilové normalizace (Smyth G.K. and Speed T.P.: Normalization of cDNA microarray data, 2003, *Methods* 31, 265-273, doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071). Šum signálu na pozadí čipu, u kterého se předpokládá normální rozložení, byl odstraněn pomocí konvolučního modelu. Tento model předpokládá, že signál z čipů čtený pomocí skeneru je směsí normálně rozděleného šumu a exponenciálně rozděleného signálu intenzit genové exprese (Ritchie M.E., Silver J., Oshlack A., Holmes M., Diyagama D., Holloway A., Smyth G.K.: A comparison of background correction methods for two-colour microarrays, 2007, *Bioinformatics* 23, 2700-2707, PMID:17720982).

Medicínská hypotéza předpokládala možnost genetické determinace (predispozice) výskytu akutního infarktu myokardu vzhledem k obecné české populaci jak v populaci pacientů přežívajících období šestiměsíčního sledování (kontrast AIM vs Kontroly), tak též u pacientů v tomto období zemřelých (kontrast AIMD6 vs Kontroly). Podobně byla předpokládána vyšší genetická zátěž u pacientů s výskytem infarktu, kteří zemřeli v období šestiměsíčního sledování, v porovnání s populací pacientů přežívající srdeční příhodu dlouhodoběji (kontrast AIMD6 vs AIM). Párový statistický design byl zvolen s cílem snížit počty odhadovaných parametrů, které by jinak bylo nutné zohlednit jako možné zavádějící faktory (pohlaví, věk,

výskyt kouření a diabetu mellitu) a dále odlišit klinickou a genetickou komponentu komplexního rizika výskytu akutní srdeční příhody. Síla statistických testů je navíc v párovém designu v porovnání s dvou- a vícevýběrovými plány statistických studií typicky vyšší.

Vzhledem k tomu, že o Illumina čípech je známo, že aktuální naměřené hodnoty intenzit genové exprese bývají na jednotlivých čípech plošně posunuty o neznámou konstantu, je tuto skutečnost nutné zohlednit v rámci statistické analýzy a odpovídající korekční konstanty je třeba odhadnout v lineárním modelu. Z tohoto důvodu také není vhodné uvažovat o korelacích mezi naměřenými hodnotami intenzit genové exprese a hodnotami klinických proměnných. Relevantní závěry proto nutně vycházejí pouze z výsledků obdržných z lineárního modelu, kde jsou lineární efekty jednotlivých čipů na hodnoty intenzit genové exprese adjustovány. Lineární statistický model (*limma*) zohledňoval vliv použitého čipu na hodnoty intenzit genové exprese. Intenzity genové exprese vstupovaly do lineárního modelu jako dvojkové logaritmy původních hodnot. Obrázky 2a a 2b ukazují diagnostiku lineárního modelu pro logaritmovaná data intenzit genové exprese při základu 2 pro všechny tři uvažované kontrasty pomocí Q-Q kvantilových grafů. Ideální kvantilový Q-Q graf by měl mít shodné empirické a teoretické hodnoty kvantilů, takže všechny zobrazené hodnoty by ležely na přímce. Q-Q grafy shodně potvrzují, že použití lineárního modelu je ve všech třech případech adekvátní. Lineární model můžeme schematicky popsat následovně:

$$\log_2(\text{intenzita}) \sim \text{pár} + \text{skupina},$$

přičemž proměnná „pár“ identifikuje dvojici případu a odpovídající párové kontroly, která byla vždy umístěna na stejném Illumina čipu. Proměnná „skupina“ kóduje příslušnost k populacím AIM, AIMD6 a Kontrol. Tento model je zobecněnou verzí párového testu.

Množiny genů identifikované na základě výsledků z lineárního *limma* modelu byly dále analyzovány pomocí PAM modelu, s jehož pomocí byla pro každý kontrast zjištěna podmnožina genů s prediktivními vlastnostmi v nezávislých výběrech. Lineárním modelem dříve zjištěné množiny genů mohou až „příliš dobře“ vysvětlovat konkrétní data, ze kterých jsou výsledky odvozeny (tzv. „over-fitting“), ovšem na úkor prediktivity v nezávislých výběrech. K tomuto účelu byl využit PAM model („Predictive Analysis for Microarrays“), který pomocí křížové validace a využití „shrinkage“ principu identifikuje podmnožinu genů, která by měla mít optimální vlastnosti z hlediska určování pravděpodobné příslušnosti sledovaných jedinců k některé ze sledovaných populací (AIMD6, AIM a Kontroly).

Za diferenciálně exprimované byly obecně považovány geny, které splňovaly jak podmínku statistické významnosti na hladině 5%, tak též klinické významnosti, která předpokládá, že dvojkový logaritmus podílu hodnot intenzit genové exprese je v absolutní hodnotě větší nebo roven jedné. Statistická analýza prokázala statisticky i klinicky významnou asociaci mezi krátkodobou úmrtností subjektů (v horizontu 6 měsíců po primární akutní srdeční příhodě) a jejich expresním genovým profilem u 15 genů v případě diagnostického kontrastu AIMD6 vs Kontroly a u 10 genů v případě prognostického kontrastu AIMD6 vs AIM. Prediktivní diagnostická množina genů pro kontrast AIM vs Kontroly čítala 13 genů a v *limma* modelu byla pouze statisticky signifikantní na hladině statistické významnosti $\alpha = 0,10$. Tuto množinu již nebylo možné dále redukovat pomocí PAM modelu.

Popis výsledků

Geny resp. transkripty uvedené v následujících tabulkách specifikují *prediktivní diagnostickou a prognostickou množinu genů* pro kontrast AIMD6 vs. AIM, které byly získány následujícím postupem: nejprve byla pomocí *limma* modelu („Linear Models for Microarray Data“, <http://bioinf.wehi.edu.au/limma/>) na úrovni celého lidského genomu (na Illumina čípech verze 2 bylo zmapováno celkem 25036 genů) identifikována množina statisticky ($q\text{-hodnota} \leq 0,05$) i klinicky významných genů ($|\log_2\text{-fold change}| \geq 1$, tj. alespoň dvojnásobná změna intenzity genové exprese směrem nahoru nebo dolů). Tato množina byla následně redukována aplikací prediktivního PAM modelu (Prediction Analysis for Microarrays, <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/PAM/>), navrženého k vyhledávání množin genů s prediktivními vlastnostmi v nezávislých výběrech. Výskyt opakovaných pozorování (tj. technických replikátů) u 7 pacientů byl na úrovni *limma* modelu ošetřen použitím smíšeného lineárního modelu pro korelovaná data. Sekvence sond jsou uvedeny v tabulce 5.

V Tabulce 4 je uvedena prediktivní množina genů identifikovaná v rámci vynálezu, která se u pacientů s výskytem akutního infarktu myokardu jeví z hlediska genové exprese jako prognostická ve smyslu zvýšeného rizika úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací, a to v krátkodobém časovém horizontu (tj. do 6 měsíců od okamžiku výskytu srdeční příhody). Jedná se o sestavu 10 genů (gen CLYBL byl identifikován ve dvou transkriptech, Illumina ID 3180392 a 6550437), jejichž expresní intenzity, stanovené do čtyřiačtyřiceti hodin od okamžiku primárního výskytu akutní srdeční události, se ve skupinách pacientů zemřelých v

období 6 měsíců po srdeční příhodě (AIMD6) a skupině pacientů přežívající výskyt srdeční události po dobu sledování 6 měsíců (AIM) statisticky i klinicky významně odlišovaly. Tato množina exprimovaných genů charakterizuje zvýšenou stresovou zátěž organismu, která měla za následek úmrtí pacienta v průběhu šestiměsíčního sledování od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu v důsledku kardiovaskulárních komplikací.

Uvedená množina 10 genů byla stanovena na základě celogenomové analýzy genové exprese vzorků lidské venózní krve odebrané z těla pacientů s primárním výskytem infarktu myokardu. Průměrné hodnoty logaritmované genové exprese při základu 2 v populacích AIMD6 a AIM jsou uvedeny v tabulce 4. Simultánně zvýšené hodnoty intenzit genové exprese 3 genů (ADORA3, ERLIN1 a FLT3) a současně hodnoty snížené u 7 genů/transkripčů (RefSeq_ID "M97723", CLYBL, TCEA3, RefSeq_ID "BC070337", HSD17B8, AXIN2 a RefSeq_ID "CR596519") indikují příslušnost pacienta k rizikové populaci AIMD6. Obecně naznačují zvýšené riziko úmrtí pacienta v krátkodobém časovém horizontu (do 6 měsíců od okamžiku výskytu srdeční příhody) v důsledku výskytu akutního infarktu myokardu. Diagnóza na základě exprese uvedených genů, stanovené jak je popsáno v tomto vynálezu, by měla implikovat zvýšenou post-traumatickou léčebnou péči o tyto pacienty, jejichž prognóza je z hlediska přežití v krátkodobém časovém horizontu od okamžiku výskytu srdeční příhody statisticky i klinicky významně méně příznivá.

Tabulka 4: Prediktivní prognostická množina genů pro kontrast AIMD6 vs AIM

Illumina ID	Název / Lokus genu	RefSeq_ID	Průměrná exprese	log ₂ FC	q-hodnota	Pravděpod. Diff. Expr.
4730669	ADORA3	NM_020683.5	6,33	1,78	0,0490	0,852
6940246	(M97723)	M97723	7,05	-1,52	0,0130	0,997
1690309	ERLIN1	NM_006459.2	6,79	1,19	0,0490	0,823
3180392	CLYBL	NM_206808.1	6,79	-1,08	0,0234	0,978
5490634	TCEA3	NM_003196.1	7,09	-1,66	0,0381	0,938
6760670	(BC070337)	BC070337	10,81	-1,42	0,0490	0,805
6550437	CLYBL	NM_206808.1	6,53	-1,18	0,0130	0,988
3130019	HSD17B8	NM_014234.3	7,30	-1,06	0,0490	0,818
1230333	FLT3	NM_004119.1	6,04	1,14	0,0490	0,838
5090368	AXIN2	NM_004655.2	7,09	-1,49	0,0388	0,932
670041	(CR596519)	CR596519	11,51	-1,45	0,0490	0,828

Illumina ID ... Illumina identifikátor genu

RefSeq_ID ... NCBI Reference Sequence ID ("Accession number")

Průměrná exprese ... Průměrná hodnota intenzit genové exprese ve spojeném souboru

log₂FC ... Dvojkový logaritmus adjustovaného podílu intenzit ve skupinách AIMD6 a Kontrol

q-hodnota ... Storeyho adjustace dosažené hladiny významnosti pro mnohonásobná porovnávání (Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Aug 5;100(16):9440-5. Epub 2003 Jul 25. PubMed PMID: 12883005; PubMed Central PMCID: PMC170937.)

Pravděpod. Diferenciální Expres ... Pravděpodobnost, že sledovaný gen je skutečně diferenciatně exprimován

Tabulka 5: Sekvence sond prediktivní prognostické množiny genů pro kontrast AIMD6 vs AIM

Illumina ID	Sekvence sondy	Definice
4730669	GTAGTCAGAGGAGCTAT GATAGACCACACCCAA GCAAGGCTGCCCTCAA	Lidský receptor adenosinu A3, transkripční varianta 1 (Homo sapiens adenosine A3 receptor (ADORA3), transcript variant 1), mRNA.
6940246	GTACCGTCAGCAACCTG GACAGAGCCTGACACTG ATCGCAACTGCAAATC	Lidský T-buněčný receptor (Human T-cell receptor (V beta 4.1-variant, J beta 2.1, C beta 2)), mRNA.
1690309	TGTTGCCCCAAAGTGAT GGCCCTGGAGGCGGGG CTGAGGAACAGGGAAA T	Lidský ER lipidový nosič 1 (Homo sapiens ER lipid raft associated 1 (ERLIN1)), mRNA.
3180392	AGGGTATTGAAGCTGCA GAGGGATCAACTTGTGC TTGCCAGAGGACGCCA	Lidská beta-podobná citrátová lyáza (Homo sapiens citrate lyase beta like (CLYBL)), mRNA.
5490634	ACCAGGTGCAGACACG CAGTGCTGATGAGCCCA TGACTACCTTTGTCTTA	Lidský transkripční prodlužovací faktor A, 3 (Homo sapiens transcription elongation factor A (SII), 3 (TCEA3)), mRNA.
6760670	AGTAAACCCATATATCC AGAACCCTGACCCTGCC GTGTACCAGCTGAGAG	Lidský T-buněčný receptor, alfa lokus (Homo sapiens T cell receptor alpha locus), mRNA (cDNA clone MGC:88342 IMAGE:30352166), complete cds.
6550437	TCGACATGCCATTACTG AAGCAGGCCCCAGAACA CTGTTACGCTTGCCACC	Lidská beta-podobná citrátová lyáza (Homo sapiens citrate lyase beta like (CLYBL)), mRNA.
3130019	CCGATGGGACACTTGGG GGACCCTGAGGATGTGG CAGATGTGGTTCGCATT	Lidská hydroxysteroidní (17-bty) dehydrogenáza 8 (Homo sapiens hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8 (HSD17B8)), mRNA.
1230333	GGATTTGGGGCTACTCT CTCCGAGGCTCAGGTC GAAGATTCGTAGAGGA	Lidská fms-příbuzná tyrosinová kináza 3 (Homo sapiens fms-related tyrosine kinase 3 (FLT3)), mRNA.
5090368	ACAGTACCTGTACCTGC ACGGTCACCCGCTCCGT GTGTCGCCCTATATTG	Lidský axin 2 (Homo sapiens axin 2 (conductin, axil) (AXIN2)), mRNA.
670041	AAACCCGTCACCCAGAT CGTCAGCGCCGAGGCCT GGGGTAGAGCAGGTGA	Lidský cDNA klon placentálního lůžka (full-length cDNA clone CS0DI056YK21 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)).

Tabulka 6: Průměrné hodnoty logaritmovaných genových expresí prediktivní prognostické množiny genů pro kontrast AIMD6 vs AIM

Illumina ID	Název / Lokus Genu	Průměrná Expres	
		AIMD6	AIM(*)

4730669	ADORA3	7,66	6,30
6940246	(M97723)	6,13	7,26
1690309	ERLIN1	7,89	6,81
3180392	CLYBL	5,93	6,84
5490634	TCEA3	5,97	7,08
6760670	(BC070337)	9,74	10,87
6550437	CLYBL	5,75	6,55
3130019	HSD17B8	6,49	7,31
1230333	FLT3	6,77	5,99
5090368	AXIN2	6,33	7,15
670041	(CR596519)	10,72	11,57

(*) Referenční hladina intenzity genové exprese pro posouzení zvýšeného kardiovaskulárního rizika

Porovnáním hladin genové exprese ve skupinách AIMD6 a AIM bylo nalezeno celkem 10 genů, z nichž u 3 byly hladiny genové exprese zvýšeny a u 7 sníženy. Tři z těchto 10 genů lze charakterizovat jako molekuly s enzymatickou aktivitou - **CLYBL** (citrátová lyáza Beta-like), **FLT3** (FMS-příbuzná tyrosinová kináza 3), která může mít vliv na růst hematopoetických kmenových a progenitorových buněk, **HSD17B8** (hydroxysteroidová 17-beta dehydrogenáza 8). Na myšším modelu byl demonstrován regulační vliv HSD17B8 na koncentrace biologicky aktivních estrogenů a androgenů. Další 3 geny byly zařazeny do kategorie molekul receptorové povahy. Jedná se o struktury RefSeq_ID **M97723.1** (popis viz kontrast AIM vs Kontroly), **ADORA3** (popis viz kontrast AIMD6 vs Kontroly), RefSeq_ID **BC070337.1**, popisovaný jako T-buněčný receptor, alfa lokus. Zbývající 4 geny můžeme charakterizovat jako geny kódující některé regulační proteiny - **ERLIN1** (popis viz kontrast AIMD6 vs Kontroly), **TCEA3** (transkripční elongační faktor A (SII) 3). Jedná se o faktor účastnící se transkripce a bývá popisován jako důležitý protein pro vazbu s RNA polymerázou II, dále **AXIN2** (AXIS Inhibitor 2), hrající důležitou roli při stabilizaci beta-kateninu. Z dostupných pramenů je v leukocytech modelového organismu AXIS2 inhibitor obtížně detekovatelný, RefSeq_ID **CR596519.1**, mRNA struktura o délce 1284 bp a lokalizovaná na dlouhých raménkách chromosomu 7.

Výsledky bootstrap studie pro ověření prediktivních vlastností vybraných genových sekvencí

Prediktivní vlastnosti transkriptů byly z hlediska nezávislých výběrů posuzovány pomocí bootstrap studie zaměřené na hodnocení senzitivity (SE) a specifity (SP) klasifikace na základě PAM modelu. Bootstrap studie zahrnovala analýzu 1000 náhodných výběrů

pořízených s opakováním z odpovídajících populací o témže rozsahu. Výsledky studie jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 7: Výsledky bootstrap studie na posouzení senzitivity a specifity PAM klasifikačního testu v nezávislých výběrech.

Kontrast	Výsledky PAM klasifikace (počet transkriptů použitých pro klasifikaci)
AIMD6 vs AIM	SE= 0,89, SP= 0,95 (11 transkriptů)

Uvedená množina genů se vyznačuje vysokou senzitivitou i specificitou klasifikačního testu na základě PAM modelu.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob identifikace osob se zvýšeným genetickým rizikem úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací do 6 měsíců od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu, vyznačený tím, že se v biologickém vzorku odebraném z těla pacienta, do 24 hodin od výskytu akutního infarktu myokardu, stanoví intenzita exprese sady genů a genetických lokusů:

Název / Lokus genu	SEQ ID No.	Referenční hodnota intenzity exprese (nízké riziko) stanovená na celogenomovém / oligonukleotidovém čipu	Min. odchylka od ref. hodnoty exprese, značící zvýšené riziko
ADORA3	1	6,30	+1
(M97723)	2	7,26	-1
ERLIN1	3	6,81	+1
TCEA3	5	7,08	-1
(BC070337)	6	10,87	-1
CLYBL	4	6,55	-1
HSD17B8	7	7,31	-1
FLT3	8	5,99	+1
AXIN2	9	7,15	-1
(CR596519)	10	11,57	-1

a její logaritmovaná hodnota při základu 2 se srovná s referenční hodnotou intenzity exprese, přičemž odchylka od referenční hodnoty rovná alespoň minimální odchylce u všech genů a genetických lokusů dané sady značí zvýšené riziko.

2. Způsob podle nároku 1, vyznačený tím, že biologickým vzorkem odebraným z těla pacienta jsou buňky periferní krve.

3. Oligonukleotidový čip pro identifikaci osob se zvýšeným genetickým rizikem úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací do 6 měsíců od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu, vyznačený tím, že obsahuje právě sondy hybridizující s DNA či RNA sady genů či genetických lokusů:

Název / Lokus genu	SEQ ID No.
ADORA3	1
(M97723)	2
ERLIN1	3
CLYBL	4
TCEA3	5
(BC070337)	6
CLYBL	4
HSD17B8	7
FLT3	8
AXIN2	9
(CR596519)	10

sequence listing divisional 2.ST25

tgaccaaaga ggacacgggc tggactggt gtggcatcca gcgggacttt gccagggatg	1500
acatggattt tacagagctg attgtaactg acgacaaagg aaccctggcc aatgactttt	1560
ggtctgggaa agacctatca ggcaacaaaa ccagaagctg caaggctccc aaagttgtcc	1620
gcaaggctga ccgctccagg acgtccattc tcatcatttg catactgatc acgggtttgg	1680
gaatcatctc tgtaatcagt catttgacca aaaggaggag aagtcaaagg aatagaaggg	1740
taggcaacac tttgaagccc ttctcgcgtg tcctgactcc aaaggaaatg gctcctactg	1800
aacagatgtg actgaagatt tttttaattt agttcataaa gtgatgctac aacagaataa	1860
tcaccatgac aactggccca cacctcagag actgattctg atctcccagg aattctgaag	1920
gacctctat ccttgacaac aatcatttgc agccaggtag caacggcggg agtcagagga	1980
gctatgatag accacacca agcaaggctg ccctcaaata acatctcaag atcttagttc	2040
ttatgcattc catcagtcag aagtgaagaa gaggtggaga atctggattg gggaccagga	2100
aatcacttgt attttgttag ccaataaatt cctagccagt gttgaatgaa aaaaaaaaaa	2160
a	2161

<210> 2
 <211> 485
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2	
gaaggaaaga tgaacttgag tttcacttct tagtgccttt tctcagggga gagggccatca	60
cttgaagatg ctgagtcttc tgctccttct cctgggacta ggctctgtgt tcagtgtctgt	120
catctctcaa aagccaagca gggatatctg tcaacgtgga acctcctga cgatccagtg	180
tcaagtcgat agccaagtca ccatgatggt ctgggtaccgt cagcaacctg gacagagcct	240
gacactgatc gcaactgcaa atcagggctc tgaggccaca tatgagagtg gatttgtcat	300
tgacaagttt cccatcagcc gcccaaact aacatttctca actctgactg tgagcaacat	360
gagccctgaa gacagcagca tatactctctg cagcgttgaa gatagggaca gagtctacaa	420
tgagcagttc ttcgggccag ggacacggct caccgtgcta gaggacctga aaaacgtggt	480
cccac	485

<210> 3
 <211> 3450
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3	
gatgctcac tgatcgggta ggcgcggccg aggggtcggc tttcctcgcg agcctgcggc	60
tgggcttctt ctgagttagt gccttccacc cgggagcgac ccttgggaga gggagtttca	120
ggaagctcac cgagcagggg cggccactg gcctccgggg gcggaggagt tggcaagggg	180
tcagcgggct cagccagaag ggaagaatga ggggacaggg gtactggact ccccggtca	240
gcctgcgaga gagcgccaag tttccggagg gagagggtag aaactggagg ggggtggacct	300

sequence listing divisional 2.ST25

gtcactcacg	ggactgaggg	tccttttctc	ccgctcccag	gaggaacgag	aatgaatatg	360
actcaagccc	gggttctggt	ggctgcagtg	gtggggttgg	tggctgtcct	gctctacgcc	420
tccatccaca	agattgagga	gggccatctg	gctgtgtact	acaggggagg	agctttacta	480
actagcccca	gtggaccagg	ctatcatatc	atgttgcctt	tcattactac	gttcagatct	540
gtgcagacaa	cactacaaac	tgatgaagtt	aaaaatgtgc	cttgtggaac	aagtgggagg	600
gtcatgatct	atattgaccg	aatagaagtg	gttaatatgt	tggctcctta	tgcagtgttt	660
gatatcgtga	ggaactatac	tgcagattat	gacaagacct	taatcttcaa	taaaatccac	720
catgagctga	accagttctg	cagtgcccac	acacttcagg	aagtttacct	tgaattgttt	780
gatcaaatag	atgaaaacct	gaagcaagct	ctgcagaaag	acttaaacct	catggcccca	840
ggcttcacta	tacaggctgt	gcgtgttaca	aaacccaaaa	tcccagaagc	cataagaaga	900
aattttgagt	taatggaggc	tgagaagaca	aaactcctta	tagctgcaca	gaaacaaaag	960
gttgtggaaa	aagaagctga	gacagagagg	aaaaaggcag	ttatagaagc	agagaagatt	1020
gcacaagtgg	caaaaattcg	gtttcagcag	aaagtgatgg	aaaaagaaac	tgaaaagcgc	1080
atctctgaaa	tcgaagatgc	tgcattcctg	gcccagagaga	aagcgaaagc	agatgctgaa	1140
tattatgctg	cacacaaata	tgccacctca	aacaagcaca	agttgacccc	ggaatatctg	1200
gagctcaaaa	agtaccaggc	cattgcttct	aacagtaaga	tctattttgg	cagcaacatc	1260
cctaacatgt	tcgtggactc	ctcatgtgct	ttgaaatatt	cagatattag	gactggaaga	1320
gaaagctcac	tcccctctaa	ggaggctctt	gaaccctctg	gagagaacgt	catccaaaac	1380
aaagagagca	caggttgatg	caagaggtgg	aatgttctc	catatcaaga	tgtggcccaa	1440
ggggttaagt	gggaacaatc	attatacggg	ctcttcagat	ttacagagaa	cttacacttc	1500
atctgttcca	cctctcctgc	gatagtcctg	ggtgctccac	tgattggagg	atagagccag	1560
ctgtctgaca	cacaaatggt	cttttcagcc	acagtcttat	caagtatcct	atatgtattc	1620
ctttctaaac	tgctactcat	gaatgaggaa	agtctgatgc	taagatactg	cctgcactgg	1680
aatgttaaac	actaaatata	taacaagctg	tgttttccta	agctgagatc	tgttgaataa	1740
tgtttacatt	cgtcccccg	ggaaatgtat	gctcagccac	cattcaagag	atgactgaga	1800
aggagatggt	aagttcaaga	agactgattg	cacctgggac	ccaggccctt	tctttgggat	1860
ccagtcccag	ccttcatcca	tgtgattaag	atccaggccg	ctgaagttcc	ccaggaaatg	1920
atcttccact	tgagcaacct	tttacttgat	acgatttgca	cctttctggt	ttcctgcagt	1980
cagggtggtg	gcctgcaggg	acctgagctt	tgctacccaa	ccagattcct	catagagatt	2040
cctaactcact	agtttcttgt	atcataaac	tcagagatac	agagggcttg	gtttgaagtt	2100
ggggtgagat	gaaacctttg	ctctgagcca	aagctctggg	gccttgcatc	ccctgcattg	2160
ggttgatgac	tgctcagcatc	actgccgcag	gccatgcttg	actaaggtag	ctggttttag	2220
ccacagccac	ctccttgat	gttaccttcc	agctctggcc	aagagtggga	cagggtttta	2280
accacaaata	ggagcagcat	gcaattccta	gtgacttgct	gcacagtatt	gtatcataat	2340

sequence listing divisional 2.ST25

```

tacaggaagt ttttattttt aaaactggat ctgggggtata ttcatttgcc ccatcacctc 2400
tgtctaaagg cccaagtctt agggctgcc a tggtcacaag cactactgatg ctccttaaga 2460
ttgtttatct ggagcccaca tagtgtggaa caaaaagtca cctagaaagc atccttggtc 2520
atcattgtct ccttcccacc tggcccagag atgcttaa at ccaagttggt tctccagctg 2580
tcacctcccc caggagatca ggattccact gacgtcctgg gcagccagtg aatttaattt 2640
tccatgagaa acaacagagt taacctgtgg cattaggaga cctacttcat gtggaccctt 2700
tttttccttc agtttaactt ttctggagca gtgtgctgcg tagttcggcc tgagtttggtg 2760
cagcttggtta agacaactct tgtgtacgct atgttgaagc tcaacaaaaa agtcatggga 2820
ccacttctag aatctttca gctgtcaggc ctgtcagct catgacagtt tgttggttgt 2880
gccaaacact ttatttggga aaggaaagcc cagatttgaa tgggtctttc ccctgggcct 2940
tatcctatag aggcatttgt aatatggaga aaataatttt tcatttttgc tcatttaatt 3000
ctataaattc tctttataaa tgaattttgt gttctttagt tctccttaa agaacttttg 3060
aattataaaa ataaaatctt tacctgtcga attgttgctg cagatgattg ttgtggaaaa 3120
tctggatcat tgacctctgt gctttcattc ctagagatgt tttatagtta catgagcaaa 3180
agctgttgcc ccaaagtgat ggccttgag gcggggctga ggaacagga aatgccgctg 3240
tgaagtctta aagcacttct gcttaaactc ccatgtgtga ggagtgtgcc tccctgtgcc 3300
ctctcagctc tgaggctggc cgtctttcgg ggtgttcctt ttggcaaata tacactgtaa 3360
tcttgagtct aaatttatat gttgaaatgc tacctttttt aaaataagaa actaaataaa 3420
attattttac tatcagttaa aaaaaaaaaa 3450

```

```

<210> 4
<211> 5779
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 4
aggcaaaggg cggggcgcg cgcctcggaa gatggcgcta cgtctgctgc ggagggcggc 60
gcgcgagact gcggcggcgg cgctgctgag gctgaaagcg tctctagcag ctgatatccc 120
cagacttgga tatagttcct catcccatca caagtacatc ccccggaggg cagtgtttaa 180
tgtacctgga aatgatgaaa agaaaataaa gaagattcca tccctgaatg tagattgtgc 240
agtgtctgac tgtgaggatg gagtggctgc aaacaaaaag aatgaagctc gactgagaat 300
tgtaaaaact cttgaagaca ttgatctggg ccctactgaa aaatgtgtga gagtcaactc 360
agtttccagt ggtctggcgg aagaagacct agagaccctt ttgcaatccc gggtccttcc 420
ttccagcctg atgctaccaa aggtggaaag tccctgaagaa atccagtggt ttgcagacaa 480
attttcattc cacttaaaaag gccgaaaact tgaacaacca atgaatttaa tcccttttgt 540
ggaaactgca atgggtttgc tcaattttaa ggcagtgtgt gaagaaacct tgaaggctcg 600
gcctcaagta ggtctctttc tagatgcagt cgtttttgga ggagaagact ttcgagccag 660
cataggtgca acaagtagta aagaaacctt ggatattctc tacgcccggc aaaagattgt 720

```

sequence listing divisional 2.ST25

tgatcatagcg	aaagcctttg	gtctccaagc	catagatctg	gtgtacattg	actttcgaga	780
tggagctggg	ctgcttagac	agtcacgaga	aggagccgcc	atgggcttca	ctggtaagca	840
ggtgattcac	cctaaccaa	ttgccgtggt	ccaggagcag	ttttctcctt	cccctgaaaa	900
aattaagtgg	gctgaagaac	tgattgctgc	ctttaaagaa	catcaacaat	taggaaaggg	960
ggcctttact	ttccaagga	gtatgatcga	catgccatta	ctgaagcagg	cccagaacac	1020
tgttacgctt	gccacctcca	tcaaggaaaa	atgatctggt	aatgaagct	gtcatcaggc	1080
taaaggggat	tgaagctgca	gagggatcaa	cttgtgcttg	ccagaggacg	ccaatgaagt	1140
ttgaaacacc	aacaatcaga	gattttgttt	ctgttcctca	ttaaatactg	agctttttgtg	1200
ccgagactct	ggacgactgt	tccttaagaa	attaacagaa	tgggaagttt	taaactctac	1260
accaaccttt	tcatgaccta	cacagcagca	acgctgctac	tcttagacaa	acaccgctgg	1320
gaaggctggt	ctgtttat	aaatttgtaa	atagaaaaca	gttgtttttt	actttcattt	1380
ttcacctcct	cctacgccct	tttgattat	ttcctctgcg	gcccctagca	tgagcccaaa	1440
ccaggcctcc	ccttttcccc	acttctctca	attcccacag	gaagcccag	aggtgaggag	1500
ctgaggttag	acaccaggag	aggcaccatc	acacaaaagc	gcggccgag	agtcccaccg	1560
ccaccaggcg	acccccacc	agagaggac	agacatgcgg	ggagccagca	ccgggcaaga	1620
tggtctgagg	gacctcatt	ctgtgaagac	accaactcat	ttctcaaaca	caggatccag	1680
gagacagata	gctcctaaat	ggagatggca	catgctccgt	ggggtccctc	atagaggagt	1740
gccaccctcc	acactggcca	cgctgggctg	ccccagagcg	gccagaaagg	aagggtgggag	1800
ctagccccat	cctcactcag	aggccggaag	gaggaagatg	gcatctcgcc	aacttcagag	1860
ccgaatggcc	tctagccaca	ctgcttccag	accccagacg	gggcagcagc	agcagttccc	1920
agaggagcac	ccattgttgc	agctaggacc	caccaaggat	gggactcctg	gagtcagggtg	1980
cacaccaggt	aaccaggac	cacgctgtgc	acccccagtc	tgcccctctg	ctcagaacac	2040
agaggggatg	gaggatggct	tggcagtggg	aaggcaaaag	aaggcctctc	tactctgccc	2100
cctgccatac	gcaccgctg	aggggtgtag	aagcagtgga	ggcagagctg	gccctaagca	2160
aaagaagaaa	ataaacctca	ccttgtcctt	cctatgggca	gccctcacc	caatctaact	2220
aaccttccca	tcctccagcc	taatccaaag	aagcccttgg	cttgagggga	tgaagggctt	2280
gcgttctagt	ctccaccca	gccccacagg	cagccagcca	gccagcccca	cacagagggg	2340
cctcctcaag	gcctcactgg	gagcctcctg	tccccagcca	aggagcccta	cagacctggg	2400
gaaaagcagg	cccctccgca	aggcccctgg	gtggtgcgga	ggccggaccg	gctaggcctc	2460
ccgctgctgg	ccactcccag	gccacgggtt	cctaggtccc	aaccacattg	gactgctcgc	2520
cacgccactg	ccctcatccc	aaactgcttt	gttcaaacaa	aaccaccttg	tttcagtctc	2580
cccaaagtgc	cagttcatta	tcttctcat	aaccatggt	ccctattagg	gtaggatcat	2640
gagactaaga	cctatgagag	ccacaaatct	ggaccaaagt	cccattccct	gaacagagac	2700
ccaaacgacg	agggctcccag	aagagagttc	agtctctgatc	agaaacccat	ggtgccttag	2760

300 5

15.09.11

sequence listing divisional 2.ST25

tccttgaaga	acaaaactct	aggaagaaga	tgctggaagg	caaagggat	tccccctctt	2820
tccccacccg	cgtctctgtg	gtgccatggg	tgggccccagg	taccctggga	aaggtggggag	2880
agcagtcaag	ggtgggtgtg	tgatctccac	tgggctcact	gggcaccccc	gacacggggga	2940
agtgagagct	gcccgactcc	tgagccaggc	gtgggtgaca	ggaagaggac	cttgacagcta	3000
atctgattca	ttagaaacca	tacctgttta	tgttttgtgt	agctcatcac	aagccgctta	3060
gccatatcac	ccccgttatt	aattcctggg	gtctaaatta	tgggtaacac	tattaaaaca	3120
ttatcagaac	taatgagaaa	caattactta	gaaaatgagc	cgggacaaga	ctgagttggg	3180
aacatcagtg	gtgatcactg	tagattagtt	taataaatca	tcaggtgcaa	ggcaagactg	3240
actgtatgta	tgcaaagccc	cgtcacggga	aatgaaatt	gagatttttt	ttttttgcat	3300
aattttttca	ttaatctcaa	taggacccgt	gtggtgtaga	ttgctttatt	cccctaatac	3360
cttgccctgag	gcgggggggg	gggggggtgc	ccaataatgt	cttcattggt	ttactgaggt	3420
cttaatgaca	atctgtgaca	acctcatttt	aatgtataga	ggattatatac	aatacagtca	3480
tgttttattg	aaatggtgaa	gggaactcca	gtcagagtca	ggcagtgctt	gtgagcacia	3540
gttaggaagt	ttctcggcat	ccgggagcgt	tcccgtctga	tgtcccagtg	ttagtcctcc	3600
cggccgcctt	cccctctctt	cctccagggga	cggctgggaa	aacagtcctg	cgggatgaag	3660
acttcaccgc	ctccgatttg	aatttgaaag	taactccttc	cgtggcatat	ttcgctgggc	3720
agatagaaca	aaccatgtcg	ttttcccccg	tctctaaaat	agacatatta	ttatcattca	3780
cacttttgca	cccggtcggt	ttgcgggagt	tcgggaaact	gactttcttc	attggggaca	3840
ttgtaatttt	ctgatgatgc	cacgaggaga	aaaaaaatac	gggtttgttt	taattggaag	3900
gaccttccgc	ttttatgatt	tcggtttacc	ttggaaaact	gaatcttctg	tgttttattt	3960
ctttcctcta	gtactagaaa	agcaatgaat	taattgcaca	aaacaggttc	tgagacggcc	4020
cgcaggcccc	gagctcgtgg	acgcggccga	gggtcgggtg	tgacccgcgg	agccgctgcc	4080
aggcttccca	gctcgtcttc	gcggggaggc	gggaggcagg	accagacccc	agcatttcag	4140
cgtgaaagtc	ttcgcttttc	ttccgcgct	gtctttcccg	cgggcggagc	ggcgtacctg	4200
agcgcggtcc	ccacggagga	tcagtgactt	tcccagacct	cgcgggcgag	cccgcgcttg	4260
ggacccggca	gctctgcgcg	ggctggtttt	ggaggggggtg	gtgttcgttt	gtttaaattc	4320
cagttgttat	ttggcagcat	atcgcttcc	gagtcagtaa	gaattgccca	cgacgtaaag	4380
agcgacttgc	aggaaggggc	cgaagccgtc	gttagcgccc	gggcggcgcc	ggccactcga	4440
accccgtttc	cgccaagcgc	gctgcaacct	gcggggcgag	ttcgttttgt	tttgccaaaa	4500
tcatttgggg	acttctttgt	cattcatgcc	cttcctttta	aatgattttt	atttttttcc	4560
actgtaagtg	accggctggg	tttgactttt	gcttcttccg	acggaagggc	accgcgagcc	4620
gggggtggcg	gccccgcggg	caggaggagc	gcgggttaca	cgcggtggcc	gcagacgccg	4680
agccctgcgg	agccccgagg	cctcgtcgcc	cgcgcccccg	gtgcgcgcgg	agccggggcc	4740
gaggccgggc	caggaggagt	gtggcggccc	aggaggcctg	gactgtgggc	cctgctcgcc	4800

sequence listing divisional 2.ST25

cgccccgccg gggccgcccc gagccccgcg gcctgtcgcg cagccccggct gtaatggtgg 4860
cagatcaaaag gcggccccgt gtccccgcgg agccccgggac aatccccgcg ctttgtgcbg 4920
tgttgctagg agccccgagaa actaagagaa agtgtcagga gcatgttaat cagactcggt 4980
aactgtaac aataacgtct ctctcgggtc tcccaggccc cagtaccccc gcgcaccctg 5040
cgcgcaggcc ggacacctgc gcagggccct tgcgccccgc ctgggggtccc gccggccctg 5100
gggtccctgc agccccgaat ccgcacccga gccacgcgga acgactagcc ccgagggggcc 5160
ccgcaggctc ccggtgcagc tccctggctg tggctcctt gaccgaagcc ccggcctcac 5220
accgcctggc cgcgagcccc agggacgcag ggacgatccc ggtcccctgc ttttcagtcc 5280
tccagtcgaa tcgcccactt tgttcaatca cagtattcga atcaagagga aatgaacat 5340
tccctttatg gtagcttttt ggttatgagt tttggcaaaa ctgttaaate aactttgccg 5400
atctcccttg ggaatccctg gaggccactc taagtggtaa tccaagtgtt aagaaggaaa 5460
tggggaaatt ttgctgagag taaagatgtc gccgaacttt ttgaagggat ttgcttcatt 5520
cattcattta gtcattcaac agacacctgt tgaacccgac tgggtgccag aggggccagt 5580
cacaggactt attccagatg aacttttctt ttgaaattag aatgcccttg tgaagccaa 5640
aggaggagca gaggcctaaa ataatgtcaa gtgtcaaagc aaaaagaagt gccattggct 5700
actacagtgt gtgatgataa caagagaggt gcgaattagg aattaaaac gtttgaaaaa 5760
ctacaggcca aaaaaaaaaa 5779

<210> 5
<211> 1586
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
cgccccgccg gggcgtgtgt gtcgtgtgtg tttggggccc gcgcggggtg cgcgccctcc 60
gccttcgcbg ctctgcccc cgaggcccta ctgctgcccc tgtgccccct gccccgccgg 120
gcgtcgcggg ccaacatggg ccaggaagag gagctgctga ggatcgccaa aaagctggag 180
aagatggtgg ccaggaagaa cacggaaggg gccctggacc ttctgaagaa gctgcacagc 240
tgccagatgt ccatccagct actacagaca accaggattg gagttgctgt taatggggtc 300
cgcaagcact gctcagacaa ggaggtggtg tccttggcc aagtccttat caaaaactgg 360
aagcggctgc tagactcccc tggaccccc aaggagaaa aaggagagga aagagaaaag 420
gcaaagaaga aggaaaaagg gcttgagtgt tcagactgga agccagaagc aggcctttct 480
ccaccaagga aaaaacgaga agacccccaa accaggagag actctgtgga ctccaagtct 540
tctgcctcct cctctcaaaa aagaccatcg gtggaaagat caaacagcag caaatcaaaa 600
gcggagagcc ccaaaacacc tagcagcccc ttgaccccc cgtttgcctc ttccatgtgt 660
ctcctggccc cctgctatct cacaggggac tctgtccggg acaagtgtgt ggagatgctg 720
tcagcagccc tgaaggcggg cgatgattac aaggactatg gagtcaactg tgacaagatg 780

100408

15.05.11

sequence listing divisional 2.ST25

gcatcagaaa tcgaagatca tatctaccaa gagctcaaga gcacggacat gaagtaccgg 840
aaccgcgtgc gcagccgcat aagcaacctc aaggaccca ggaaccccgg cctgcggcgg 900
aacgtgctca gtggggccat ctccgcaggg cttatagcca agatgacggc agaggaaatg 960
gccagtgatg aactgagga gttgaggaat gccatgaccc aggaggccat ccgtgagcac 1020
cagatggcca agactggcgg caccaccact gacctcttcc agtgcagcaa atgcaagaag 1080
aagaactgca cctataacca ggtgcagaca cgcagtgctg atgagcccat gactaccttt 1140
gtcttatgca atgaatgtgg caatcgctgg aagttctgct gatggaacag ccagccatga 1200
acaaggtgag gaagaagaaa gaggaagcgc tgaattatct gaactggaga agcaataaaa 1260
attaaagtga aggaaaatac tgaactctgt ctgagtggga tggatgagt tagaggaaga 1320
attctcttgc aaattaataa tcggtcatta gaaacaattg gttaatgggg gaggcctaatt 1380
ggagaatgat gctgagaatt tgtattgatg aacctctttt agaaactgca gagggctggg 1440
cacggtggtt tatggctgta atctgcaaac tctgggagggc tgaggtggga gaatcgctta 1500
accccagaag tttgagtcca gccagggcaa cacagcaaga ccccatctct ataaaaagaa 1560
aaaataaaga aactgcagcg ccttag 1586

<210> 6
<211> 1464
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
agatcagaag aggaggcttc tcaccctgca gcagggacct gtgagcatgg catgccctgg 60
cttctgtggt gcacttgtga tctccacctg tcttgaattt agcatggctc agacagtcac 120
tcagtctcaa ccagagatgt ctgtgcagga ggcagagacc gtgaccctga gctgcacata 180
tgacaccagt gagagtgatt attatttatt ctggtacaag cagcctccca gcaggcagat 240
gattctcgtt attcgccaag aagcttataa gcaacagaat gcaacagaga atcgtttctc 300
tgtgaacttc cagaaagcag ccaaatcctt cagtctcaag atctcagact cacagctggg 360
ggatgccgag atgtatttct gtgcttatag gagctatctt cagggcggat ctgaaaagct 420
ggtctttgga aagggaaacga aactgacagt aaacccatat atccagaacc ctgaccctgc 480
cgtgtaccag ctgagagact ctaaattccag tgacaagtct gtctgcctat tcaccgattt 540
tgattctcaa acaaatgtgt cacaaagtaa ggattctgat gtgtatatca cagacaaaac 600
tgtgctagac atgaggtcta tggacttcaa gagcaacagt gctgtggcct ggagcaacaa 660
atctgacttt gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt attccagaag acaccttctt 720
ccccagccca gaaagttcct gtgatgtcaa gctggctgag aaaagctttg aaacagatac 780
gaacctaaac tttcaaaacc tgtcagtgat tgggttccga atcctcctcc tgaaagtggc 840
cgggtttaat ctgctcatga cgctgcggct gtgggtccagc tgagatctgc aagattgtaa 900
gacagcctgt gctccctcgc tcttctctct gcattgcccc tcttctccct ctccaaacag 960
agggaaactct cctaccccca aggaggtgaa agctgctacc acctctgtgc cccccggca 1020

sequence listing divisional 2.ST25

atgccaccaa ctggatccta cccgaattta tgattaagat tgctgaagag ctgccaaca 1080
 ctgctgccac cccctctgtt cccttattgc tgcttgacac tgcctgacat tcacggcaga 1140
 ggcaaggctg ctgcagcctc ccctggctgt gcacattccc tctgctccc cagagactgc 1200
 ctccgccatc ccacagatga tggatcttca gtgggttctc ttgggtctta ggtcccggag 1260
 aatgtttgta ggggtttatt ttttttaat agtgttcata aagaaagaca tagtattctt 1320
 cttctcaaga cgtgggggga aattatctca ttatcgaggc cctgctatgc tgtgtgctg 1380
 ggcgtgttgt atgtcctgct gccgatgcct tcattaaaat gatttgaag agcgaaaaaa 1440
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1464

<210> 7
 <211> 989
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gggattccca cccacccaca gcccgccatg gcgtctcagc tccagaaccg actccgctcc 60
 gcactggcct tggctcacagg tgcggggagc ggcacgccc gagcggtcag tgtacgcctg 120
 gccggagagg gggccaccgt agctgcctgc gacctggacc gggcagcggc acaggagacg 180
 gtgcggctgc tgggcgggccc agggagcaag gaggggccc cccgagggaa ccatgctgcc 240
 ttccaggctg acgtgtctga ggccagggcc gccaggtgcc tgctggaaca agtgaggcc 300
 tgcttttctc gccaccatc tgtcgttctg tctgtgctg gcacaccca ggatgagttt 360
 ctgctgcaca tgtctgagga tgactgggac aaagtcata ctgtcaacct caagggcacc 420
 ttctagtca ctcaggctgc agcacaagcc ctggtgtcca atggttctg tggttccatc 480
 atcaacatca gtagcatcgt aggaaaggct gggaacgtgg ggcagacaaa ctatgcagca 540
 tccaaggctg gagtgattgg gctgaccag accgcagccc gggagcttgg acgacatggg 600
 atccgctgta actctgtcct cccagggctc attgcaacac ccatgacaca gaaagtcca 660
 cagaaagtgg tggacaagat tactgaaatg atcccgatgg gacacttggg ggaccctgag 720
 gatgtggcag atgtggtcgc attcttggca tctgaagata gtggatacat cacagggacc 780
 tcagtggaag tctactggagg tcttttcatg taactgcctc aaggaccctg gactctgctc 840
 accccccac cactctgcct ggcctcctgc tgatgaggac tctaagttcc caggatacaa 900
 aaggggtggc agtgtatggt tcaggaatgc tgaatatggg aagcaggggt gcttctgacc 960
 ctaataaatt ccaagtctc ttcctgcc 989

<210> 8
 <211> 3475
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 cgaggcggca tccgagggtc gggccggcgc cctgggggac cccgggctcc ggaggccatg 60
 ccggcgttgg cgcgcgacgc gggcaccgtg ccgctgctcg ttgtttttc tgcaatgata 120

sequence listing divisional 2.ST25

tttgggacta	ttacaaatca	agatctgcct	gtgatcaagt	gtgttttaat	caatcataag	180
aacaatgatt	catcagtggg	gaagtcatca	tcatatccca	tggtatcaga	atccccggaa	240
gacctcgggt	gtgcgttgag	accccagagc	tcagggacag	tgtacgaagc	tgccgctgtg	300
gaagtggatg	tatctgcttc	catcacactg	caagtgctgg	tcgatgcccc	agggaacatt	360
tcctgtctct	gggtctttaa	gcacagctcc	ctgaattgcc	agccacattt	tgatttacia	420
aacagaggag	ttgtttccat	ggtcattttg	aaaatgacag	aaaccaagc	tggagaatac	480
ctacttttta	ttcagagtga	agctaccaat	tacacaatat	tgtttacagt	gagtataaga	540
aataccctgc	tttacacatt	aagaagacct	tacttttagaa	aaatggaaaa	ccaggacgcc	600
ctggtctgca	tatctgagag	cgttccagag	ccgatcgtgg	aatgggtgct	ttgcgattca	660
cagggggaaa	gctgtaaaga	agaaagtcca	gctgttgta	aaaaggagga	aaaagtgctt	720
catgaattat	ttgggacgga	cataaggtgc	tgtgccagaa	atgaactggg	cagggaatgc	780
accaggctgt	tcacaataga	tctaaatcaa	actcctcaga	ccacattgcc	acaattatit	840
cttaaagtag	gggaaccctt	atggataagg	tgcaaagctg	ttcatgtgaa	ccatggattc	900
gggctcacct	gggaattaga	aaacaaagca	ctcgaggagg	gcaactactt	tgagatgagt	960
acctattcaa	caaacagAAC	tatgatacgg	attctgtttg	cttttgtatc	atcagtggca	1020
agaaacgaca	ccggataacta	cacttgttcc	tcttcaaagc	atcccagtca	atcagctttg	1080
gttaccatcg	taggaaaggg	atttataaat	gctaccaatt	caagtgaaga	ttatgaaatt	1140
gaccaatatg	aagagttttg	tttttctgtc	aggtttaaag	cctaccacaa	aatcagatgt	1200
acgtggacct	tctctcgaAA	atcatttcct	tgtgagcaaa	agggctttga	taacggatac	1260
agcatatcca	agttttgcaa	tcataagcac	cagccaggag	aatatatatt	ccatgcagaa	1320
aatgatgatg	ccaattttac	caaaatgttc	acgctgaata	taagaaggaa	acctcaagtg	1380
ctcgcagaag	catcggcaag	tcaggcgtcc	tgtttctcgg	atggataccc	attaccatct	1440
tggacctgga	agaagtgttc	agacaagtct	cccaactgca	cagaagagat	cacagaagga	1500
gtctggaata	gaaaggctaa	cagaaaagtg	tttgacagct	gggtgtcgag	cagtactcta	1560
aacatgagtg	aagccataaa	agggttcctg	gtcaagtgct	gtgcatacaa	ttcccttggc	1620
acatcttgty	agacgatcct	tttaaactct	ccaggcccct	tccctttcat	ccaagacaac	1680
atctcattct	atgcaacaat	tggtgtttgt	ctcctcttca	ttgtcgtttt	aaccctgcta	1740
atttgtcaca	agtacaaaaa	gcaatttagg	tatgaaagcc	agctacagat	ggtacaggty	1800
accggctcct	cagataatga	gtacttctac	gttgatttca	gagaatatga	atatgatctc	1860
aaatgggagt	ttccaagaga	aaatttagag	tttgggaagg	tactaggatc	aggtgctttt	1920
ggaaaagtga	tgaacgcaac	agcttatgga	attagcaaaa	caggagtctc	aatccaggtt	1980
gccgtcaaaa	tgctgaaaga	aaaagcagac	agctctgaaa	gagaggcact	catgtcagaa	2040
ctcaagatga	tgaccagct	gggaagccac	gagaatattg	tgaacctgct	gggggcgtgc	2100
acactgtcag	gaccaattta	cttgattttt	gaatactgtt	gctatggtga	tcttctcaac	2160

sequence listing divisional 2.ST25

tatctaagaa gtaaaagaga aaaatttcac aggacttgga cagagatttt caaggaacac	2220
aatttcagtt ttaccaccac ttccaatca catccaaatt ccagcatgcc tggttcaaga	2280
gaagttcaga tacaccggga ctccgatcaa atctcagggc tcatgggaa ttcatttcac	2340
tctgaagatg aaattgaata tgaaaaccaa aaaaggctgg aagaagagga ggacttgaat	2400
gtgcttacat ttgaagatct tctttgcttt gcatatcaag ttgccaaagg aatggaattt	2460
ctggaattta agtcgtgtgt tcacagagac ctggccgcca ggaacgtgct tgtcaccacc	2520
gggaaagtgg tgaagatatg tgactttgga ttggctcgag atatcatgag tgattccaac	2580
tatgttgca ggggcaatgc ccgtctgcct gtaaaatgga tggccccga aagcctgttt	2640
gaaggcatct acaccattaa gagtgatgtc tggatcatatg gaatattact gtgggaaatc	2700
ttctcacttg gtgtgaatcc ttaccctggc attccggttg atgctaactt ctacaaactg	2760
attcaaaatg gatttaaaat ggatcagcca ttttatgcta cagaagaaat atacattata	2820
atgcaatcct gctgggcttt tgactcaagg aaacggccat ccttccctaa tttgacttcg	2880
tttttaggat gtcagctggc agatgcagaa gaagcgatgt atcagaatgt ggatggccgt	2940
gtttcggaat gtcctcacac ctacaaaac aggcgacctt tcagcagaga gatggatttg	3000
gggctactct ctccgcaggc tcaggtcgaa gattcgtaga ggaacaattt agttttaagg	3060
acttcatccc tccacctatc cctaacaggc tgtagattac caaacaaga ttaatttcat	3120
cactaaaaga aaatctatta tcaactgctg cttcaccaga cttttctcta gaagccgtct	3180
gcgtttactc ttgttttcaa agggactttt gtaaaatcaa atcatcctgt cacaaggcag	3240
gaggagctga taatgaactt tattggagca ttgatctgca tccaaggcct tctcaggccg	3300
gcttgagtga attgtgtacc tgaagtacag tatattcttg taaatacata aaacaaaagc	3360
attttgctaa ggagaagcta atatgatttt ttaagtctat gttttaaaat aatatgtaaa	3420
tttttcagct atttagtgat atattttatg ggtgggaata aaatttctac tacag	3475

<210> 9
 <211> 4241
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9	
actggctccg cgagcctggc ccgggggagt cggctggagc cggctgcgct ttgataaggt	60
cctggcaact cagtaacagc ccgagagccg ggaataaaa ataaccctc agagcgatgg	120
atttcggggc cgcccggcgg ccgaggcgcc cgccgaaggc cctgctgtaa aagagaggag	180
gttcagatga gcccctgctg acttgagaga gacagagaga ccacgccgat tgctgagagg	240
aactggaaga agaaaaattc ccagactcag tgggaagagc tcctcacca tgagtagcgc	300
tatgttggtg acttgctcc cgacccag cagcagcttc cgtgaggatg ccccgcggcc	360
cccagtcca ggggaagaag gggagacccc accgtgtcag ccaggggtgg gcaaggcca	420
ggtcacaaa cccatgcctg tctcttcaa caccaggcgg aacgaagatg ggttggggga	480

sequence listing divisional 2.ST25

gccggagggg	cgggcatctc	cggattcccc	tctgaccgg	tggaccaagt	ccttacactc	540
cttattgggc	gatcaagacg	gtgcttacct	gttccgaact	ttcctggaga	gggagaaatg	600
cgtggatacc	ttagacttct	ggtttgctg	caatggattc	aggcagatga	acctgaagga	660
tacaaaaact	ttacgagtag	ccaaagcgat	ctacaaaagg	tacattgaga	acaacagcat	720
tgtctccaag	cagctgaagc	ctgccaccaa	gacctacata	agagatggca	tcaagaagca	780
gcagattgat	tccatcatgt	ttgaccaggc	gcagaccgag	atccagtcgg	tgatggagga	840
aatgcctac	cagatgtttt	tgacttctga	tatatacctc	gaatatgtga	ggagtggggg	900
agaaaacaca	gcttacatga	gtaatggggg	actcgggagc	ctaaaggtcg	tgtgtggcta	960
tctccccacc	ttgaatgaag	aagaggagtg	gacttgtgcc	gacttcaagt	gcaaactttc	1020
gccaacctg	gttggcttgt	ccagcaaaac	tctgagggcc	acggcgagtg	tgaggtccac	1080
ggaaactggt	gacagtggat	acaggtcctt	caagaggagc	gatcctgtta	atccttatca	1140
cataggttct	ggctatgtct	ttgcaccagc	caccagcgcc	aacgacagtg	agatatccag	1200
tgatgcgctg	acggatgatt	ccatgtccat	gacggacagc	agtgtagatg	gaattcctcc	1260
ttatcgtgtg	ggcagtaaga	aacagctcca	gagagaaatg	catcgcagtg	tgaaggccaa	1320
tggccaagtg	tctctacctc	atttccccgag	aaccaccgc	ctgccaagg	agatgacccc	1380
cgtggaaccc	gccacctttg	cagctgagct	gatctcgagg	ctggaaaagc	tgaagctgga	1440
gttggagagc	cgccacagcc	tggaggagcg	cctgcagcag	atccgagagg	atgaagagag	1500
agagggctcc	gagctcacac	tcaattcgcg	ggagggggcg	cccacgcagc	acccctctc	1560
cctactgccc	tccggcagct	acgaggaaga	cccgcagacg	atactggacg	atcacctgtc	1620
cagggctctc	aagacccttg	gctgccagtc	tccaggcgta	ggccgctata	gccccgctc	1680
ccgtccccg	gaccaccacc	accaccacca	ttcgcagtac	cactccctgc	tcccgccgg	1740
tggcaagctg	cctcccgcgg	ccgcctcgcc	gggcgcctgc	cccctctctg	ggggcaaagg	1800
ctttgtgacc	aagcagacga	cgaagcatgt	ccaccaccac	tacatccacc	accatgccgt	1860
ccccaaagacc	aaggaggaga	tcgaggcgga	ggccacgcag	cgggtgcact	gcttctgccc	1920
tgggggcagc	gagtattact	gctactcgaa	atgcaaaagc	cactccaagg	ctccggaaac	1980
catgcccage	gagcagtttg	gcggcagcag	aggcagtacc	ttgcccaaac	gcaatgggaa	2040
aggcacggag	ccgggcctgg	ccctgccccg	cagggaaagga	ggggcccccg	gcggagctgg	2100
ggccctgcag	cttccccggg	aggaaggaga	caggtcgcag	gatgtctggc	agtggatgct	2160
ggagagtgag	cggcagagca	agccccagcc	ccatagtgcc	caaagcacia	aaaaggccta	2220
ccccttgagg	tctgccccgct	cgtctccagg	cgaacgagcc	agccggcacc	atctgtgggg	2280
gggcaacagc	gggcaccccc	gcaccacccc	ccgtgcccac	ctgttcaccc	aggaccctgc	2340
gatgcctccc	ctgacccccac	ccaacacgct	ggctcagctg	gaggaggcct	gtcgcaggct	2400
agctgaggtg	tcgaagcccc	caaagcagcg	gtgctgtgtg	gccagtcagc	agagggacag	2460
gaatcattcg	gccactgttc	agacgggagc	cacacccttc	tccaatccaa	gcctggctcc	2520

10000

150011

sequence listing divisional 2.ST25

```

agaagatcac aaagagccaa agaaactggc aggtgtccac gcgctccagg ccagtgagtt 2580
ggttgtcact tactttttct gtggggaaga aattccatac cggaggatgc tgaaggctca 2640
gagcttgacc ctgggccact ttaaagagca gctcagcaaa aagggaaatt ataggtatta 2700
cttcaaaaaa gcaagcgatg agtttgctg tggagcggtg tttgaggaga tctgggagga 2760
tgagacggtg ctcccgatgt atgaaggccg gattctgggc aaagtggagc ggatcgattg 2820
agccctgggg tctggctttg gtgaactggt ggagcccga gctcttgta actgtcttgg 2880
ctgtgagcaa ctgcgacaaa acattttgaa ggaaaattaa accaatgaag aagacaaagt 2940
ctaaggaaga atcggccagt gggccttcgg gagggcgggg ggaggttgat tttcatgatt 3000
catgagctgg gtactgactg agataagaaa agcctgaact atttattaa aacatgacca 3060
ctcttggcta ttgaagatgc tgctgtatt tgagagactg ccatacataa tatatgactt 3120
cctagggatc tgaaatccat aaactaagag aaactgtgta tagcttacct gaacaggaat 3180
ccttactgat atttatagaa cagttgattt cccccatccc cagtttatgg atatgctgct 3240
ttaaacttgg aagggggaga caggaagttt taattgttct gactaaactt aggagttgag 3300
ctaggagtgc gttcatggtt tcttactaa cagaggaatt atgctttgca ctacgtccct 3360
ccaagtgaag acagactggt ttagacagac tttttaaataa ggtgccctac cattgacaca 3420
tgcagaaatt ggtgcgtttt gttttttttt ttcctatgct gctctgtttt gtcttaaagg 3480
tcttgagggt tgaccatggt gcgtcatcat caacattttg ggggttggtg tggatgggat 3540
gatctgttgc agagggagag gcaggaacc ctgctcctc gggccccagg ttgatcctgt 3600
gactgaggct cccctcatg tagcctccc aggcccagg ccctgaggcc tgctagaatc 3660
actgccgctg tgctttcgtg gaaatgacag ttccttgttt tttttgtttc tgtttttggt 3720
ttacattagt cattggacca cagccattca ggaactaccc cctgccccac aaagaaatga 3780
acagttgtag ggagaccag cagcacctt cctccacaca ccttcatttt gatgttcggg 3840
ttttgtgtt aagttaatct gtacattctg tttgccattg ttacttgtag tatacatctg 3900
tatatagtgt acggcaaaag agtattaatc cactatctct agtgcttgac tttaaatcag 3960
tacagtacct gtacctgcac ggtcaccgc tccgtgtgtc gccctatatt gagggctcaa 4020
gctttccctt gttttttgaa aggggtttat gtataaatat attttatgcc tttttattac 4080
aagtcttgta ctcaatgact tttgtcatga cattttgttc tacttatact gtaaattatg 4140
cattataaag agttcattta aggaaaatta cttggtacaa taattattgt aattaagaga 4200
tgtagccttt attaaaattt tatatttttc aaaaaaaaaa a 4241

```

```

<210> 10
<211> 1284
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

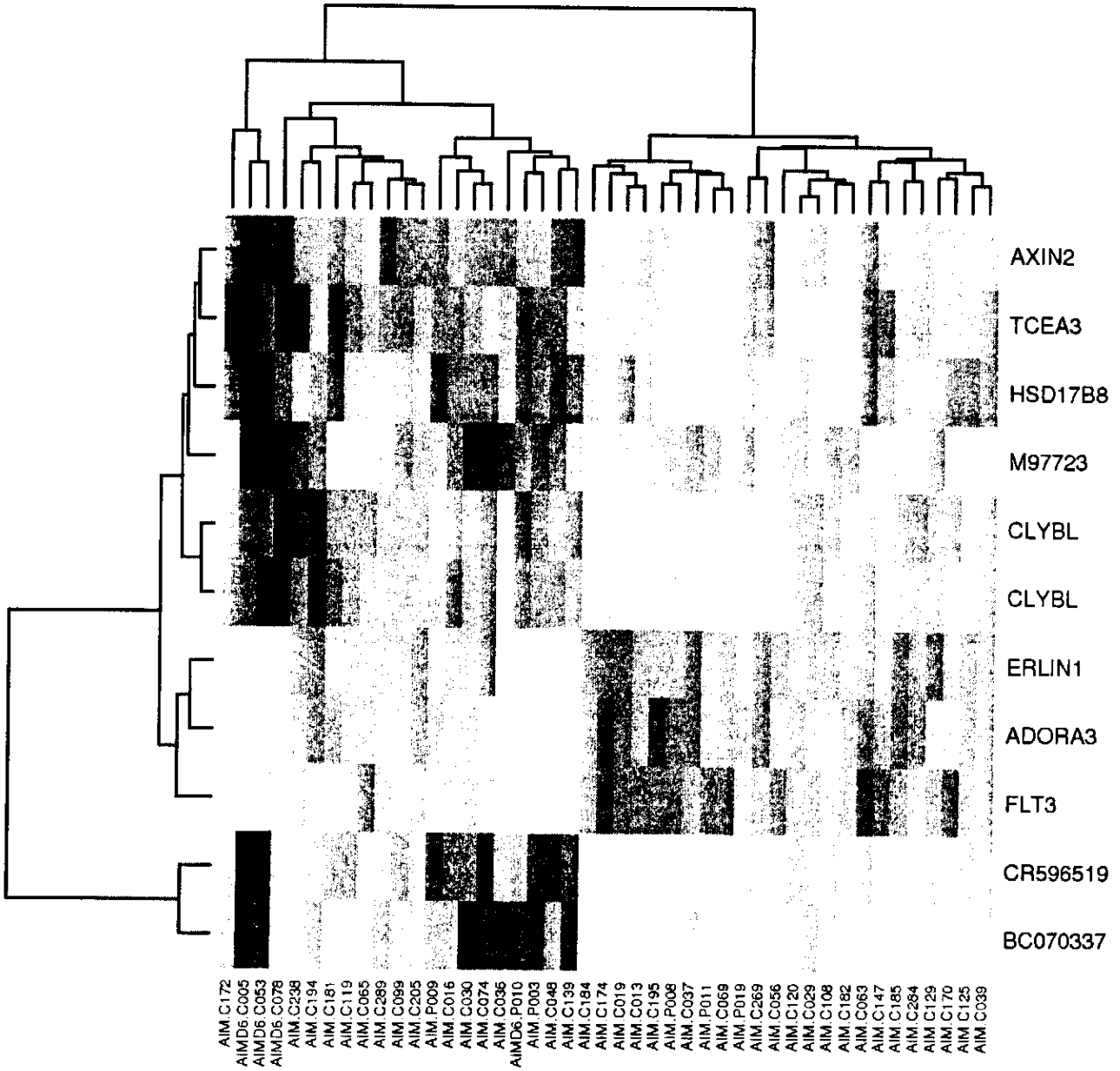
<400> 10
atacgcagta ttttgccca ggcaccggc tgacagtgct cgaggacctg aaaaactgtg 60
tcccaccga ggtcgcgtg tttgagccat cagaagcaga gatctccac acccaaaagg 120

```

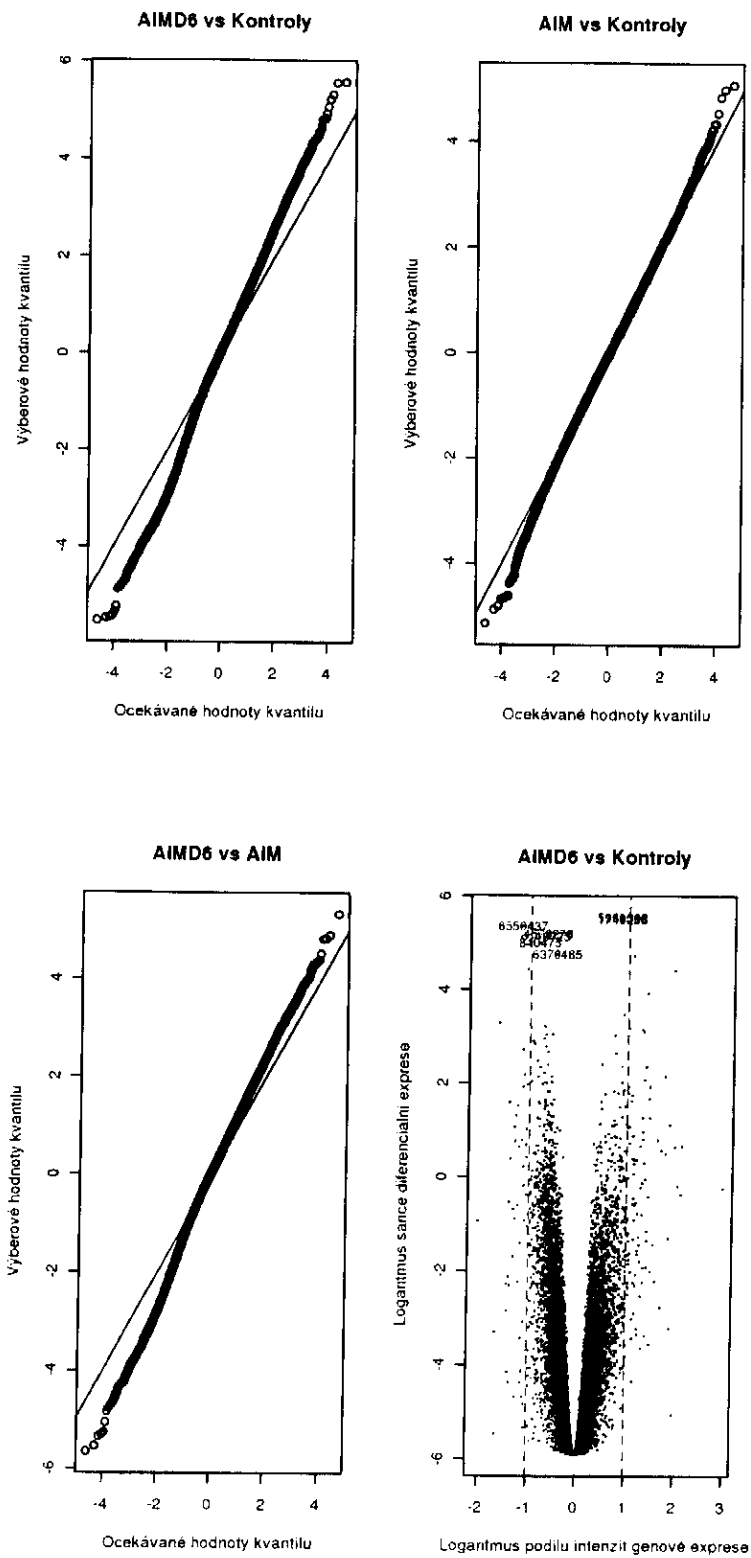

sequence listing divisional 2.ST25

ccacactggt atgcctggcc acaggcttct accccgacca cgtggagctg agctggtggg	180
tgaatgggaa ggaggtgcac agtgggggtca gcacagacc gcagcccctc aaggagcagc	240
ccgccctcaa tgactccaga tactgcctga gcagccgcct gagggtctcg gccaccttct	300
ggcagaacct ccgcaaccac ttccgctgtc aagtccagtt ctacgggctc tcggagaatg	360
acgagtggac ccaggatagg gccaaacctg tcaccagat cgtcagcgc ccaggcctggg	420
gtagagcagg tgagtggggc ctggggagat gcctggagga gattaggtga gaccagctac	480
cagggaaaat ggaaagatcc aggtagcggg caagactaga tccagaagaa agccagagtg	540
gacaaggtgg gatgatcaag gttcacaggg tcagcaaagc acgggtgtgca cttccccac	600
caagaagcat agaggctgaa tggagcacct caagctcatt cttccttcag atcctgacac	660
cttagagcta agctttcaag tctccctgag gaccagccat acagctcagc atctgagtgg	720
tgtgcatccc attctcttct ggggtcctgg tttcctaaga tcatagtac cacttcgctg	780
gcactggagc agcatgaggg agacagaacc agggctatca aaggaggctg actttgtact	840
atctgatatg catgtgtttg tggcctgtga gtctgtgatg taaggctcaa tgccttaca	900
aagcagcatt ctctcatcca tttttcttcc cctgttttct ttcagactgt ggcttcacct	960
ccgagtctta ccagcaaggg gtccctgtctg ccaccatcct ctatgagatc ttgctagggg	1020
aggccacctt gtatgccgtg ctggtcagtg ccctcgtgct gatggccatg gtcaagagaa	1080
aggattccag aggctagctc caaaaccatc ccaggtcatt cttcatcctc acccaggatt	1140
ctcctgtacc tgctcccaat ctgtgttcct aaaagtgatt ctcactctgc ttctcatctc	1200
ctacttacat gaatacttct ctcttttttc tgtttccctg aagattgagc tccaacccc	1260
caagtacgaa ataggctaaa ccaa	1284

Obr. 1



Obr.2



Obr. 2 - pokračování

