

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2011-578

(13) Druh dokumentu: **A3**

(19)
ČESKÁ
REPUBLICA



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 výskytu infarktu
myokardu**

(57) Anotace:

Řešení popisuje způsob identifikace osob se zvýšeným genetickým rizikem výskytu akutního infarktu myokardu, a s nízkým rizikem následného úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací v časovém horizontu do 6 měsíců od okamžiku výskytu srdeční příhody, spočívající v tom, že se v biologickém vzorku odebraném z těla pacienta stanoví intenzita exprese genů a genetických lokusů OLIG2, VNN3, MS4A3, CEBPE, FOS, LIPA, LOC645649, (M97723), EPAS1, CLINT1, MYCT1, VPS29 a LOC 130951. 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 - 578 A3

Způsob identifikace osob se zvýšeným genetickým rizikem výskytu infarktu myokardu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu identifikace osob v české populaci, které vykazují zvýšené genetické riziko výskytu akutního infarktu myokardu, se zřetelem k jejich přežití v krátkodobém časovém horizontu od doby výskytu srdeční události. 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):355-363, 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):939-945, 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):488-499, 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):299-307, 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):3444-3451, 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. Houn, 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):227¹²*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):1922¹²*1927, October 2004) se zabývá genetickými asociačními studiiemi 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):10¹²*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 3¹²*6 měsíců po první a další události).

Pokusy o expresní analýzu a průběžné monitorování nejrůznějších, především ale nádorových, onemocnění člověka byly již učiněny. Jsou dnes připravovány nejrůznější 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^{12'}*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^{12'}*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^{12'}*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^{12'}*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 Buellfeld, 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^{12'}*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^{12'}*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 Helgadottir, Gudmar Thorleifsson, Andrei Manolescu, Solveig Gretarsdottir, Thorarinn Blondal, Aslaug Jonasdottir, Adalbjorg Jonasdottir, Asgeir Sigurdsson, Adam Baker, Arnar Palsson, Gisli Masson, Daniel F. Gudbjartsson, Kristinn P. Magnusson, Karl Andersen, Allan I. Levey, Valgerdur M. Backman, Sigurborg Matthiasdottir, Thorbjorg Jonsdottir, Stefan Palsson, Helga Einarsdottir, Steinunn Gunnarsdottir, 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 Thorsteinsdottir, 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 aktuálním stádiu mrtvice (Boryana Stamova, Huichun Xu, Glen Jickling, Cheryl Bushnell, Yingfang Tian, Bradley P. Ander, Xinhua Zhan, DaZhi Liu, Renee Turner, Peter Adameczyk, 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 nejrůznějších nových biomarkerů ventrikulární fibrilace, která bývá pozorována v aktuálním 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^{12'}*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^{12'}*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^{12'}*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^{12'}*473, June 2010) či atherotrombózou (Luca Andrea A. Lotta. Genome-wide association studies in atherothrombosis. *European journal of internal medicine*, 21(2):74^{12'}*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^{12'}*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).

Příhláška 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 popsany 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 výskytu akutního infarktu myokardu, a popřípadě s nízkým rizikem následného 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 stanoví intenzita exprese sady genů a genetických lokusů:

Název / Lokus genu	RefSeq_ID	SEQ ID No.	Referenční hodnota intenzity exprese (nízké riziko výskytu AIM) stanovená na celogenomovém / oligonukleotidovém čipu	Min. odchylka od ref. hodnoty exprese, značící zvýšené riziko
OLIG2	NM 005806.2	1	6,88	-0,891
VNN3	NM 001024460.1	2	9,69	0,498
MS4A3	NM 006138.4	3	8,17	-0,635
CEBPE	NM 001805.2	4	7,13	-0,447
FOS	NM 005252.2	5	10,04	0,388
LIPA	NM 000235.2	6	10,35	-0,373
LOC645649	XM 928663.1	7	7,85	0,286
(M97723)	M97723	8	6,92	0,382
EPAS1	NM 001430.3	9	6,75	-0,314
CLINT1	NM 014666.2	10	9,52	-0,246
MYCT1	NM 025107.1	11	5,43	-0,150
VPS29	NM 016226.2	12	10,64	-0,145
LOC130951	NM 138804.2	13	5,20	-0,125

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. Je třeba mít na paměti, že vypovídací hodnotu 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 čípech Illumina. Sekvence DNA kódující mRNA uváděné v předkládané přihlášce jsou uváděny podle dostupných katalogů pouze pro informaci.

Expese 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 výskytu 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 výskytu akutního infarktu myokardu, což umožní zacílit prevenční a sledovací programy na jedince, kterým to přinese největší benefit, a možnost identifikovat

jedince s nízkým rizikem úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací v krátkodobém horizontu po výskytu akutního infarktu myokardu umožní efektivní využití lůžkových kapacit.

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

obrázku na výkresoch

Přehled vyobrazení

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

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 OLIG2
- SEQ ID No. 2: sekvence DNA kódující mRNA genu VNN3
- SEQ ID No. 3: sekvence DNA kódující mRNA genu MS4A3
- SEQ ID No. 4: sekvence DNA kódující mRNA genu CEBPE
- SEQ ID No. 5: sekvence DNA kódující mRNA genu FOS
- SEQ ID No. 6: sekvence DNA kódující mRNA genu LIPA
- SEQ ID No. 7: sekvence DNA kódující mRNA genového lokusu LOC645649
- SEQ ID No. 8: sekvence DNA odpovídající RefSeq_ID M97723
- SEQ ID No. 9: sekvence DNA kódující mRNA genu EPAS1
- SEQ ID No. 10: sekvence DNA kódující mRNA genu CLINT1
- SEQ ID No. 11: sekvence DNA kódující mRNA genu MYCT1
- SEQ ID No. 12: sekvence DNA kódující mRNA genu VPS29
- SEQ ID No. 13: sekvence DNA kódující mRNA genového lokusu LOC130951

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 mrazícího 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 mrazícího 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 5¹²•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 5¹²•10 s centrifugováno na 16 100 g. Na filtry kolonek bylo nanášeno 700 µl promývacího roztoku 1 a 5¹²•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 5¹²•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 nanese 50 μ l elučního roztoku (předehřátého na 75°C). 20 s ponecháno stát při laboratorní teplotě a 20³⁰ s centrifugováno na maximum. Při druhé eluci dalšími 50 μ l elučního roztoku centrifugováno 1 min.

K RNA ve 100 μ l elučního pufru bylo přidáno 5 μ l DNase pufru a 1 μ l DNase I a ponecháno 30 min inkubovat při 37°C. K RNA po odstranění DNA bylo přidáno 20 μ l 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 hodinu 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% ethanolu 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 pufrům a pufrům 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 stojánu na dobu 3¹² 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^oC, řádně vortexováno a ponecháno inkubovat po dobu nejméně 15 min při 50 °C před dalším použitím. Ke vzorkům RNA ve 14 μ l (1¹⁰ μ g) byl přidán 1 μ l *Capture Oligo Mix*. Ke směsi bylo přidáno 15 μ l 2x hybridizačního pufru předehřátého na 50^oC. Vzorky byly krátce vortexovány a rychle centrifugovány při max. 1000 g a ponechány inkubovat při 50^oC 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^oC. Po vyjmutí z inkubátoru jemně vortexovány, centrifugovány cca 2 s na max. 1000 g a zkumavky umístěny do magnetického stojánu na 3¹² 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^oC. 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 3¹² 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 3¹² 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^oC, řádně 10 s vortexováno a směs inkubována 5 min při 58^oC. 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 čipovou analýzu vyšší než 1,5. Pro zajištění dostatečné kvality musela být prováděna finální etanolová precipitace. K cca 30 μ l vzorku RNA izolované pomocí *RiboPureTM Blood Kit*, Ambion z plné krve s *RNAlater[®]* přečištěné kitem *GLOBINclearTM Whole Blood Kit* byly přidány 3 μ l octanu sodného (*RiboPureTM*) a 85 μ l 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 μ l vody bez nukleas či dle velikosti pelety a vstupní koncentrace ve větším objemu. Byla změřena koncentrace přečištěné a přesrážené RNA na Nanodropu (1 μ l), integrita stanovena pomocí Bioanalyzeru 2100, Agilent Technologies (1 μ l) - *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 μ l. Pro jednotlivé kroky byl využit *DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler*, Bio-Rad Laboratories.

RNA vzorky o objemu 11 μ l (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 μ l T7 oligo(dT) primer
- 2 μ l 10x pufr pro první řetězec (objemy jsou udány na jednu 20 μ l reakci)
- 4 μ l směs dNTP (složky byly přidávány v daném pořadí)
- 1 μ l inhibitor RNas
- 1 μ l ArrayScript (enzym).

Master mix byl jemně vortexován a krátce centrifugován (5s). Bylo přidáno 9 μ l master mixu do každého vzorku RNA, důkladně promícháno pipetováním (2 \times 3x) a 3 \times 4x cvrknuto 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 \times 3x) a 3 \times 4x cvrknuto do zkumavek. Krátce centrifugováno, umístěno do předem vychlazeného bloku cykleru na 16°C. Reakce byly inkubovány 2 hod 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 \times 3x), 3 \times 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 ($2 \times 3x$) a $3 \times 4x$ 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 μ l 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 předehřáto 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 μ l bylo přidáno 350 μ l cRNA vazebného pufru. Ihned bylo přidáno 250 μ l 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 μ l 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 naneseno 100 μ l 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 μ l). Pokud byla nižší než 150 ng/ μ l či byl nízký poměr absorbcí 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 μ l) a 2,5 násobek objemu 100% etanolu (275 μ l), 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 μ l 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 ($\geq 12 \mu$ l).

Výtěžek závisel na množství a kvalitě poly(A)RNA v celkové RNA. Byla změřena koncentrace na NanoDropu (1 μ l) a stanoven profil délek cRNA pomocí Bioanalyzeru 2100, Agilent (1 μ l), který má být mezi 250¹²–5500 nt s většinou cRNA mezi 1000¹²–1500 nt.

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

Byla přehřívána 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 μ g. Maximální možný objem je 10 μ l, 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 μ g cRNA v 10 μ l vody bez nukleas bylo přidáno 20 μ l *GEX-HYB*, byly jemně vortexovány a rychle centrifugovány.

Illumina Hyb Chamber Basket byl umístěn do *BeadChip Hyb Chamber*. Bylo pipetováno 200 μ l *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 μ l 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 předeřhřát blokovací pufr E1 (4 ml/čip). Bylo připraveno odpovídající množství blokovacího pufru E1 (2 ml/čip) se streptavidin-Cy3 (2 μ l 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 oddělována 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 předeřhřátý 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 pufrem 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 vyšpláchnutí 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 *ref* 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^{12'}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 záchranné 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^{12'}6 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

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	μg cRNA
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
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

ID	Vzorek	Pohlaví	Ročník	Exitus	Diabetes mellitus	Kouření	c (ng/μl) RNA	RIN	μg cRNA
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
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 obdržených 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 AIM vs. kontroly, 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 -hodnota $\leq 0,05$) i klinicky významných genů ($|\log_2$ -fold change ≥ 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 13 genů identifikovaná v rámci vynálezu, která se vzhledem k obecné české populaci z hlediska genové exprese jeví jako diagnostická ve

smyslu zvýšeného rizika výskytu akutního infarktu myokardu, bez fatálních následků v krátkodobém horizontu. Jedná se o sestavu genů, jejichž expresní intenzity, se ve skupinách pacientů s výskytem akutního infarktu myokardu bez fatálních následků do 6 měsíců od doby výskytu srdeční příhody (AIM) a pacientů kontrolních (Kontroly) odlišovaly statisticky významně na hladině statistické významnosti $\alpha=0,10$. Tuto množinu již nebylo možné pomocí prediktivního modelu PAM dále redukovat.

Množina 13 genů resp. lokusů a transkriptů 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 AIM a Kontrol jsou uvedeny v Tabulce 6. Simultánně snížené hodnoty intenzit genové exprese 9 genů/lokusů uvedených v tabulkách (OLIG2, MS4A3, CEBPE, LIPA, EPAS1, CLINT1, MYCT1, VPS29 a LOC130951) a současně zvýšené hodnoty genové exprese u genů VNN3, FOS, LOC645649 a lidského T-buněčného receptoru (RefSeq_ID „M97723“) vzhledem ke kontrolní obecné české populaci, indikují příslušnost pacienta k rizikové populaci AIM. Obecně naznačují zvýšené riziko výskytu akutního infarktu myokardu bez fatálních následků v krátkodobém časovém horizontu. Diagnóza na základě exprese genů, stanovené jak je popsáno v tomto vynálezu, by měla implikovat zvýšenou pozornost klinickým rizikovým faktorů výskytu akutního infarktu myokardu (např. výskyt diabetu mellitu, kouření, nadváha) a jejich cílené zvýšené prevenci.

Tabulka 4: Prediktivní diagnostická množina genů pro kontrast AIM vs Kontroly

Illumina ID	Název / Lokus genu	RefSeq_ID	Průměrná exprese	log ₂ FC	q-hodnota	Pravděpod. Diff. Expr.
1240136	OLIG2	NM_005806.2	6,41	-0,891	0,0756	0,954
2810373	VNN3	NM_001024460.1	9,98	0,498	0,0756	0,966
3400551	MS4A3	NM_006138.4	7,82	-0,635	0,0756	0,908
10332	CEBPE	NM_001805.2	6,91	-0,447	0,0756	0,944
4250379	FOS	NM_005252.2	10,27	0,388	0,0756	0,974
1470070	LIPA	NM_000235.2	10,17	-0,373	0,0756	0,978
4040148	LOC645649	XM_928663.1	8,01	0,286	0,0906	0,888
6940246	(M97723)	M97723	7,05	0,382	0,0756	0,949
780243	EPAS1	NM_001430.3	6,63	-0,314	0,0756	0,908
6370187	CLINT1	NM_014666.2	9,41	-0,246	0,0756	0,915
6280239	MYCT1	NM_025107.1	5,36	-0,150	0,0756	0,921
3400170	VPS29	NM_016226.2	10,57	-0,145	0,0756	0,912
4730343	LOC130951	NM_138804.2	5,14	-0,125	0,0756	0,920

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 Expresse ... Pravděpodobnost, že sledovaný gen je skutečně diferencially exprimován

Tabulka 5: Sekvence sond prediktivní diagnostické množiny genů pro kontrast AIM vs Kontroly

Illumina ID	Sekvence sondy	Definice
1240136	CACAAATGGTAAACTCCTCC ACGTGCTTCCTGCGTTCCGT GCAAGCCGCC	Lidský oligodendrocytový transkripční faktor 2 (Homo sapiens oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2)), mRNA.
2810373	GGCCCTGTATGGAAGAGTGT TTGAGAAGGACCCTCCACGC TTAGGGCAGG	Lidský vanin 3, transkripční varianta 3 (Homo sapiens vanin 3 (VNN3), transcript variant 3), mRNA.
3400551	GTTGGCGAGTCTGAGAGCA AGCCCAAATGTGTTCTTCAA AGGACAATGGG	Lidské membránové domény 4, podrodina A, člen 3, transkripční varianta 1 (Homo sapiens membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific) (MS4A3), transcript variant 1), mRNA.
10332	AGCAGCTCACCCAGGAGCT AGACACCCTCCGCAACCTCT TCCGCCAGATT	Lidský CAAT/zesilovač vázící protein, epsilon (Homo sapiens CAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon (CEBPE)), mRNA.
4250379	CCCAGTGACACTTCAGAGA GCTGGTAGTTAGTAGCATGT TGAGCCAGGCC	Lidský homolog v-fos FBJ myšího onkogenu virového ostaosarkomu (Homo sapiens v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS)), mRNA.
1470070	CCCGCTACTGTCGTTATTGA TCACATCTGTGTGAAGCAA AGCCCCGTGG	Lidská lipáza A, lysosomální kyselina, cholesterol esteráza, transkripční varianta 2 (Homo sapiens lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase (LIPA), transcript variant 2), mRNA.
4040148	TGCAGGTCCITTTGTATGCTG AGCGCCGGTCCCCTAGGCC ACTGTTGTTT	Lidský předpokládaný protein LOC 645649 (PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC645649 (LOC645649)), mRNA.
6940246	GTACCGTCAGCAACCTGGAC AGAGCCTGACACTGATCGC AACTGCAAATC	Lidský T-buněčný receptor (Human T-cell receptor (V beta 4.1-variant, J beta 2.1, C beta 2)) mRNA.
780243	AGCTGCACGGCATTACCCCA CACAGGGTGGCAGAACTTG AAGGGTACTG	Lidský endoteliální PAS doménový protein 1 (Homo sapiens endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1)), mRNA.
6370187	TGGCAAGGCTTCCTTCCGTG TTTATCCCTGTAGCCATCAT TTAAGTCAGG	Lidský klathrinový interaktor 1 (Homo sapiens clathrin interactor 1 (CLINT1)), mRNA.
6280239	AGTGGCTGTGAACGTCGAA GCAACCTCAGCCTGGCCAGT CTCACCTTCCA	Lidský cíl myc 1 (Homo sapiens myc target 1 (MYCT1)), mRNA.
3400170	GCCCTGTTGCAGAGGCAATT TGATGTGGACATTCTTATCT CGGGACACAC	Lidský vakuolární protein 29, transkripční varianta 1 (Homo sapiens vacuolar protein sorting 29 (yeast) (VPS29), transcript variant 1),

		mRNA.
4730343	AATCCAAGCCTCATTTCAGA GCCTGTGCCCTTCCCCTACTAC ACCACCAGGC	Lidský předpokládaný protein BC014602 (Homo sapiens hypothetical protein BC014602 (LOC130951)), mRNA.

Tabulka 6: Průměrné hodnoty logaritmovaných genových expresí prediktivní diagnostické množiny genů pro kontrast AIM vs Kontroly

Illumina ID	Název / Lokus Genu	Průměrná Expese	
		AIM	Kontroly ^(*)
1240136	OLIG2	5,99	6,88
2810373	VNN3	10,20	9,69
3400551	MS4A3	7,56	8,17
10332	CEBPE	6,68	7,13
4250379	FOS	10,43	10,04
1470070	LIPA	10,02	10,35
4040148	LOC645649	8,15	7,85
6940246	(M97723)	7,26	6,92
780243	EPAS1	6,45	6,75
6370187	CLINT1	9,29	9,52
6280239	MYCT1	5,28	5,43
3400170	VPS29	10,50	10,64
4730343	LOC130951	5,10	5,20

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

Porovnáním hladin genové exprese ve skupinách AIM a Kontrol bylo zjištěno celkem 13 genů s „up-“ resp. „down-regulovanou“ genovou expresí. Z toho 4 geny vykazovaly zvýšené hladiny (VNN3, podobně jako v případě kontrastu AIMD6 vs Kontroly), a dále FOS, M97723 a LOC645649. Zbývajících 9 genů demonstrovalo snížené hladiny genové exprese (OLIG2, CEBPE, LIPA, MS4A3, EPAS1, CLINT1, VPS29, LOC130951 a MYCT1). U dvou ze sedmi uváděných genů lze biologickou funkci popsat jako enzymatickou aktivitu - VNN3 (vanin 3) a LIPA. Dva zástupce lze popsat jako struktury blízké buněčným receptorům – RefSeq_ID M97723.1, T-buněčný receptor, který je složen z variant podjednotek V, J, C (V, beta 4.1-varianta, J, beta 2.1-varianta a C, beta 2-varianta, MS4A3, transmembránový protein s potenciálními fosforylačními místy na N- i C-konci, může hrát roli v signální transdukcii hematopoetických buněk. Zbýlých 9 genů lze popsat jako geny kódující struktury proteinové povahy s regulačními vlastnostmi - MYCT1, up-stream transkripční aktivátor v buňce, OLIG2, transkripční faktor ovlivňující některé fáze buněčného cyklu, FOS, CEBPE, regulační vazebné proteiny, EPAS1, u nějž byla pozorována role v odpovědi na hypoxické stavy v placentě či plicích a již v roce 1997 byl popsán jako důležitý regulátor vaskularizace, CLINT1, z mála informací o biologické roli tohoto proteinu lze zmínit jeho účast ve zpětném

transportu endogenních tzv. „cargo“-proteinů, **VPS29**, gen kódující tzv. „třídící“ vakuolární protein, jehož biologická funkce je lokalizována do lysozomů **LOC645649** a **LOC130951**, oba dva hypotetické proteiny, jejichž funkce dosud popsána nebyla. LOC645649 byl odstraněn z NCBI databáze.

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 shrnuty 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)
AIM vs Kontroly	SE= 0,73, SP= 0,87 (13 transkriptů)

Pro diagnostiku populace AIM (kontrast AIM vs Kontroly) jsou poněkud nižší hodnoty senzitivity i specifity klasifikačního testu na základě PAM modelu vzhledem k obecné české populaci dány obtížnou rozlišitelností z hlediska klinického, a to zejména nižšími hodnotami \log_2FC , které nedosahovaly požadované úrovně klinické významnosti.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob identifikace osob se zvýšeným genetickým rizikem výskytu akutního infarktu myokardu, a popřípadě s nízkým rizikem následného 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 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
OLIG2	1	6,88	-0,891
VNN3	2	9,69	0,498
MS4A3	3	8,17	-0,635
CEBPE	4	7,13	-0,447
FOS	5	10,04	0,388
LIPA	6	10,35	-0,373
LOC645649	7	7,85	0,286
(M97723)	8	6,92	0,382
EPAS1	9	6,75	-0,314
CLINT1	10	9,52	-0,246
MYCT1	11	5,43	-0,150
VPS29	12	10,64	-0,145
LOC130951	13	5,20	-0,125

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 výskytu akutního infarktu myokardu a popřípadě s nízkým rizikem následného 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.
OLIG2	1
VNN3	2
MS4A3	3
CEBPE	4
FOS	5
LIPA	6
LOC645649	7
(M97723)	8
EPAS1	9
CLINT1	10
MYCT1	11
VPS29	12
LOC130951	13

303405

0.3

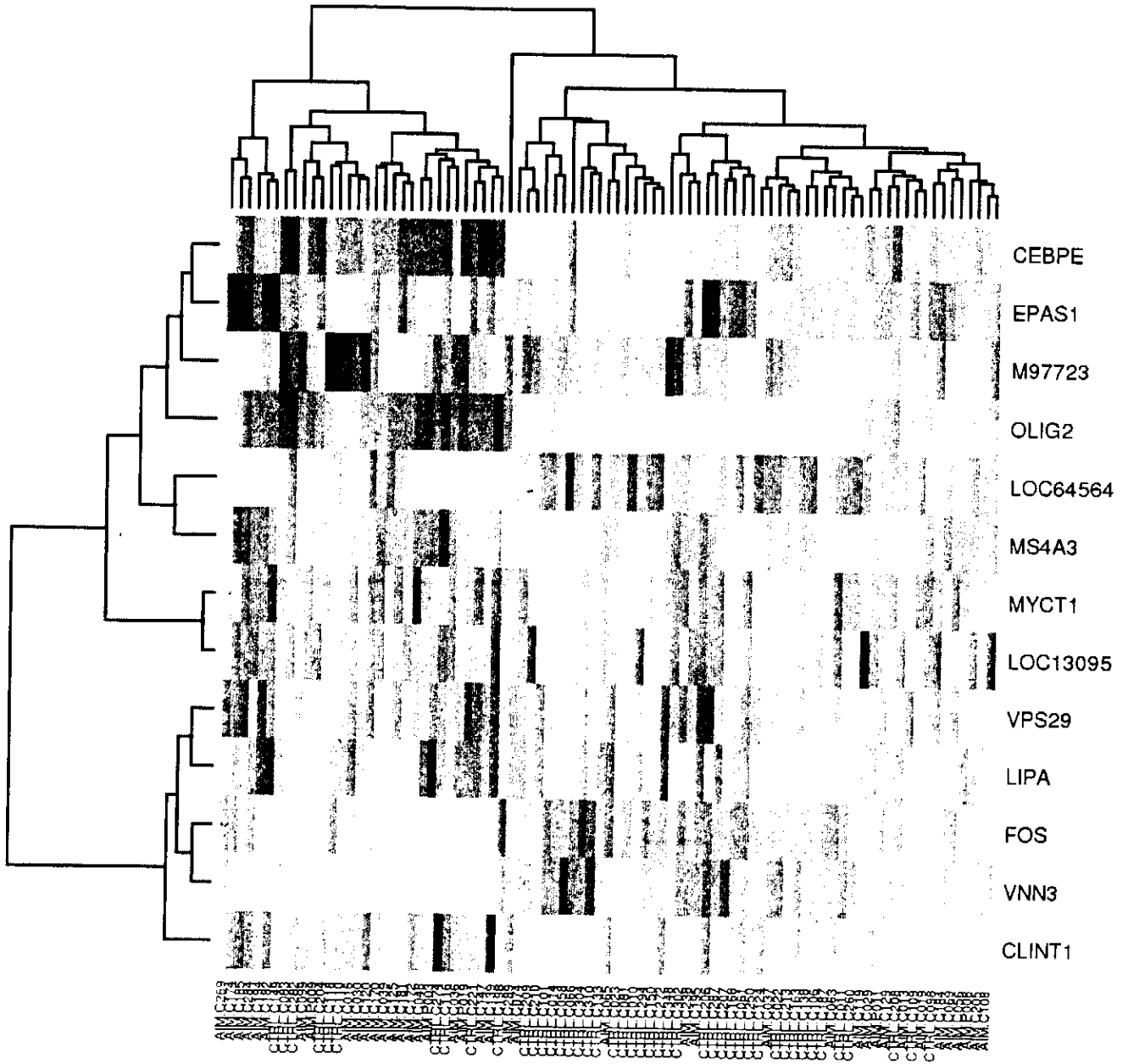
36

150011

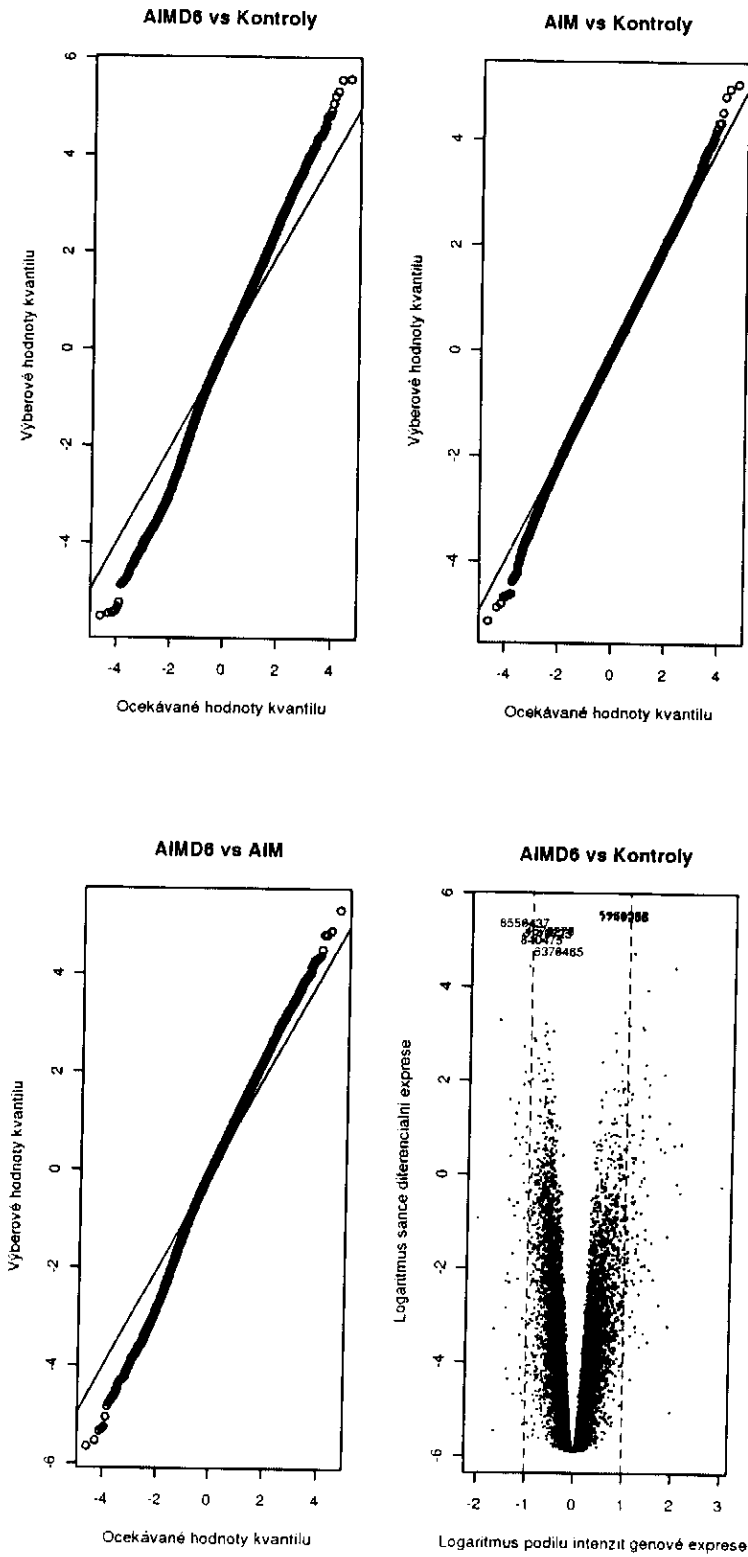
PV 2011 - 578

D56487

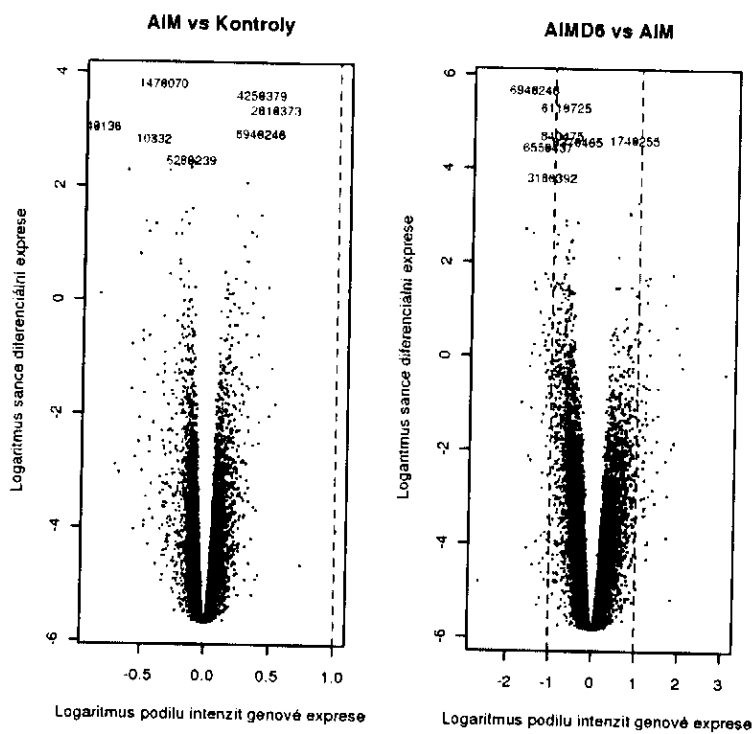
Obr. 1



Obr.2



Obr. 2 - pokračování



sequence listing divisional 1.ST25
SEQUENCE LISTING

PV 2011 - 578

D5G 187 1102

<110> Ustav informatiky AV CR, v.v.i., Centrum biomedicinske informatiky

<120> Způsob identifikace osob se zvýšeným genetickým rizikem výskytu infarktu myokardu

<130> P1

<160> 13

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2505

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gtgcggatgc ttattataga tcgacgcgac accagcgccc ggtgccaggt tctcccctga	60
ggcttttcgg agcgagctcc tcaaatcgca tccagatttt cgggtccgag ggaaggagga	120
ccctgcgaaa gctgcgacga ctatcttccc ctggggccat ggactcggac gccagcctgg	180
tgtccagccg cccgtcgtcg ccagagcccc atgacctttt tctgccggcc cggagtaagg	240
gcagcagcgg cagcgccttc actgggggca ccgtgtcctc gtccaccccc agtgactgcc	300
cgccggagct gagcgcggag ctgcgcggcg ctatgggctc tgcgggcgcg catcctgggg	360
acaagctagg aggcagtggc ttcaagtcac cctcgtccag cacctcgtcg tctacgtcgt	420
cggcggctgc gtcgtccacc aagaaggaca agaagcaaat gacagagccg gagctgcagc	480
agctgcgtct caagatcaac agccgcgagc gcaagcgcac gcacgacctc aacatcgcca	540
tggatggcct ccgcgaggtc atgccgtacg cacacggccc ttcgggtgcgc aagctttcca	600
agatcgccac gctgctgctg gcgcgcaact acatcctcat gctcaccaac tcgctggagg	660
agatgaagcg actggtgagc gagatctacg ggggccacca cgctggcttc caccgcgcgg	720
cctgcggcgg cctggcgcac tccgcgcccc tgcccgcgc caccgcgcac ccggcagcag	780
cagcgcacgc cgacatcac cccgcgggtc accaccccat cctgccgccc gccgccgag	840
cggctgctgc cgccgctgca gccgcggctg tgtccagcgc ctctctgccc ggatccgggc	900
tgccgtcggc cggctccatc cgtccaccgc acggcctact caagtctccg tctgctgccg	960
cggccgcccc gctggggggc gggggcggcg gcagtggggc gagcgggggc ttccagcaact	1020
ggggcggcat gccctgcccc tgcagcatgt gccaggtgcc gccgccgac caccacgtgt	1080
cggctatggg cgccggcagc ctgccgcgcc tcacctccga cgccaagtga gccgactggc	1140
gccggcgcgt tctggcgaca ggggagccag gggccgcggg gaagcgagga ctggcctgcg	1200
ctgggctcgg gagctctgtc gcgaggaggg gcgcaggacc atggactggg ggtggggcat	1260
ggtggggatt ccagcatctg cgaacccaag caatgggggc gccacacagag cagtggggag	1320
tgaggggatg ttctctccgg gacctgatc agcgtgtct ggctttaacc tgagctggtc	1380
cagtagacat cgttttatga aaaggtaccg ctgtgtgcat tcctcactag aactcatccg	1440

11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

sequence listing divisional 1.ST25

acccccgacc cccacctccg ggaaaagatt ctaaaaactt ctttcctga gagcgtggcc 1500
 tgacttgag actcggcttg ggcagcactt cgggggggga ggggggtgta tgggaggggg 1560
 acacattggg gccttgctcc tcttcctcct ttcttggcgg gtgggagact cgggtagcc 1620
 gactgcaga agcaacagcc cgaccgcgcc ctccagggtc gtccctggcc caaggccagg 1680
 ggccacaagt tagttggaag cggcgcttcg gtatcagaag cgctgatggc catatccaat 1740
 ctcaatatct ggggtcaatcc acaccctctt agaactgtgg ccgttcctcc ctgtctctcg 1800
 ttgatttggg agaatatggt tttctaataa atctgtggat gttccttctt caacagtatg 1860
 agcaagtta tagacattca gagtagaacc acttgtggat tggaataacc caaaactgcc 1920
 gatttcaggg gcgggtgcat tgtagttatt attttaaaat agaaactacc ccaccgactc 1980
 atctttcctt ctctaagcac aaagtgattt ggttattttg gtacctgaga acgtaacaga 2040
 attaaaaggc agttgctgtg gaaacagttt gggttatttg ggggttctgt tggcctttta 2100
 aaattttctt ttttgatgt gtaaatttat caatgatgag gtaagtgcgc aatgctaagc 2160
 tgtttgctca cgtgactgcc agccccatcg gagtctaagc cggcttcct ctattttggt 2220
 ttatttttgc cacgtttaac acaaatgta aactcctcca cgtgcttctt gcgttccgtg 2280
 caagccgcct cggcgtgcc tgcgttcaa actgggcttt gtagcgtctg ccgtgtaaca 2340
 cccttcctt gatcgcaccg ccctcgcag agagtgtatc atctgttta tttttgtaa 2400
 aacaaagtgc taaataatat ttattacttg tttggttgca aaaacggaat aatgactga 2460
 gtgttgagat tttaataaaa atttaaagca aaaaaaaaaa aaaaa 2505

- <210> 2
- <211> 1780
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 2
 aatgtaaagt ttttcagtg aaacaaaacg taagaatctg agtttgtttt tcaaagatca 60
 ctaaatttta gttatgatta tatcacattt tccaaaatgt gtggcagttt ttgccctcct 120
 tgctctgagt gttggtgcac tggacacttt tattgctgca gtatatgagc atgcggtgat 180
 attaccaaac agaacagaaa cacctgtttc aaaagaagaa gctttgctcc tgatgaacaa 240
 gaacatagat gttttggaga aagcagttta gctggcagcg aagcagggtg cacatatcat 300
 tgtgacccca gaagatggaa tctatggttg gatcttcacc agggagagca tttaccctta 360
 tctagaggat ataccagacc ctggagtga ctggattcca tgtagagacc cctggagaaa 420
 tcactaaaat atagtaagt tgaggaaatg tctattgaat tagattcggc aacacaccag 480
 tgcaacaaag actcagctgc ctggccaagg acaactctat ctatgtcgtg gctaatttg 540
 gggacaagaa gccatgcaat gccagtgact ctcagtgtcc ccctgatggc cgttaccaat 600
 acaactga tgtggtgttt gattctcagg gaaaactgtt ggcacgctac cataagtaca 660
 atctttttgc acctgaaatt cagtttgatt tcccaagga ttcagaactt gtgacttttg 720
 acactccctt tgggaagttt ggcattttta ctgttttga cttttttct catgaccag 780

sequence listing divisional 1.ST25

ctgtggtggt ggtggatgag tttcaattga cagcattctc tacccacag catggtacaa	840
cacgctgccc ctctctcgg ctgttcctt ccattcagca tggccaagg ccatgggagt	900
caatctactt gctgcaaata cccacaacac cagcatgcac atgacagga gtggaatcta	960
cgccccagaa gcagtcaagg tgtaccacta tgacatggaa acagagagtg gtcagctgtt	1020
gctatcagaa ctgaagtctc ggccccgccc tgagcccacc taccctgcag ctgttgactg	1080
gcatgcgtat gccagcagtg tcaagccatt ttctctgaa cagtcagatt ttctggggat	1140
gatttatttt gatgagttta ccttcaccaa gcttaagaga aatacaggaa attacacagc	1200
ttgccagaaa gatctgtgtt gtcacttaac ttacaagatg tctgagaagc gaacagacga	1260
gatctatgcc ctagggtgctt ttgatggact gcacacagta gaaggccaat attacttaca	1320
gatatgtgca ttactgaagt gtcaaaccac tgacctggaa acgtgtggag aacctgtggg	1380
gtcagctttt accaagtttg aagacttctc cctcagtggc acatttgaa cgcgttatgt	1440
ttccccacag atcattctaa gtgggagtca gcttgcccct gaaagacatt atgagatttc	1500
aagagatgga cgcttgagga gccgaagtgg agccccttg cctgtcttag ttatggccct	1560
gtatggaaga gtgtttgaga aggaccctcc acgcttaggg cagggatctg ggaaattcca	1620
gtgatctcct ttagcagagc ccttttagga ttagcctggc taagaaagga agaaaaaaaa	1680
gagatccgtt agtgtctgt tagaaaagat gttataaact tacagaaaca aatataataa	1740
actgaagcag atttgaaaag caaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1780

<210> 3
 <211> 1665
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3	
ggaggcttcc gttatcggga aaagatgctg tagtgatctt ttctgagtgt ctctacttg	60
cgacaagggtg gacttgggag gaaagccgtc tgccaaagcc tgaagcctcc aagccataaa	120
caacccaat ggctccac gaagttgata atgcagagct ggggtcagcc tctgcccattg	180
gtaccccagg cagtgagggc ggaccagaag agctgaatac ttctgtctac cagcccatag	240
atggatcacc agattatcag aaagcaaaat tacaagttct tggggccatc cagatcctga	300
atgcagcaat gattctggct ttgggtgtct ttctgggttc cttgcaatac ccataccact	360
tccaaaagca ctctttttc ttcaccttct acacaggcta cccgatttgg ggtgctgtgt	420
ttttctgtag ttcaggaacc ttgtctgttg tagcagggat aaaaccaca agaacatgga	480
tacagaacag ttttgaatg aacattgcca gtgctacaat tgcactagtg gggactgctt	540
ttctctcact aaatatagca gttaatatcc agtcattaag gagttgtcac tcttcatcag	600
agtcaccgga cctatgcaat tacatgggct ccatatcaaa tggcatgggtg tctctactgc	660
tgattctcac cttgctggaa ttatgcgtaa ccatctctac catagccatg tgggtgcaatg	720
caactgctg taattcaaga gaggaaattt cctcacctcc caattctgtg taatcaagaa	780

sequence listing divisional 1.ST25

tacctcctta attctgagag catgaatatt tgaccttaaa tctccagtga ctcagagctt	840
caccacaaa ctcaggagaa cataagcctg ctcgtaaagc tcaatccttc tatcatggca	900
ccaatcacia gaaccttggga cgtttgactg actctatcct ttctctccta actataaatc	960
ctattttgtgt gtcgtgggta tgggaaggaca gatatatctt tttaggcatt cttggatata	1020
tgtaacttct atgatcatta ctccaaagtt gtttccagaa attgggttcta tttcttctta	1080
tccacctact ccattgcttt atgagggtta aggaaggaag gcggtataat ccctattcaa	1140
tatatttttt ctaaaatcca acttctgacc gcccagtagg aagaaaaatg agacattttt	1200
tccattacag agaaatgctt cttgacttta acatcagcat tataaaaagt gtcaaataaa	1260
aaattacat cattatcatt aaaataaatt ttcactgtat ttgagatggg agggttaagg	1320
ctcagggatt ttatttcagt gaactgctgg aactcacaca tgccctgata tgtaaatgat	1380
gatttatggt ggcgagtctg agagcaagcc caaatgtggt cttcaaagga caatgggaaa	1440
ctgtaaagta gagaactaaa gaataaggcc tttagaatct gacacatctg ggttcaaatt	1500
ctgaaactgt cacttattac ctgtatgaac atgggcaaat tatctaactt ctctgatcta	1560
tttttcctca tctgtaaaat aggtgtaata ataacaacta ctttgctcggg tgctctgagg	1620
gttaaatgaa aataaaaaga aaatgtgaaa cagcaaaaaa aaaaa	1665

<210> 4
 <211> 1250
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4	
gagagaggcc acacaggagt ggggtgacaga ggagactgca gagggcaggt ctagggcaga	60
agatcgagag agggcaggcc caggtcagga ggaggtagag agagggcagc cggagcacc	120
caaggggtgc ctcaagagca ggtgggggcg gggagccgag ggggcgggcc ggccatgtcc	180
cacgggacct actacgagtg tgagccccgg ggtggccagc agccactcga gttctcagg	240
ggccgagctg ggcccgggga gctaggggac atgtgtgagc atgaggcctc cattgacctc	300
tccgcctaca tcgagtctgg ggaagagcag cttctctccg atctctttgc cgtgaagcca	360
gcgcctgagg ccagaggcct caagggcccc ggaaccctg cttccccca ctacttgccg	420
cctgaccctc ggccctttgc ctaccctcca catacctcg gccagacag gaaggcgtg	480
gggcctggca tctacagcag cccagggagc tacgaccca gggctgtggc ggtgaaggag	540
gagccccggg ggccagaggg cagccgagct gccagccgag gcagctaaa tccccctgag	600
taccaagtgg cacactgtgg gcagacagcc atgcacctgc cccaactct ggcagcacc	660
ggccagcctc tgcgcgttct caaggccct ttggccactg ccgcacccc ctgcagtccc	720
ctctgaagg cgccctcccc ggctggcccc ttacacaagg gcaagaaggc agtgaacaaa	780
gatagccttg agtaccggct gaggcgggag cgcaacaaca tcgccgtgcg caagagccga	840
gacaaggcca agaggcgcag tctggagacg cagcagaagg tgctggagta catggcagag	900
aacgagcgc tccgcagccg cgtggagcag ctcaccagag agctagacac cctccgcaac	960

sequence listing divisional 1.ST25

```

ctttccgcc agattcctga ggcggccaac ctcatcaagg gcgtgggggg ttgcagctga    1020
ggctggctgg tggattgtgg gcaccaggct ccctggcacg gcctaactct gcggaccccc    1080
atcctgctgg gggcctagaa ccctgagaca tagaccatgg ataaatggca accgggggtgg    1140
caaagagggc aggaccagc ataatgatta tatggctgaa taaagttgca ctgtgactgg    1200
gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa    1250

<210> 5
<211> 2158
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
attcataaaa cgcttgttat aaaagcagtg gctgcggcgc ctctactcc aaccgcatct    60
gcagcgagca tctgagaagc caagactgag ccggcggccg cggcgcagcg aacgagcagt    120
gaccgtgctc ctaccagct ctgctccaca gcgcccacct gtctccgccc ctcgccccct    180
cgccccgctt tgcctaaccg ccacgatgat gttctcgggc ttcaacgcag actacgaggc    240
gtcatcctcc cgctgcagca gcgcgtcccc ggccggggat agcctctctt actaccactc    300
acccgcagac tccttctcca gcatgggctc gcctgtcaac gcgcaggact tctgcacgga    360
cctggccgct tccagtgcc aattcattcc cacggtcact gccatctcga ccagtccgga    420
cctgcagtgg ctggtgcagc ccgccctcgt ctctccgctg gccccatcgc agaccagagc    480
ccctcacctt ttcggagtcc ccgccccctc cgtcggggct tactccaggg ctggcgttgt    540
gaagaccatg acaggaggcc gagcgcagag cattggcagg aggggcaagg tggaacagtt    600
atctccagaa gaagaagaga aaaggagaat ccgaagggaa aggaataaga tggctgcagc    660
caaatgccgc aaccggagga gggagctgac tgatacactc caagcggaga cagaccaact    720
agaagatgag aagtctgctt tgcagaccga gattgccaac ctgctgaagg agaaggaaaa    780
actagagttc atcctggcag ctaccgacc tgctgcaag atccctgatg acctgggctt    840
cccagaagag atgtctgtgg cttcccttga tctgactggg ggcctgccag aggttgccac    900
cccggagtct gaggaggcct tcaccctgcc tctcctcaat gaccctgagc ccaagccctc    960
agtggaacct gtcaagagca tcagcagcat ggagctgaag accgagccct ttgatgactt    1020
cctgttccca gcatcatcca ggcccagtgg ctctgagaca gcccgctccg tgccagacat    1080
ggacctatct gggtccttct atgcagcaga ctgggagcct ctgcacagtg gctccctggg    1140
gatggggccc atggccacag agctggagcc cctgtgcact ccggtggtca cctgtactcc    1200
cagctgcact gcttacacgt cttccttcgt cttcacctac cccgaggctg actccttccc    1260
cagctgtgca gctgcccacc gcaagggcag cagcagcaat gagccttctt ctgactcgtt    1320
cagctcacc acgctgctgg ccctgtgagg gggcagggaa ggggaggcag ccggcaccca    1380
caagtgccac tgcccagct ggtgcattac agagaggaga aacacatctt ccctagaggg    1440
ttcctgtaga cctagggagg accttatctg tgcgtgaaac acaccaggct gtgggcctca    1500

```

sequence listing divisional 1.ST25

aggacttgaa agcatccatg tgtggactca agtccttacc tcttccggag atgtagcaaa	1560
acgcatggag tgtgtattgt tcccagtgac acttcagaga gctggtagtt agtagcatgt	1620
tgagccaggc ctgggtctgt gtctcttttc tctttctcct tagtcttctc atagcattaa	1680
ctaacttatt gggttcatta ttggaattaa cctggtgctg gatattttca aattgtatct	1740
agtgcagctg attttaacaa taactactgt gttcctggca atagtgtgtt ctgattagaa	1800
atgaccaata ttatactaag aaaagatacg actttatttt ctggtagata gaaataaata	1860
gctatatcca tgtactgtag tttttcttca acatcaatgt tcattgtaat gttactgatc	1920
atgcattgtt gaggtggtct gaatgttctg acattaacag ttttccatga aaacgtttta	1980
ttgtgttttt aatttattta ttaagatgga ttctcagata tttatatttt tattttattt	2040
ttttctacct tgaggtcttt tgacatgtgg aaagtgaatt tgaatgaaaa atttaagcat	2100
tgtttgctta ttgttccaag acattgtcaa taaaagcatt taagttgaat gcgaccaa	2158

<210> 6
 <211> 2654
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6	
ttcccgggtgg ctggctgctc tgattggctg aacaaatagt ccgagggtgg tgggcatccg	60
ccctcccgcac aaggcagacc aggccccctg caggtcccct atccgcaccc cggccccctga	120
gagctggcac tgcgactcga gacagcggcc cggcaggaca gctccagaat gaaaatgcgg	180
ttcttgggggt tgggtggtctg tttggttctc tggaccctgc attctgaggg gtctggaggg	240
aaactgacag ctgtggatcc tgaacaac atgaatgtga gtgaaattat ctcttactgg	300
ggattcccta gtgaggaata cctagttgag acagaagatg gatataattct gtgcctaac	360
cgaattcctc atgggaggaa gaaccattct gacaaaggtc ccaaaccagt tgtcttctctg	420
caacatggct tgctggcaga ttctagtaac tgggtcacia accttgccaa cagcagcctg	480
ggcttcattc ttgctgatgc tggttttgac gtgtggatgg gcaacagcag aggaaatacc	540
tggctctcga aacataagac actctcagtt tctcaggatg aattctgggc tttcagttat	600
gatgagatgg caaaatagc cctaccagct tccattaact tcattctgaa taaaactggc	660
caagaacaag tgtattatgt gggtcattct caaggcacca ctataggttt tatagcattt	720
tcacagatcc ctgagctggc taaaaggatt aaaatgtttt ttgccctggg tctgtggct	780
tccgtcgcct tctgtactag ccctatggcc aaattaggac gattaccaga tcatctcatt	840
aaggacttat ttggagacaa agaatttctt ccccagagtg cgtttttgaa gtggctgggt	900
accacgttt gcaactcatgt cactactgaag gagctctgtg gaaatctctg ttttcttctg	960
tgtggattta atgagagaaa tttaaatag tctagagtgg atgtatatac aacacattct	1020
cctgctggaa cttctgtgca aaacatgtta cactggagcc aggctgttaa attccaaaag	1080
tttcaagcct ttgactgggg aagcagtgcc aagaattatt tcattacaa ccagagttat	1140
cctcccacat acaatgtgaa ggacatgctt gtgccgactg cagtctggag cgggggtcac	1200

sequence listing divisional 1.ST25

gactggcttg cagatgtcta cgacgtcaat atcttactga ctcagatcac caacttgggtg 1260
 ttccatgaga gcattccgga atgggagcat cttgacttca tttggggcct ggatgccctt 1320
 tggaggcttt ataataaaat tattaatcta atgaggaaat atcagtgaaa gctggacttg 1380
 agctgtgtac caccaagtca atgattatgt catgtgaaaa tgtgtttgct tcatttctgt 1440
 aaaacacttg tttttctttc ccaggtcttt tgttttttta tatccaagaa aatgataact 1500
 ttgaagatgc ccagttcact ctagtttcaa ttagaaacat actagctatt ttttctttaa 1560
 ttagggctgg aataggaagc cagtgtctca accatagtat tgtctcttta agtctttaa 1620
 atatcactga tgtgtaaaaa ggtcattata tccattctgt ttttaaaatt taaaatata 1680
 tgactttttg ccttcatag gacaaagtaa tatatgtgtt ggaattttaa aattgtgttg 1740
 tcattggtaa atctgtcact gacttaagcg aggtataaaa gtacgcagtt ttcattgctt 1800
 tgccttaaag agctctctag tctaacggtc ttgtagttag agatctaaat gacattttat 1860
 catgttttcc tgcagcaggt gcatagtcaa atccagaaat atcacagctg tgccagtaat 1920
 aaggatgcta acaattaatt ttatcaaacc taactgtgac agctgtgatt tgacacgttt 1980
 taattgctca ggttaaataa aatagttttc cggcgtcttc aaaaacaaat tgcactgata 2040
 aaacaaaaac aaaagtatgt tttaaatgct ttgaagactg atacactcaa ccatctatat 2100
 tcatgagctc tcaatttcat ggcaggccat agttctactt atctgagaag caaatccctg 2160
 tggagactat accactatth tttctgagat taatgtactc ttggagcccc ctactgtcgt 2220
 tattgatcac atctgtgtga agccaaagcc ccgtggttgc ccatgagaag tgtccttggt 2280
 cattttcacc caaatgaagt gtgaacgtga tgttttcgga tgcaaaactca gctcagggat 2340
 tcattttgtg tcttagtttt atatgcatcc ttatttttaa tacacctgct tcacgtcctt 2400
 atgttgggaa gtccatattt gtctgctttt cttgcagcat catttcctta caaactgtc 2460
 cgggtggaaa aatgacaatt gatatgtttt tctgatataa ttacttttagc tgcactaaca 2520
 gtacaatgct tgttaatggt taatataggc agggcgaata ctactttgta acttttaaag 2580
 tcttaaaact ttcaataaaa ttgagtgaga cttataggcc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2640
 aaaaaaaaaa aaaa 2654

<210> 7
 <211> 4846
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 tccggcctat ttctctgcag cgctccttcc ctggcccgga gacggaaagg cacacgggtg 60
 gcaggtgcag agacaccatg tccttaggag gcagcactct aagagtgggtg aaaaccctc 120
 ccactgctca ccttgggtctc tcttccttct ctcccttacc cttgttcaag ggccccgggt 180
 tggcttcaac ccggggcttc catggtttca ggttttctt cccttccttt tcccccaagg 240
 tcgctggaac cagggctgcc ttccagcact tcatggggca cctgggtactt ctggccgtgt 300

sequence listing divisional 1.ST25

```

ggccaaaggc cccgcagttt ttgcacttga gctgtgggtg gaaaggaagt gatgtcagtg      360
agtgagctga agccacaggc agcgatccca cgtcaacatt gggacggatt gtgaattcag      420
agctgaataa ggattccaaa gaggggacac cggcatgggg gccgттаagt gctgggagag      480
ttcggatacg atgttccctc gcaaagcccg tgtgacggag gaactctgaa aggaaggact      540
caaggttcca aggggcacga tgggtgaagcc gatgtcaaca acgcagccaa acgtggctac      600
acaggactct aagtagaaag ggaggttgcc cccaagagtc tctcaaggga cctatcgggc      660
cggggagaag gtcccaagcc acgcccacct tggatgggaa aagcaacctg gctggtggtg      720
acagaactct ttggaatcca acccagtctc tgaggaccgt gggacacccc ctccccctgt      780
ccccacccc accccgatac ccaagagatc cagggctaga cttaccctgg gatcttcttc      840
atcgggcggg ggagcccttg gcccaactgg ggcctccgc tgcttctgga gggctctgggc      900
tctcaccagt ctcttggccc aagatgtggg gtcccagcgt gccatcatct tCGTctcctg      960
ggggttttat gaccgccttt ttcaggggtg gactgttggg ccacctgaaa cacacacaaa     1020
cacacacatg tcgatggtta agcacgttgg atattcacac acccacagga agccacctgc     1080
taactccctg cctgtgtggt catgaggaga cctcaccacc agtcgggtcaa atctgtagaa     1140
cacaatgtgc tgtgcgatt ctcgatatt gtgtgttcct ctgccatgac tacctagtcc      1200
aagagtaaac cccacctgcc acagggcccg tggcctaggt atgggggggt gagctttcaa     1260
ccccaaaca acaactgatt ctggagactg gacttaggtc tctcacgatt cactccgta      1320
gaagacacgg tgattctatc tcccttgacg gacagaatga tcgaagacac agggcatggc     1380
gtgtgccacc ctttggcagg tctgcttgaa gtcagggata agggatgctt cctgtgacaa     1440
cttgaatcgc tactcttgcc atttcattag gcaacttcca aacacaaatt catacagaga     1500
agttaccttc ctctctaccg cactagcagg tgatggtctt tcctgttcta tcttttggct     1560
ttagctccag cccctcttta tttattttcc tggattttta cgcataccac acgaattcat     1620
ctgaacaac ggggaagaag tgccatatcg tatcgacgtc ttacacggct caagggccaa     1680
ccaccctttt ttccaaagtc cttttgccgt ttaccacca attcagcatg ctgcagtaca     1740
tttcttttcg cattcccatc ttggctcttct cccacacgtg gagacggata tgttttctcg     1800
ttttctgttc caggaattac tagtaacgag aacacatcct accccaccag caagccccag     1860
tgtgatcggg ttctttcggc ctcttttgtc tcttctccc cccaccccc cgcaaaaacc     1920
ccccagggat tgcgtgaaag aaacaattgt tcagcgaaac caacctgaaa ttacacgtct     1980
actttctttc ccaggctggc gctgagatgg gcagggtctg cagcagcccc gctggaagcg     2040
atgcagcatc caggacgacg gaggaagggg cggagagggg cctctgcttt ccaggctgcc     2100
ttttatactg cctctggtca cctgacatgg aacgtaccct aacctaata gttacctgta     2160
ccttaattgc aattaactta atccaattac atgacctgga aaggtctatc tgcacagccc     2220
actctaagat cctgtccact gctgacagac attctaaaac ctacttgtag agctgcaagc     2280
tttgaacaat agatgttccc cgtcagacat gtaactctgg tgctgtatc cctgtcttct     2340

```

sequence listing divisional 1.ST25

tttccatctt	ttttgttggt	ttgttttggt	tcgttttaaa	aaatgtggta	aaatagacac	2400
cttttaattg	gaccacattt	tgtctctctc	gacgtaggcc	tcagtgtcat	caaggagact	2460
ctccttgaca	tgcagtcacg	gccatgatcc	atcttcagag	cttctctttc	ttccccaagg	2520
taagtctgtc	agcagagaac	cctgaccgca	ccctcatgtg	ttttctcccc	caggaggcgc	2580
ttggaaacca	ccgtgaattg	gaccgcactg	ggaaacacag	atgaggaaaag	tcaacaacgc	2640
tttgtccttc	agtgcctgcc	tcctttttca	gctcgtcttg	cgactccccg	acgcctgtga	2700
ggctgtaatt	ccctgggtcc	cattgccatg	tctctggatt	tgcgaagatc	caccgcacct	2760
tctgtggaac	tcccgtgtcg	gtgaactttt	gtgccacggc	ccctaattct	gcccattggtc	2820
atccgcacct	gcacgactta	gggtccatgt	tccttgagc	ggaagagaca	ggcaggagtc	2880
ggaatgatga	accagcacac	tggggcgttt	tctcatgtag	cccaagtgac	cccattggtct	2940
tctcgagctt	tggaaccagt	cgcgtcccc	ttgacactgc	acccggctcc	cagtctctca	3000
atcttgttgg	ccctccggcg	atctcccgtt	ggatgaattg	ctcctgctga	aactccagtc	3060
ccctttgatt	tgcgcttcat	taattattca	tgattcaggt	tggaaggcct	gctgacgacc	3120
ccctgtggcc	gttctctgag	ctttctctgtc	acatcgtttc	cttcacgct	ctttggttcc	3180
ttatggtcct	gctccctctg	ctgtcagagg	agcagagagt	tgatcttatt	cattctggat	3240
acggatactt	tctaggtgat	ctggataatc	aagataacga	ccctcaacag	cggcggagag	3300
ggagcagcca	gttgggtgtg	ctcagaaaat	cccactgagt	tccgaggcct	cctagatgtg	3360
gaatcctgct	gagagtgtt	cccaggtcag	agaatggaga	gagcctgtgc	atgatgggat	3420
atccctgcct	agatctttca	gtgagtctct	acctcagcta	ctcttaggat	cagggggaga	3480
accatggtgt	cagacatccg	gaaagaagac	gggatgaatg	ttttacctct	gaagtacatc	3540
ccaaatgtgg	gagttaactt	cagctttgct	ggggctctatt	tggccagtga	aactctgcct	3600
ggttccttcg	cacatccgga	agccacttca	cggggggccg	tcgcaactgg	aaccacacac	3660
ttggcatcgg	cggttgagcc	aaatggggac	tcgtggtgca	agcaacgctc	cccacgtggt	3720
agcgtgctg	agatgcggtt	ggcgggattt	tactaggtgc	gtgttggtag	agtggggctg	3780
aggttttctt	gctcctgtgg	atgtatagca	agtcaaaggt	cctgcccagc	cctgcggtcc	3840
cctcagtcaa	ctctgtttcg	gagacgtaac	gatttggtt	gccaacaagt	caagaaatgt	3900
tcaagccctt	ggatgtaggg	taaagaaaga	gagatcagac	tgctactgtg	tctatgtaga	3960
aggggaagac	ataagagact	ccattttgaa	aaagacctgt	agtttaaca	attgctttgc	4020
tgagatgttg	ttcatttggt	gccttgccctc	atccactttg	ccccagcccc	tttgacccaa	4080
cttgagctc	acaaaaacct	gtgttgata	aaatcgaggt	ttaggggatc	tagggctgtg	4140
caggatgtgc	tttgtaacc	aaatgtttac	aagcagtata	cttggtaaaa	gtcattgcca	4200
ttctctagtt	tcaataaacc	aggggacta	tgcaccgtgg	aaagccgag	cgacctctac	4260
ccttgaaagc	agggatttgt	ccaaggtttc	tccccatgtg	atagtctgaa	atatggcctc	4320
gtgggatgag	aaagacctga	ccatccccca	gcccccccc	cgtaaagggt	ctgtgctgag	4380

sequence listing divisional 1.ST25

gtggattact caaagaggaa agcctcttgc agttgagaga gaggaaggcc gctgtttcct 4440
gcctgcccct gggaactgaa tgtctcgga taaaacacga ttgtacattt gttcaattct 4500
gagatgagag aaaaaccacc ctatggtgag aggcgagaca tgtttacagc aatgctgcct 4560
tgttattctt tactccactg agatgtttgg gtggagagaa acataaatct ggcttacgta 4620
cacatccagt catagtacct ttccttgaac ttccttatga agtagattct atttctcaca 4680
tgttcgttgc tgaccttctc cttattatca ccctgtgctc ctactacatt cctttttgct 4740
aaaataataa aaataatagt caataaaaac taagggaact cagaggcctg tgccggtgca 4800
ggtcctttgt atgctgagcg ccggtcccct aggcccactg ttgttt 4846

<210> 8
<211> 485
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
gaaggaaaga tgaacttgag tttcacttct tagtgccttt tctcagggga gaggccatca 60
cttgaagatg ctgagtcttc tgctccttct cctgggacta ggctctgtgt tcagtgtgt 120
catctctcaa aagccaagca gggatatctg tcaacgtgga acctccctga cgatccagtg 180
tcaagtcgat agccaagtca ccatgatgtt ctggtaccgt cagcaacctg gacagagcct 240
gacactgatc gcaactgcaa atcagggctc tgaggccaca tatgagagtg gatttgtcat 300
tgacaagttt cccatcagcc gcccaaacct aacattctca actctgactg tgagcaacat 360
gagccctgaa gacagcagca tatactctctg cagcgttgaa gatagggaca gagtctacaa 420
tgagcagttc ttcggggccag ggacacggct caccgtgcta gaggacctga aaaacgtgtt 480
cccac 485

<210> 9
<211> 5184
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 9
gctttacact cgcgagcggga ccgccacacg ggtccgggtgc ccgctgcgct tccgccccag 60
cgctcctgag gcggccgtac aatcctcggc agtgtcctga gactgtatgg tcagctcagc 120
ccggcctccg actccttccg acteccagca ttcgagccac tttttttttt cttgaaaac 180
tcagaaaagt gactcctttt ccagggaaaa aggaacttgg gttcccttct ctccgtcctc 240
ttttcgggtc tgacagcctc caccactcc tccccggac cccgcctccg cgcgcaggtt 300
cctcccagtc acctttctcc acccccgcc ccgcacctag cccgcccgcg gccaccttcc 360
acctgactgc gcggggcgct cgggacctgc gcgcacctcg gaccttcacc acccgcccgg 420
gccgcgggga gcggacgagg gccacagccc cccacccgcc agggagccca ggtgctcggc 480
gtctgaacgt ctcaaagggc cacagcgaca atgacagctg acaaggagaa gaaaaggagt 540
agctcggaga ggaggaagga gaagtcccgg gatgctgcgc ggtgccggcg gagcaaggag 600

sequence listing divisional 1.ST25

acggaggtgt tctatgagct ggcccatgag ctgcctctgc cccacagtgt gagctcccat	660
ctggacaagg cctccatcat gcgactggca atcagcttcc tgcgaacaca caagctcctc	720
tcctcagttt gctctgaaaa cgagtccgaa gccgaagctg accagcagat ggacaacttg	780
tacctgaaag ccttggaggg ttccattgcc gtggtgacct aagatggcga catgatcttt	840
ctgtcagaaa acatcagcaa gtccatggga cttacacagg tggagctaac aggacatagt	900
atctttgact tcaactcatcc ctgcgacct gaggagattc gtgagaacct gagtctcaa	960
aatggctctg gttttgggaa aaaaagcaaa gacatgtcca cagagcggga cttcttcatg	1020
aggatgaagt gcacggtcac caacagaggc cgtactgtca acctcaagtc agccacctgg	1080
aaggtcttgc actgcacggg ccaggtgaaa gtctacaaca actgccctcc tcacaatagt	1140
ctgtgtggct acaaggagcc cctgctgtcc tgcctcatca tcatgtgtga accaatccag	1200
cacccatccc acatggacat cccctggat agcaagacct tcctgagccg ccacagcatg	1260
gacatgaagt tcacctactg tgatgacaga atcacagaac tgattggta ccacctgag	1320
gagctgcttg gccgctcagc ctatgaattc taccatgcgc tagactccga gaacatgacc	1380
aagagtcacc agaacttgtg caccaagggt caggtagtaa gtggccagta ccggatgctc	1440
gcaaagcatg ggggctacgt gtggctggag acccagggga cggatcatca caaccctcgc	1500
aacctgcagc cccagtgcac catgtgtgtc aactacgtcc tgagtgagat tgagaagaat	1560
gacgtgggtg tctccatgga ccagactgaa tcctgttca agccccacct gatggccatg	1620
aacagcatct ttgatagcag tggcaagggg gctgtgtctg agaagagtaa ctctctatc	1680
accaagctaa aggaggagcc cgaggagctg gccagctgg ctcccacccc aggagacgcc	1740
atcatctctc tggatttcgg gaatcagaac ttcgaggagt cctcagccta tggcaaggcc	1800
atcctgcccc cgagccagcc atgggccacg gagttgagga gccacagcac ccagagcgag	1860
gctgggagcc tgctgcctt caccgtgcc caggcagctg ccccgggcag caccaccccc	1920
agtgccacca gcagcagcag cagctgtctc acgccaata gccctgaaga ctattacaca	1980
tctttggata acgacctgaa gattgaagtg attgagaagc tcttcgccat ggacacagag	2040
gccaaaggacc aatgcagtac ccagacggat ttcaatgagc tggacttgga gacactggca	2100
ccctatatcc ccatggacgg ggaagacttc cagctaagcc ccatctgccc cgaggagcgg	2160
ctcttggcgg agaaccaca gtccaccccc cagcactgct tcagtgccat gacaaacatc	2220
ttccagccac tggeccctgt agccccgcac agtcccttcc tcctggacaa gtttcagcag	2280
cagctggaga gcaagaagac agagcccag caccggcca tgtcctccat cttctttgat	2340
gccggaagca aagcatccct gccaccgtgc tgtggccagg ccagcacccc tctctcttcc	2400
atggggggca gatccaatac ccagtggccc ccagatccac cattacattt tgggccaca	2460
aagtgggccc tcggggatca gcgcacagag ttcttgggag cagcgcctt ggggccccct	2520
gtctctccac cccatgtctc caccttcaag acaaggctctg caaagggttt tggggctcga	2580
ggcccagacg tgctgagtc ggccatggta gccctctcca acaagctgaa gctgaagcga	2640

sequence listing divisional 1.ST25

cagctggagt atgaagagca agccttccag gacctgagcg ggggggaccc acctggtggc 2700
agcacctcac atttgatgtg gaaacggatg aagaacctca ggggtgggag ctgccctttg 2760
atgccggaca agccactgag cgcaaagtga cccaatgata agttcaccca aaaccccatg 2820
aggggcctgg gccatcccct gagacatctg ccgctgccac agcctccatc tgccatcagt 2880
cccggggaga acagcaagag caggttcccc ccacagtgtc acgccaccca gtaccaggac 2940
tacagcctgt cgtcagccca caaggtgtca ggcattggcaa gccggctgct cgggccctca 3000
tttgagtctt acctgctgcc cgaactgacc agatatgact gtgaggtgaa cgtgccctgt 3060
ctgggaagct ccacgctctt gcaaggaggg gacctcctca gagccctgga ccaggccacc 3120
tgagccaggc cttctacctg ggcagcacct ctgccgacgc cgtcccacca gcttactctt 3180
ctccgtctgt ttttgcaact aggtatttct aacgccagca cactatttac aagatggact 3240
tacctggcag acttgcccag gtcaccaagc agtggccttt ttctgagatg ctcaactttat 3300
tatccctatt tttaaagtac acaattgttt tacctgttct gaaatgttct taaattttgt 3360
aggatttttt tctccccac cttcaatgac ttctaattta tattatccat aggtttctct 3420
ccctccttct cttctcaca cacaactgtc catactaaca agtttggtgc atgtctgttc 3480
ttctgtaggg agaagcttta gcttcatttt actaaaaaga ttctctgta ttgttggtgc 3540
caaagagaaa caaaaatgat tttgctttcc aagcttggtt tgtggcgtct ccctcgcaga 3600
gcccttctcg tttctttttt aaactaatca ccatattgta aatttcaggg ttttttttt 3660
tttgtttaag ctgactcttt gctctaattt tggaaaaaaa gaaatgtgaa gggtaactc 3720
caacgtatgt gggtatctgt gaaagttgca cagcgtggct tttcctaac tgggtgtttt 3780
ccccgcatt tgggtgattt ttattatta ttcaaaaaca taactgagtt ttttaaaga 3840
ggagaaaatt tatactctggg ttaagtgttt atcatatata tgggtacttt gtaatatcta 3900
aaaacttaga aacggaaatg gaatcctgct cacaaaatca ctttaagatc ttttcgaagc 3960
tgtaatttt tcttagtggt gtggacactg cagactgtc cagtgtccc acggcctgta 4020
cggacactgt ggaaggcctc cctctgtcgg ctttttgcca tctgtgatat gccataggtg 4080
tgacaatccg agcagtggag tcattcagcg ggagcactgc gcgctatccc ctacattct 4140
ctatgtacta tgtatgtatg tattattatt attgctgcca agagggctctg atggcacggt 4200
gtggggctcg ggggtggggc ggggaagtgc tctaactttt ctttaaggttt tgttgctagc 4260
ccttcaagtg cactgagcta tgtgactcgg atggtctttc acacggcaca tttggacatt 4320
tccagaacta ccatgagatg gtttagacgg gaattcatgc aaatgagggg tcaaaaatgg 4380
tatagtgacc ccgtccacgt cctccaagct cacgaccttg gagccccgtg gagctggact 4440
gaggaggagg ctgcacagcg ggagagcagc tgggtccagac cagccctgca gccccactc 4500
agccggcagc cagatggccc cgcaaggcct ccagggatgg ccctagcca caggccctgg 4560
ctgaggtctc tgggtcggtc agtgacatgt aggtaggaag cactgaaaat agtgttccca 4620
gagcactttg caactccctg ggtaagaggg acgacacctc tggtttttca ataccaatta 4680

sequence listing divisional 1.ST25

tggtgactgg agtgccttca accaagcccc atcaggccct gttgcttcca gtggcgagtt	1380
ctttggcagt gcctcacagc cagcggtaga acttgttagt ggctcacaat cagctctagg	1440
cccacctcct gctgcctcaa attcttcaga cctgtttgat cttatgggct cgtcccaggc	1500
aacctgaca tcttcccaga gtatgaattt ctctatgatg agcactaaca ctgtgggact	1560
tggtttgctt atgtcaagat cacagaatac agatatggtc cagaaatcag tcagcaaaac	1620
cttgccctct acttggctctg accccagtgt aaacatcagc ctagacaact tactacctgg	1680
tatgcagcct tccaaacccc agcagccatc actgaataca atgattcagc aacagaatat	1740
gcagcagcct atgaatgtga tgactcaaag ttttggagct gtgaacctca gttctccatc	1800
gaacatgctt cctgtccggc cccaaactaa tgctttgata gggggaccca tgcctatgag	1860
catgcccaat gtgatgactg gcaccatggg aatggcccct cttggaaata ctccgatgat	1920
gaaccagagc atgatgggca tgaacatgaa catagggatg tccgctgctg ggatgggctt	1980
gacaggcaca atgggaatgg gcatgcccaa catagccatg acttctggaa ctgtgcaacc	2040
caagcaagat gcctttgcaa atttcgccaa ttttagcaaa taagagattg taaaagaagc	2100
agattgaatg aagaattttt agctgtgcag ataggatgat ttgggatgga aaatgcta	2160
caactaccct ttcttttatc aagtaattaa aataaatcta cataaagaac caaaaaggct	2220
gttttataaa agtgaaatat ccagtatttc agagggccag gcaagagcac ttcagatgag	2280
gcagtcaaaa tcattttttt ccagtgagga tagaccacaa gtgggtggtg agaccattga	2340
aagcctttat caactgaaga gtccatttaa cagcataatt tgtgggaaga ctggaatagg	2400
gctgaataaa tgtgtttgaa tctctaattt tatactttct tttctgagg aacttgattt	2460
ttctgtccct ggatcgcctt gtcataattg ggtctgttcc ttttactacc actcttgagt	2520
ccatatatga aatcattaaa gttggatgat cagtttttta taaaaatata tatttttgtc	2580
caagaaaaaa aaaagcatac atatgtgatt atggctaaat caaaggtaac tggaatgtat	2640
atacttttgc taatgttcca gcaacactgc tattatacta tccaaatttt tattgtaaca	2700
aaacctcttt aagcaattgg tgattgcat gggacttttc ccatgtcttc tgctgtaatt	2760
atcctgtgca gaactaggaa gaaatttttt tcaggactgc tctatggttt cctttaaaag	2820
aaaaaaactt ctgtttgttt ttagcagtca ttatttaca tttgcagtga ttaacttggc	2880
aaggcttctt tccgtgttta tccctgtagc catcatttaa gtcaggaaca gtcagaaaaa	2940
tatttatttt atttttttt tgggtgtctg caaaggtaaa aatccattaa aaccttaagt	3000
taaatataaa tgttacaact caatgtttgc ttttagattt tatacagtat ttgttttgtt	3060
ttggttttga gtgtatataa tgcagcatta gcaatatggt tccaatagag gagttaaata	3120
tatattgtta aaggagacct gtagcagtca aagattttat tgatttaatg acaaaggaaa	3180
ttaatgaaaa tgtttttgtt tttctgctgt aattctgcat taagctcaca tgaaaatcat	3240
gattctagag tttggaatgc aaaattaatt gttttaccct caagctggga atatttttca	3300
aaataaatac tataatatag atatcaaatt attacctccc catgttatgt tgaaaatttt	3360

sequence listing divisional 1.ST25

tttattaat tgataaaact ttatttccat tatattcata atgttctgtt atacataaca 3420
 ttaaaatggt cattaaaatc aatgttgaac tgcttttct ttcgttctgt tagacatttg 3480
 agaccatttg gggaaaaaat aattatagtt tgggcaaagt aatttttata aataatttaa 3540
 aattatttaa tgacttctct attctttcct atcagactct actgttagga attaaaaatg 3600
 aagcagcaaa gatatcctga cctgctccat tcttgcta atgttccatca caacatttct 3660
 aattaggcag aaattcatgt acttcagcta agtggtaatg aaaagtgatt catttgctga 3720
 ataagagatg agagtgagtg taattagctg actgcggttt ttaatctttc aacaattcaa 3780
 tgtgtttaac ttagtttcaa agaataggag ctttcaagtg ttgttacttc agagcaatca 3840
 agccagcctc tgggtggccgc atagtagaat atggtcctg atatttataaa ccgatcatct 3900
 taagtaaatt ttttctttaa gaagtatatc ttcactttct caaatatgta tggttcttag 3960
 acgaagtaaa tgtttatctg aaccttaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 4007

<210> 11
 <211> 3066
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 ttctttttat gcgaacacaa gtatatgagg ggttgtgtaa aaattatatt tctcttgctg 60
 tactacaaag agatagaatc aaactgcttt ttttcgacat actgggtttt ctttctgttt 120
 ttcttctctt tcttctattt cttgtggata ttatggctaa taacacaaca agtttaggga 180
 gtccatggcc agaaaacttt tgggaggacc ttatcatgtc cttcactgta tccatggcaa 240
 tcgggctggt acttggagga tttatttggg ctgtgttcat ttgtctgtct cgaagaagaa 300
 gagccagtgc tcccatctca cagtggagtt caagcaggag atctaggtct tcttacaccc 360
 acggcctcaa cagaactgga ttttaccgcc acagtggctg tgaacgtcga agcaacctca 420
 gcctggccag tctcaccttc cagcgacaag cttccctgga acaagcaa at tctttccaa 480
 gaaaatcaag tttcagagct tctactttcc atccctttct gcaatgtcca ccacttctg 540
 tggaaactga gagtcagctg gtgactctcc cttcttccaa tatctctccc accatcagca 600
 cttcccacag tctgagccgt cctgactact ggtccagtaa cagtcttcca gtgggccttt 660
 caacaccgcc cccacctgcc tatgagtcca tcatcaaggc attcccagat tcttgagtag 720
 ggtggctttt ggtttttgtt tctttcttgt cttgtctttt attgaaagga aatcaaaaat 780
 aggctaaaca gaattttgag ggcattggccc aaataactca tgagttccaa gttgaaacat 840
 ggttgtgcaa gttggacatt acaatgtaaa acacattttc ttcaaacacg ttttcccttt 900
 tgtttcaaaa aatgtaatat tttcccccaa gcgttttata tttatgtatt ttgtattcaa 960
 tgtgaggctt attaaaaata gtgattctaa tgtaagaatc agctaagatg cattatatat 1020
 attttaatta aaattaaaac ttcagatatt tgtggattac aatcctcatt tacttccaat 1080
 gtgactaaaa agagaaaaaa aatcactgtg tcaactttaa gaaaaatctt ctaagggatt 1140

sequence listing divisional 1.ST25

tggattttac tttctttaga atgacaagtg aatcatattg acattttaca atcttagatt	1200
tttctttttt tttcttttga gacagggctt tgatccgtcg cccaggcggg agttgcagta	1260
gcatgatcag gactcactgc agcctctatc tcccaggctc aagtaatcct cccatcttag	1320
tgccccaagt agctgggact acaggggtgc actaccacac cgggttgaat ttttttttaa	1380
tttttagtaga gatgaagtgt cactatgtta ccaaggctgg tctcaaactc ctaaactcag	1440
atgatcctcc tgcctcggcc tcccaaagtg ctggaattag cctggccaat cttggatttt	1500
taatggaata tgtgggcaca aatgacaga acataggaca ttctaaagt ctttgatttg	1560
atcattataa gaagtgtggg actcaagcac aggaaactga actcttttgg tgtcattgga	1620
tgtttcattt ttgacactaa ttttttctgg acaaactctt tatgtgtttt tccaagaat	1680
agttatctac ttcttgaggg caaaatcctt ggatttacta acatgatgat ttaccttttc	1740
ttcaccgttg tctgttacatt gttagaaaag caacaggaaa aaatccaatt catttgacct	1800
aaaaacaagc ctcaagttta aaaccaagct cacgtttttc ttaagggaaa aattttcttt	1860
cttaaactta catctagcaa cttggaaagc actttctctg gggatcttct tttgtaactt	1920
tgcagacaaa taagtatgag tctactgggga gagagtttgt tattgaaata gatgttgccc	1980
atgaagaatt ctccttctctg gattgactct taatcatcag gcatcattcc tggtttgctt	2040
ctctacgaat ctcaattcca acttctctgc agagtctgta cagtgattaa gccatgccag	2100
atggtctttg gtgcacacag ttatttaaga atccacttcc acaggtggct gcccttgtaa	2160
ggaagaatgc atccctaaat gtggccacca gagagttcca gtgggcagat gtctgtggct	2220
gcccttctca tttaaggaca tgagttcact ggagtattac tcaaaaagtc tgtggttcat	2280
ttccagtatt gtgaatattt agtttatgtg gccgtttctt tgtttctttg aacagtggga	2340
ttttcagtga aaaagtacc cttttttcat ttctattgc agtggtcaca gctaatagtg	2400
tctgaacatg gttcaagaat aagagattcc atgtagcatt ttctttatta ttttcatttc	2460
ccttatatta tccatcattc cttaaggaca attattctta ataatgctta tagaaaatgt	2520
tctctaatta aacatgcca aaggaaaaag taagagaaaag agggagcaag aagaaaatgg	2580
aagaaaaagg gaaaaaagct aaccggataa ccaatttggt ataagttggt tttcaacaaa	2640
gaaatttagc agccaagtaa ggtttcaagg gaatattaac ttggtatcag ggctactttt	2700
ttttttttt ttttacttgc atgtcatcct taatgtctaa catgaaaaat cagcaagag	2760
tatggttttt atcaagaatt tgtgttggga gtaaaaactg ctttatagct cccaaattag	2820
gaagagaaga gcagaaatcc tctggggcat ttaaccatct ggcagaattg ttgctgcacc	2880
cttatcccag ttataagaca gtcaaaatga ctatttccta aatattgtga gtgtatgaaa	2940
tgtgaaatta aagcaaaaac tggagacttt taatgtattt cttaatttg aaatgttttg	3000
tggattgtga aataaaaaata aatttatgtc aagttttatt caaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3060
aaaaaa	3066

sequence listing divisional 1.ST25

<211> 1089
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12

```

gaggagcctg aggaagaggg cggcgacggt ggtggtgact gagcggagcc cggtgacagg      60
atgttggtgt tggattagg agatctgcac atccacacc ggtgcaacag tttgccagct      120
aaattcaaaa aactcctggt gccaggaaaa attcagcaca ttctctgcac aggaaacctt      180
tgcaccaaag agagttatga ctatctcaag actctggctg gtgatgttca tattgtgaga      240
ggagacttcg atgagaatct gaattatcca gaacagaaag ttgtgactgt tggacagttc      300
aaaattggtc tgatccatgg acatcaagtt attccatggg gagatatggc cagcttagcc      360
ctgttgcaga ggcaatttga tgtggacatt cttatctcgg gacacacaca caaatttgaa      420
gcatttgagc atgaaaataa attctacatt aatccagggt ctgccactgg ggcataataat      480
gccttgghaaa caaacattat tccatcattt gtgttgatgg atatccaggc ttctacagtg      540
gtcacctatg tgtatcagct aattggagat gatgtgaaag tagaacgaat cgaatacaaaa      600
aaaccttaaa gccaggcctg tcttgatgat ttttggtttt ttttcattgt cctgttgaaa      660
tcaagtaatt aacatttaa gagccacaaa attgtatcac tttataata ttttgagta      720
aaatataata ccatcttctc tgtaataaca taattgctcc aagcttctg taaactataa      780
gaatatatatt agtttacagt atatggattc tatgaaaaaa tgtccacaac acagtaattg      840
gtcacttggt aagaaaaatt tacccttgta agtatcttca aagttgatat ttggaacttt      900
attccaaaag tagtgcattg ggagaaagaa tctagacttt cttgtataca tttttctctt      960
ctccagtaat aaacaattac ctttcattta tactttgata acctgtatth aatttaaaaa     1020
aaaacataaa aatgaggaac caagtgaac tacggatata aatattaag tggacgagat     1080
gacctttca                                     1089
  
```

<210> 13
 <211> 2558
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13

```

gggcctggag cttcctccgc ggggccccca ggcccgaggg ccgggctgct gatccgccag      60
gcacggtgta aagaatatcc agctggtggc tacagttccc cctctggttt tgctgccatg     120
catcctgggc gaactactgg taaagggccc tctactcaca ctgagattga ccagcaacct      180
ccacggcttc tcatttgca cattgctcta ccgtcctggg ctgacatctg caccaacctc      240
tgtgaggctc tgcagaactt cttctctcta gcctgcagct tgatgggccc cagccgcatg      300
tccctgttca gtttatacat ggtacaagat cagcatgagt gcatcctccc ttttggtgaa      360
gtgaaagggg actttgctag gttgcagacc tgcattctag aactccgcat gttacagaga      420
gaaggggtgt tcagatcaca aggtgcttct ctgaggctgg cagtagagga tgggctccag      480
caattcaaac aatacagcag acatgtgacc acaagggcag ctctgacctt tacctcctg      540
  
```

sequence listing divisional 1.ST25

```

gagattacta ttctgacttc tcagcctgga aaagaggtgg tcaaacagtt ggaggaaggg      600
ttgaaagata cagacctagc cagagtcagg aggtttcagg tcgttgaggt cacaaagga      660
atcctagagc acgtggactc agcgtctcct gttgaggata ccagcaatga tgagagttct      720
attctgggaa ctgacattga ccttcagact atagacaatg atatcgtcag catggagatt      780
ttcttcaaag cctggctaca taacagtgga acagaccaag aacaaatcca tcttcttctt      840
tcttcacagt gtttcagcaa catttccaga cccagagata atccaatgtg tctgaaatgt      900
gatctccaag agcgactgct ctgcccattc ctactcgtcg gcacagctga cggctccttg      960
agaatggatg accctaaagg agacttcatc aactctacc agatggcttc ccagtcatcg     1020
gcctctcatt acaagctcca agtgatcaag gctttaaagt ctagcgggct ctgagagtca     1080
ttgacatatg gactcccgtt catcctcaga cctacaagct gttggcagct ggactgggat     1140
gagctggaga caaatcagca acatttccat gctttgtgtc acagcctgct gaaaagggaa     1200
tggctgctgt tagccaaggg ggaaccaccg ggcccaggac acagccagag aattcctgcc     1260
agcaccttct atgtgatcat gccgtcacac tccctcacac tgctggtaaa ggcgggtggcc     1320
acgcgggaac tgatgctgcc cagcaccttc cccctgctac ctgaggacct acatgatgat     1380
agccttaaga atgtggagag catgctggac agcctggagc tggagccac ctacaacccc     1440
ttgcatgttc aaagccacct gtactcacac ctgagcagca tctatgcaa gcctcagggg     1500
cggctccacc cacactggga gagccgagct ccgagaaagc atccctgcaa gactgggcag     1560
ttgcagacca accgagctcg agctactgtg gccccctgc ctatgactcc tgtcccaggc     1620
agagcctcca agatgccagc agccagcaaa tcttctcag atgccttctt cctgccttca     1680
gagtgggaga aggatccctc aaggecctaa gtcaccagca ccagagccca gctgccagc     1740
ttaaccatat ccatgctcag gttcacataa tggctatctg tggtcagact tgctctctat     1800
ccgcctgagc ctctgtgagt gagggctgac tgggaaaca cagccttctt gtctgtttc     1860
agtgtgtcc cactcctcaa gtctggaagc gacacaccg agcctgtcct ttctccagca     1920
aggacttca ttttctttag aatcatttgc tactgtttac acaggtgaag attaaacacc     1980
cagtaagctt ctaccattgt taggagcatt cataactcag aatttcttct tgtagctctg     2040
tgtaagcagg tggatgaggt cagatcacct ttggtaaact ggacctcagg aacaaggatg     2100
aggttttgaa agctcataaa agacaagtaa gattgaaatc caagcctcat ttcagagcct     2160
gtgcccttcc cactacacca ccaggcttca gcctccaaag agacaagtgc ttggtacctta     2220
catgcaaagt gtgtgtgctg gggggtggga gggctgcca gaacagggga gaggatggtg     2280
taaaaaaaga cctactcctt tctgttacc ctctccccac atgtaccaac cttcctgttg     2340
ctccctccat ccacagaata atagctacca tttataaat gtttactctg ggctgggagc     2400
agtggctcac acctgtaatc ccaacacttt gagaggctga ggtgggatga tcaactgagg     2460
ccaggagttc gagaccagcc tgagcaacac tgtgagacct ccccgccatc tctacataaa     2520
taataaaaac ttttaaaaaa acaaaaaaaa aaaaaaaa                                2558

```


sequence listing divisional 1.ST25