

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-578**
(22) Přihlášeno: **14.02.2011**
(40) Zveřejněno: **22.08.2012**
(Věstník č. 34/2012)
(47) Uděleno: **19.07.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **29.08.2012**
(Věstník č. 35/2012)

(11) Číslo dokumentu:

303 405

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

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

(56) Relevantní dokumenty:

WO 2005/108987; WO 2005/103720.

Healy a kol. Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. *Circulation*, 2006, 113: 2278-2284.; Nepomuceno-Chamorro a kol. Prognostic transcriptional association networks: a new supervised approach based on regression trees. *Bioinformatics*, 2011, 27(2): 252-258.; Calverley a kol. Platelet gene expression as a biomarker risk stratification tool in acute myocardial infarction: A pilot investigation. *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, 2010, 3: 9-15.; Stanton a kol. Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction. *Circulation Research*, 2000, 86: 939-945.; VanBuren a kol. Blood gene expression signatures associate with heart failure outcomes. *Physiological Genomics*, 2011, 43(8): 392-397, publikováno online leden 2011..

(73) Majitel patentů:

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 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 kardiiovaskulárních 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 LOC130951. 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 303405 B6

Způsob identifikace osob se zvýšeným genetickým rizikem výskytu infarktu myokardu

Oblast techniky

5 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

15 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, katetizační 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.

20 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, Hiroschi 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 stadií 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, Saschwati Roy, and Chandan K. Sen. Microarray analysis of gene expression: considerations in data mining and statistical treatment. *Physiological Genomics*, 25(3):355 až 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 stadiu onemocnění (multivariánní 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 až 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).

50 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*,

55

- 150(3):488 až 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 až 307, May 2005;
- 5 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 až 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 až 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 až 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 až 50, October 2008).
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 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 znám. 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 Patsilidakos, 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 až 18, 2009).
- 40
- 45
- 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 (Aiiyan K. Houg, Rachel A. McNamee, Attila Kerner, Pallavi Sharma, Almois Mohamed, 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 až 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 až 455, February 2003), které podporují aktivaci cirkulujících mononukleárů u pacientů s akutním koronárním syndromem (AKS).
- 50
- 55
- 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 kompenzačním 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 de 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 až 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 až 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 až 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., König 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 Gasiór, Rafał 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 až 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. Gainsburg, and Pascal J. Goldschmidt-Clermont. Gene Expression Analysis of Cardiovascular Diseases: Novel Insights Into Biology and Clinical Applications. *J. Am. Coll Cardiol*, 48(2):227 až 235, July 2006; David Seo, Tao Wang, Holly Dressman, Edward E. Herderick, Edwin S. Iversen, Chunming Dong, Korkut Vata, Carmelo A. Milano, Fabio Rigat, Jennifer Pittman, Joseph R. Nevins, Mike West, and Pascal J. Goldschmidt-Clermont. Gene Expression Phenotypes of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(10):1922 až 1927, October 2004) se zabývá genetickými asociačními studiemi ve vztahu k infarktu myokardu (Iris M. Heid, Eva Boes, Martina Müller, Barbara Kollerits, Claudia Lamina, Stefan Coassin, Christian Gieger, Angela Döring, Norman Klopp, Ruth Frikke-Schmidt, Anne Tybjaerg-Hansen, Anita Brandstätter, Andreas Luchner, Thomas Meitinger, Wichmann, and Florian Kronenberg. Genome-Wide Association Analysis of High-Density Lipoprotein Cholesterol in the Population-Based KORA Study Sheds New Light on Intergenic Regions / CLINICAL PERSPECTIVE. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 1(1):10 až 20, October 2008; Gudbjartsson D. F., Bjornsdottir 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. statickým 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 myo-

kardu a jeho porovnáním s vybranými osobami kontrolního souboru české populace, se otevírá do budoucna reálná možnost průběžného, ekonomicky dostupného sledování osob přežívajících infarkt myokardu (období do 3–6 měsíců po první a další události).

- 5 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 až 1599, April 2007). Tyto snahy jsou zřejmé 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 až 908, June 2009; Józefa Dabek, Aleksander Owczarek, Zbigniew Gasiór, Rafał 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 až 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 až 240, August 2009), dosud však není známa studie snažící se predikovat prognózu pacienta s AIM.
- 15
- 25 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, Whittmore 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 až 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 až 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 transcriptions 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 až 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 až 699, October 2010).
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 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 až 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 kardio-
 5 vaskulárních 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 identifikované
 10 ho 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.
 15 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
 25 expresní analýzy. Tato technologie umožňuje získávat informace o okamžité odpovědi organismu na akutní stadia 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
 30 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 stadia 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
 35 Tontonoz. Genome-Wide Association Studies Identify New Targets in Cardiovascular Disease. *Science Translational Medicine*, 2(48):48 až 94, 2010; Rong Yang, Lin Li, Sara Bretschger B. Seidemann, Gong-Qing Q. Shen, Sonia Sharma, Shaoqi Rao, Kalil G. Abdullah, Kenneth G. Mackinlav, 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 až 1451, June 2010),
 40 nebo práce snažící se predikovat významné geny exprimující se v akutním stadiu mrtvice (Boryana Stamova, Huichum Xu, Glen Jickling, Cheryl Bushnell, Yingfang Tian, Bradley P. Ander, Xinhua Zhan, DaZhi Liu, Renee Turner, Peter Adamczyk, Jane C. Khoury, Arthur Pancioli, Edward Jauch, Joseph P. Broderick, and Frank R. Sharp. Gene Expression Profiling of Blood for the Prediction of Ischemic Stroke. *Stroke*, 41(10):2171 až 2177, October 2010).

Několik prací se v roce 2010 zabývalo hledáním genetických příčin či nejrůznějších nových biomarkerů ventrikulární fibrilace, která bývá pozorována v akutním stadiu infarktu myokardu
 50 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. Bindrabam, 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.
 55

Nature genetics, 42(8):688 až 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-1 α expression in post-myocardial infarction left ventricular remodeling. *Circulation research*, 106(3):601 až 610, February 2010; Yvan Devaux, Francisco Azuaje, Mélanie Bausort, 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 až 337, August 2010).

Do popředí zájmu se v posledním roce dostává i otázka, zda celkový stres organismu při akutní fázi infarktu myokardu nehoršuje 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 až 473, June 2010) či atherotrombózou (Luca Andrea A. Lotta. Genome-wide association studies in atherothrombosis. *European journal of internal medicine*, 21(2):74 až 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 až 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 až 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 až 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 až 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 Hong, 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 až 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. Anging-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 až 2766, July 2010; Lars Bochmann, Padmini Sarathchandra, Federica Mori, Enrique Lara-Pezzi, Domenico Lazzaro, and Nadia Rosenthal. Revealing new mouse epicardial cell markers through transcriptomics. *PLoS one*, 5(6), 2010). Přihláška vynálezu PV 2009-872 navrhuje stanovení prognózy pacientů v akutním stadiu primárního infarktu myokardu stanovením exprese alespoň jednoho genu či genetického lokusu vybraného ze skupiny zahrnující TCRA, LOC650751, LOC650761, PRR6 a TMEM98 ve vzorku periferní krve.

Níže 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 se zvýšeným 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 sledova-

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

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

10 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.

15 Exprese 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.

25 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.

30 Předkládaný vynález přináší 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 se zvýšeným rizikem úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací v krátkodobém horizontu po výskytu akutního infarktu myokardu umožní efektivní využití lůžkových kapacit.

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

Přehled obrázků na výkresech

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

45 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

50 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 LOC645694
 SEQ ID No. 8: sekvence DNA kódující RefSeq_ID M97723
 5 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

10

Příklady provedení vynálezu

15 **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.

20

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 smíchan s *RNAlater*[®] *Tissue Collectin: RNA Stabilization Solution* (7,6 ml). Vzorek byl řádně promíchán a poté přesunut do mrazicího boxu -70 °C k dlouhodobému skladování.

25

Izolace RNA pomocí kitu *RiboPure*[™] – *Blood*, Ambion Inc. (kat. č. AM1928, Ambion, Applied Biosystems) byla prováděna tak, že vzorky byly vyndány z mrazicího boxu a ponechány na ledu rozmrazit. Snažili jsme se vždy šestice vzorků jdoucí na jeden čip připravovat najednou. Pro izolaci RNA bylo pipetováno 1,8 ml vzorku krve s *RNAlater*[®] do 2ml zkumavky bez RNase. Vzorek 30 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, 35 které bylo kolem 1,2 ml, byla přenesena do nové 2ml 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.

40

700 µl vzorku bylo přeneseno na dodanou kolonku umístěnou v kolekční zkumavce a 5 až 10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a z novu do nich byly nasazeny kolonky. Do kolonek bylo nanášeno dalších 700 µl a poté zbytek vzorku a vždy 5 až 10 s centrifugováno na 16 100 g. Na filtry kolonek bylo nanášeno 700 µl promývacího roztoku 1 a 5 až 10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a znovu do nich 45 byly vsazeny kolonky. Do kolonek bylo 2x nanášeno 700 µl promývacího roztoku 2/3 (láhev musí být doplněna o 56 ml 100% etanolu) a 5 až 10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a znovu do nich byly vsazeny kolonky, centrifugovány, aby byla odstraněna veškerá kapalina. Kolonky byly přeneseny na označenou kolekční zkumavku a nanášeno 50 µl elučního roztoku (předehřátého na 75 °C). 20 s ponecháno stát při laboratorní teplotě a 20 až 30 s centrifugováno na maximum. Při druhé eluci dalšími 50 µl elučního roztoku centri- 50 fugováno 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 16 000 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*[™] Kitu firmy Ambion (kat. č. AM1980, Applied Biosystems):

K cca 110 μ l vzorku RNA izolované pomocí *RiboPure*[™] *Blood Kit*, Ambion z plné krve s *RNAlater*[®] bylo přidáno 11 μ l octanu sodného (*RiboPure*[™]), 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 hod 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 stojánku na dobu 3 až 5 minut (dokud není roztok průsvitný). Supernatant byl opatrně odstraněn a přidáno 6 x 30 μ l (180 μ l) pufru pro streptavidinové kuličky předeřátého na 50 °C, řádně vortexováno a ponecháno inkubovat po dobu nejméně 15 min při 50 °C před dalším použitím. Ke vzorkům RNA ve 14 μ l (1 až 10 μ g) byl přidán 1 μ l *Capture Oligo Mix*. Ke směsi bylo přidáno 15 μ l 2x hybridizačního pufru předeřátého na 50 °C. Vzorky byly krátce vortexovány a rychle centrifugovány při max. 1000 g a ponechány inkubovat při 50 °C po dobu 15 minut (dojde k hybridizaci s globinovou mRNA).

Připravené streptavidinové magnetické kuličky umístěné v inkubátoru byly jemně vortexovány a centrifugovány méně než 2 s na max. 1000 g. Ke každému vzorku RNA bylo přidáno 30 μ l připravených streptavidinových magnetických kuliček, směsi řádně promíchány vortexováním, stočeny cca 2 s na 1000 g a ponechány inkubovat 30 min při teplotě 50 °C. Po vyjmutí z inkubátoru jemně vortexovány, centrifugovány cca 2 s na max. 1000 g a zkumavky umístěny do magne-

tického stojánku na 3 až 5 min (dokud není roztok průsvitný). Supernatanty obsahující celkovou RNA bez globinové mRNA opatrně odstraněny a přeneseny do čistých 1,5ml zkumavek.

5 Byl předehřát eluční pufr na 58 °C. Ke každému RNA vzorku bylo přidáno 100 µl RNA vazebného pufru. Kuličky resuspendující směs řádně homogenizována vortexováním a následně přidáno 20 µl 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 stojánku na 3 až 5 minut (dokud není roztok průsvitný). Opatrně byly odstraněny veškeré supernatanty. Zkumavky byly vyjmuty z magnetického stojánku. Až poté bylo ke každému vzorku přidáno 10 200 µl RNA promývacího roztoku, řádně 10 s vortexováno, krátce a jemně stočeno (viz výše). Zkumavky se vzorky umístěny do magnetického stojánku na 3 až 5 minut než došlo k usazení magnetických kuliček s navázanou RNA, opatrně byl odstraněn veškerý supernatant a zkumavky vyjmuty ze stojánku. Zkumavky krátce a jemně stočeny, umístěny zpět do magnetického stojánku a malou špičkou byla odstraněna veškerá kapalina. Zkumavky se vzorky vyndány z magnetického 15 stojánku a otevřeně nechány 5 min na vzduchu oschnout. Ke každému vzorku přidáno 30 µl elučního pufru předehřátého na 58 °C, řádně 10 s vortexováno a směs inkubována 5 min při 58 °C. Řádně 10 s vortexováno a krátce a jemně centrifugováno (cca 2 s na 1000 g). Vzorky byly umístěny do magnetického stojánku na 3 až 5 minut než došlo k usazení magnetických kuliček. Supernatant obsahující přečištěnou celkovou RNA byl opatrně odebrán do čistých 1,5ml zkumavek. 20

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 µl vzorku RNA izolované pomocí *RiboPure™ Blood Kit*, Ambion z plné 25 krve s *RNAlater®* přečištěné kitem *GLOBINclear™ Whole Blood Kit* byly přidány 3 µl octanu sodného (*RiboPur™*) a 85 µl 100% etanolu. Řádně promícháno a vzorky uskladněny přes noc v mrazicím boxu při teplotě -20 °C. Ráno centrifugováno při 16 100 g 30 min, 4 °C, supernatant opatrně odstraněn, peleta promyta 0,7 ml vychlazeného 70% etanolu, vzorek vortexován, centrifugován 15 min při 4 °C a poté veškerý supernatant opatrně odstraněn. Pelety rozpuštěny ve 30 14 µl vody bez nukleas či dle velikosti pelety a vstupní koncentrace ve větším objemu. Byla změřena koncentrace přečištěné a přesrážené RNA na Nanodropu (1 µl), integrita stanovena pomocí Bioanalyzery 2100, Agilent Technologies (1 µl) – *Agilent RNA 6000 Nano/Pico Kit* (kat. č. 5067–1511/5067–1513).

35 Pokud to bylo z hlediska výchozího materiálu možné, aby kvantitativní i kvalitativní parametry byly v pořádku ($RIN > 7$; $A_{260/280nm} > 1,8$; $A_{260/230nm} > 1,5$), byla připravená RNA dále amplifikována pomocí *Illumina® TotalPrep RNA Amplification Kit*, Ambion (kat. č. IL1791). Systém biotinem označí amplifikovanou RNA k hybridizaci na čipech. Protokol se skládá z reversní transkripce s využitím oligo(dT) primeru pro syntézu cDNA obsahující T7 promotorovou sek- 40 venci. K získané cDNA je syntetizován druhý řetězec při využití DNA polymerasy a RNasy H. Přečištěný cDNA produkt vstupuje do in-vitro transkripce s T7 RNA polymerasou. Výsledná cRNA je následně přečištěna od neinkorporovaných nukleotidů, solí, enzymů a anorganického fosfátu. Vstupní množství RNA, které jsme využívali pro amplifikaci, bylo 150 ng v maximálně 11 µl. Pro jednotlivé kroky byl použit *DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler*, Bio-Rad Labo- 45 ratories.

RNA vzorky o objemu 11 µl (150 ng RNA) byly umístěny do sterilních 0,2ml zkumavek bez RNas. Případně byly do daného objemu naředěny vodou bez nukleas. Při laboratorní teplotě byl 50 připraven master mix pro reversní transkripci – syntézu jednořetězcové DNA:

1 µl T7 oligo(dT)primer

2 µl 10x pufr pro první řetězec (objemy jsou udány na jednu 20 µl reakci)

4 µl směs dNTP (složky byly přidávány v daném pořadí)

1 μ l inhibitor RNAs

1 μ l ArrayScript(enzym).

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

10 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

15 1 μ l RNasy H.

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

25 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 předehřáto 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.

30 Ke vzorkům cDNA bylo přidáno 250 μ l cDNA vazebného pufru, důkladně promícháno pipetováním (2 až 3x), 3 až 4x poklepáno na zkumavky a krátce stočeno. Kolonky byly umístěny do dodaných promývacích zkumavek a na jejich střed nanášeny 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). Kolony s cDNA byly přendány do elučnicích zkumavek. Na střed kolonek bylo nanášeno 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 nanášen druhý alikvot předehřáté vody bez nukleas – 9 μ l, centrifugováno 2 min 10 000 g.

40 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.

45

50 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 až 3x) a 3 až 4x cvrknuto do zkumavek. Vzorky krátce centrifugovány a umístěny do bloku cyklu, kde byly inkubovány při 37 °C po dobu 14 h, 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 µl bylo přidáno 350 µl cRNA vazebného pufru. Ihned bylo přidáno 250 µl 100% etanolu, vzorky 3x promíchány pipetováním, ale nevortexovány a necentrifugovány. Po smísení etanolu se vzorkem byla směs přenesena na střed připravených kolonek, centrifugováno 1 min 10 000 g, eluát byl zlikvidován. Na střed každé cRNA kolonky bylo aplikováno 650 µl promývacího pufru, centrifugováno 1 min 10 000 g a eluát byl zlikvidován.

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

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

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

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

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

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

5 *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 10 55 °C, víko bylo zavřeno a ponecháno hřát přes noc.

Další den byl připraven promývací roztok E1BC přidáním 3 ml E1BC pufru do 1 l vody bez RNAs. Na laboratorní teplotu byl předehřát blokovací pufr E1 (4 ml/čip). Bylo připraveno odpovídající množství blokovacího pufru E1 (2 ml/čip) se streptavidin–Cy3 (2 μ l zásobního roztoku o koncentraci 1 mg/ml na jeden čip). Byla použita jedna kónická zkumavka pro všechny aktuálně 15 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 20 promývacího roztoku E1BC a byla z nich opatrně oddělena krycí folie. 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 předehřátý na 55 °C. Se zavřeným víkem byly čipy bez třepání inkubovány 10 min. Během této inkubace bylo připraveno 250 ml 25 promývacího roztoku E1BC v čisté barvicí nádobě. Ihned po 10min 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 vyšplíchnutí roztoku z nádoby (120 rpm). Přemístěn do čisté barvicí nádoby s 250 ml 100% etanolu. Krátce a důsledně 30 pomocí rukojeti držáku byly čipy proprány a poté 10 min třepány na orbitální třepače při maximální rychlosti. Čipy byly přemístěny do čisté barvicí nádoby s 250 ml promývacího roztoku E1BC, krátce a intenzivně promíchány a třepány na orbitální třepače 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– 35 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 rcf po dobu 4 min. Usušené čipy 40 byly ihned skenovány pomocí *Illumina® BeadArray Readeru* na skenovací faktor 1,0 a 1,5 a získaná data jsou uchovávána na DVD a webovém úložišti dat.

Příklad 2: Statistické vyhodnocení expresního profilu

45 Předkládaný vynález je doložen výsledky, které jsme obdrželi na základě celogenomové analýzy vzorků periferní krve získaných od jedinců hospitalizovaných v letech 2006 až 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 50 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 shora 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 55 *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
5 vezení 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.

10 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 24ti hodinách s elevací úseku ST na EKG křivce (STEMI), či bez elevací ST (NONSTEMI). Biochemický průkaz nekrózy byl stanovován v naší
15 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
20 byl vyšetřován Troponin I okamžitě při přijetí a dále ve 4 až 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.

25 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
30 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

5

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 kategori-
rických 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 model 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 až 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 až 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 až 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). Páro-

vý 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 nutné vycházejí pouze z výsledků obdržných z lineárního modelu, kde jsou lineární efekty jednotlivých čipů na hodnoty intenzit genové exprese adjustovány. Lineární statistický model (*limma*) zohledňoval vliv použitého čipu na hodnoty intenzit genové exprese. Intenzity genové exprese vstupovaly do lineárního modelu jako dvojkové logaritmy původních hodnot. Obrázky 2a a 2b ukazují diagnostiku lineárního modelu pro logaritmovaná data intenzit genové exprese při základu 2 pro všechny tři uvažované konstanty 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 Illuminu 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 čísla 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 kli-

nicky významných genů ($|\log_2\text{-fold change}| \geq 1$, tj. alespoň dvojnásobná změna intenzity genové exprese směrem nahoru nebo dolů). Tato množina byla následně redukována aplikací prediktivního PAM modelu (Prediction Analysis for Microarrays, <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/PAM/>), navrženého k vyhledávání množin genů s prediktivními vlastnostmi v nezávislých výběrech. Výskyt opakovaných pozorování (tj. technických replikátů) u 7 pacientů byl na úrovni *limma* modelu ošetřen použitím smíšeného lineárního modelu pro korelovaná data. Sekvence sond jsou uvedeny v tabulce 5.

V Tabulce 4 je uvedena prediktivní množina genů identifikovaná v rámci vynálezu, která se vzhledem k obecné české populaci jeví z hlediska genové exprese 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 příkladu 2 v populacích AIM a Kontrol jsou uvedeny v Tabulce 6. Simultánně zvýšené hodnoty intenzit genové exprese 9 genů/lokusů uvedených v tabulkách (OLIG2, MS4A3, CEBPE, LIPA, EPAS1, CLINT1, MYCT1, VPS29 a LOC130951) a současně naopak 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 faktorům 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_2FC	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
 \log_2FC ... 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 vážící protein, epsilon (Homo sapiens CAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon (CEBPE)), mRNA.
4250379	CCCAGTGACACTTCAGAGA GCTGGTAGTTAGTAGCATGT TGAGCCAGGCC	Lidský homolog v-fos FBJ myšského onkogenu virového osteosarkomu (Homo sapiens v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS)), mRNA.
1470070	CCCGTACTGTCGTTATTGA TCACATCTGTGTGAAGCCAA 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	TGCAGGTCCTTTGTATGCTG 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	TGGCAAGGCTTCCTCCGTG TTTATCCCTGTAGCCATCAT TTAAGTCAGG	Lidský klathrinový interaktor 1 (Homo sapiens clathrin interactor 1 (CLINT1)), mRNA.
6280239	AGTGGCTGTGAACGTCGAA GCAACCTCAGCCTGGCCAGT CTCACCTCCA	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	AATCCAAGCCTCATTTGAGA GCCTGTGCCCTTCCCCTACTAC ACCACCAGGC	Lidský předpokládaný protein BC014602 (Homo sapiens hypothetical protein BC014602 (LOC130951)), mRNA.

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

Illumina ID	Název / Lokus Genu	Průměrná Exprese	
		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

10

15

20

25

30

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 něž 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 téže 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 a 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, **v y z n a ě n ý t í m**, 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.

5

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že biologickým vzorkem odebraným z těla pacienta jsou buňky periferní krve.

10

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, **v y z n a ě n ý t í m**, 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

15

18 sekvencí

+

3 výkresy

20

SEQUENCE LISTING

<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 accagcgcgc ggtgccaggt tctcccctga	60
ggcttttcgg agcgagctcc tcaaatcgca tccagatddd cgggtccgag ggaaggagga	120
ccctgcgaaa gctgcgacga ctatcttccc ctggggccat ggactcggac gccagcctgg	180
tgtccagccg cccgtcgtcg ccagagcccc atgacctddd tctgccggcc cggagtaagg	240
gcagcagcgg cagcgccttc actgggggca ccgtgtcctc gtccaccccc agtgactgcc	300
cgccggagct gagcgcggag ctgcgcggcg ctatgggctc tgcggggcgc catcctgggg	360
acaagctagg aggcagtgcc tcaagtcat cctcgtccag cacctcgtcg tctacgtcgt	420
cggcggctgc gtcgtccacc aagaaggaca agaagcaaat gacagagccg gagctgcagc	480
agctgcgtct caagatcaac agccgcgagc gcaagcgcac gcacgacctc aacatcgcca	540
tggatggcct ccgcgaggtc atgccgtacg cacacggccc ttcgggtgcg aagctttcca	600
agatcggcac gctgctgctg gcgcgcaact acatcctcat gtcaccaac tgcctggagg	660
agatgaagcg actggtgagc gagatctacg gggggccacca cgctggcttc caccgcgcg	720
cctgcggcgg cctggcgcac tccgcgcccc tgcccgcgc caccgcgcac ccggcagcag	780
cagcgcacgc cgcacatcac cccgcggtgc accaccccat cctgccgccc gccgccgag	840
cggctgctgc cgccgctgca gccgcggctg tgtccagcgc ctctctgcc ggatccgggc	900
tgccgtcggc cggctccatc cgtccaccgc acggcctact caagtctccg tctgctgccg	960
cggccgcccc gctggggggc gggggcggcg gcagtggggc gagcgggggc ttccagcact	1020
ggggcgcat 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 gccacagag cagtggggag	1320
tgaggggatg ttctctccgg gacctgatc agcgtgtct ggctttaacc tgagctggtc	1380
cagtagacat cgttttatga aaaggtaccg ctgtgtgcat tcctcactag aactcatccg	1440

acccccgacc cccacctccg ggaaaagatt ctaaaaactt cttccctga gagcgtggcc 1500
 tgacttgacag actcggcttg ggcagcactt cgggggggga gggggtgta tgggaggggg 1560
 acacattggg gccttgctcc tcttctctt ttcttgccg gtgggagact ccgggtagcc 1620
 gcaactgaga agcaacagcc cgaccgcgc ctccagggtc gtccctggcc caaggccagg 1680
 ggccacaagt tagttggaag ccggcgctcg gtatcagaag cgctgatggt catatccaat 1740
 ctcaatatct ggggtcaatcc acaccctctt agaactgtgg ccgttctctc ctgtctctcg 1800
 ttgatttggg agaatatggt tttctaataa atctgtggat gttccttctt caacagtatg 1860
 agcaagttta tagacattca gagtagaacc acttgtggat tgggaataacc caaaactgcc 1920
 gatttcaggg gcgggtgcat tgtagttatt attttaaaat agaaactacc ccaccgactc 1980
 atcttctctt ctctaagcac aaagtgattt ggttattttg gtacctgaga acgtaacaga 2040
 attaaaaggc agttgctgtg gaaacagttt ggggtattttg ggggttctgt tggcttttta 2100
 aaatttctt ttttggatgt gtaaatttat caatgatgag gtaagtgcgc aatgctaagc 2160
 tgtttgctca cgtgactgcc agcccatcg gactctaagc cggcttctct ctattttggt 2220
 ttatttttgc cacgtttaac acaaatggta aactcctcca cgtgcttctt gcgttccgtg 2280
 caagccgcct cggcgctgcc tgcgttgcaa actgggcttt gtagcgtctg ccgtgtaaca 2340
 cccttctctt gatcgcaccg cccctcgcag agagtgtatc atctgtttta tttttgtaaa 2400
 aacaaagtgc taaataatat ttattacttg tttggttga aaaacggaat aatgactga 2460
 gtgttgagat tttaaataaa atttaaagca aaaaaaaaaa aaaaa 2505

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

<400> 2
 aatgtaaagt ttttccagtg aaacaaaacg taagaatctg agtttgttt tcaaagatca 60
 ctaaatttta gttatgatta tatcacattt tccaaaatgt gtggcagttt ttgccctct 120
 tgctctgagt gttggtgcac tggacacttt tattgctgca gtatatgagc atgcbggtgat 180
 attaccaaac agaacagaaa cacctgtttc aaaagaagaa gctttgctcc tgatgaacaa 240
 gaacatagat gttttggaga aagcagttta gctggcagcg aagcaggggtg cacatatcat 300
 tgtgaccca gaagatggaa tctatggttg gatcttcacc agggagagca ttaccctta 360
 tctagaggat ataccagacc ctggagtga ctggattcca tgtagagacc cctggagaaa 420
 tcaactaaat atagtaagtt tgaggaaatg tctattgaat tagattcggc aacacaccag 480
 tgcaacaaag actcagctgc ctggccaagg acaactctat ctatgtcgtg gctaatttg 540
 gggacaagaa gccatgcaat gccagtgact ctcaagtgtc ccctgatggc cgttaccaat 600
 acaactgta tgtggtgttt gattctcagg gaaaactgtt ggcacgctac cataagtaca 660
 atctttttgc acctgaaatt cagtttgatt tccccaagga ttcagaactt gtgacttttg 720
 acactcctt tgggaagttt ggcattttta cttgctttga catttttct catgaccag 780

ctgtggtggt ggtggatgag tttcaattga cagcattctc taccacacag catggtacaa	840
cacgctgccc ctctctcgg ctgttccctt ccattcagca tgggccaagg ccatgggagt	900
caatctactt gctgcaaata cccacaacac cagcatgcac atgacagggg 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 ctaggtgctt ttgatggact gcacacagta gaaggccaat attacttaca	1320
gatatgtgca ttactgaagt gtcaaaccac tgacctggaa acgtgtggag aacctgtggg	1380
gtcagctttt accaagtttg aagacttctc cctcagtggc acatttgga cgcgttatgt	1440
tttccacag atcattctaa gtgggagtca gcttgcccct gaaagacatt atgagatttc	1500
aagagatgga cgcttgagga gccgaagtgg agcccccttg cctgtcttag ttatggccct	1560
gtatggaaga gtgtttgaga aggaccctcc acgcttaggg cagggatctg ggaaattcca	1620
gtgatctcct ttagcagagc ctttttagga ttagcctggc taagaaagga agaaaaaaaa	1680
gagatccgtt agtgtctgtt 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 ctctacttgg	60
cgacaagggtg gacttgggag gaaagccgtc tgccaaagcc tgaagcctcc aagccataaa	120
caaccccaat ggcctccac gaagttgata atgcagagct ggggtcagcc tctgcccag	180
gtaccccagg cagtgaggcg ggaccagaag agctgaatac ttctgtctac cagcccatag	240
atggatcacc agattatcag aaagcaaaat tacaagttct tggggccatc cagatcctga	300
atgcagcaat gattctggct ttgggtgtct ttctgggttc cttgcaatac ccataccact	360
tccaaaagca cttctttttc ttcaccttct acacaggcta cccgatttgg ggtgctgtgt	420
ttttctgtag ttcaggaacc ttgtctgttg tagcagggat aaaaccaca agaacatgga	480
tacagaacag ttttggaatg aacattgcca gtgctacaat tgcactagtg gggactgctt	540
ttctctcact aaatatagca gttaatatcc agtcattaag gagttgtcac tctcatcag	600
agtcaccgga cctatgcaat tacatgggct ccatatcaaa tggcatgggtg tctctactgc	660
tgattctcac cttgctggaa ttatgcgtaa ccatctctac catagccatg tggtgcaatg	720
caaactgctg taattcaaga gaggaatttt cctcacctcc caattctgtg taatcaagaa	780

tacctcctta attctgagag catgaatatt tgaccrtaaa tctccagtga ctcagagctt	840
caccacaaa ctcaggagaa cataagcctg ctcgtaaagc tcaatccttc tatcatggca	900
ccaatcacia gaaccttggga cgtttgactg actctatcct ttctctccta actataaatc	960
ctatrtgtgt gtcgtgggta tggaaggaca gatatatctt tttaggcatt cttggatatt	1020
tgtaacttct atgatcatta ctccaaagt gttccagaa attgggttcta tttcttctta	1080
tccacctact ccattgcttt atgaggttta aggaaggaag gcggtataat ccctattcaa	1140
tatatttttt ctaaaatcca acttctgacc gccagtagg aagaaaaatg agacattttt	1200
tccattacag agaaatgctt cttgacttta acatcagcat tataaaaagt gtcaaataaa	1260
aaattaccat cattatcatt aaaataaatt ttcactgtat ttgagatggg agggttaagg	1320
ctcagggatt ttatttcagt gaactgctgg aactcacaca tgccctgata tgtaaattgat	1380
gatttatgtt ggcgagtctg agagcaagcc caaatgtgtt cttcaaagga caatgggaaa	1440
ctgtaaagta gagaactaaa gaataaggcc tttagaatct gacacatctg ggtcaaatt	1500
ctgaaactgt cacttattac ctgtatgaac atgggcaaat tatctaactt ctctgatcta	1560
tttttctca tctgtaaaat aggtgtaata ataacaacta ctttgtcggg tgctctgagg	1620
gttaaattgaa aataaaaaga aaatgtgaaa cagcaaaaaa aaaaa	1665

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

<400> 4	
gagagaggcc acacaggagt gggtgacaga ggagactgca gagggcaggt ctagggcaga	60
agatcgagag agggcaggcc caggtcagga ggaggtagag agagggcagc cggagcacc	120
caaggggtgc ctcaagagca ggtgggggcg gggagccgag ggggcgggccc ggccatgtcc	180
cacgggacct actacgagtg tgagccccgg ggtggccagc agccactcga gttctcaggg	240
ggccgagctg ggcccgggga gctaggggac atgtgtgagc atgaggcctc cattgacctc	300
tccgcctaca tcgagtctgg ggaagagcag cttctctccg atctctttgc cgtgaagcca	360
gcgcctgagg ccagaggcct caagggcccc ggaaccctg ctttccccca ctacttgccg	420
cctgacctc ggccctttgc ctacctcca cataccttcg gccagacag gaagggcgtg	480
gggcctggca tctacagcag cccagggagc tacgaccca gggctgtggc ggtgaaggag	540
gagccccggg ggccagaggg cagccgagct gccagccgag gcagctaaa tcccctgcag	600
taccaagtgg cacactgtgg gcagacagcc atgcacctgc ccccaactct ggcagcacc	660
ggccagcctc tgcgcgttct caaggcccc ttggccactg ccgcaccccc ctgcagtccc	720
ctcctgaagg cgcctcccc ggctggcccc ttacacaagg gcaagaaggc agtgaacaaa	780
gatagccttg agtaccggct gaggcgggag cgcaacaaca tcgccgtgcg caagagccga	840
gacaaggcca agagggcagc tctggagacg cagcagaagg tgctggagta catggcagag	900
aacgagcgc cccgagccg cgtggagcag ctcaccagc agctagacac cctccgcaac	960

ctcttccgcc 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
 gaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1250

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

<400> 5
 attcataaaa cgcttggtat aaaagcagtg gctgcgggcg ctcgtactcc aaccgcatct 60
 gcagcgagca tctgagaagc caagactgag ccggcggccg cggcgcagcg aacgagcagt 120
 gaccgtgctc ctaccagct ctgctccaca gcgccacct gtctccgcc ctcggccctt 180
 cgcccggctt tgcctaaccg ccacgatgat gttctcgggc ttcaacgcag actacgaggc 240
 gtcacctcc cgctgcagca gcgcgtcccc ggccggggat agcctctctt actaccactc 300
 acccgcagac tccttctcca gcatgggctc gcctgtcaac gcgcaggact tctgcacgga 360
 cctggccgtc tccagtgcc aacttcattcc cacggctact gccatctcga ccagtccgga 420
 cctgcagtgg ctggtgcagc ccgccctcgt ctctccctg gccccatcgc agaccagagc 480
 ccctcacctt ttcggagtcc ccgccccctc cgctggggct tactccaggg ctggcgttgt 540
 gaagaccatg acaggaggcc gagcgcagag cattggcagg aggggcaagg tggaacagtt 600
 atctccagaa gaagaagaga aaaggagaat ccgaagggaa aggaataaga tggtgcagc 660
 caaatgccgc aaccggagga gggagctgac tgatacactc caagcggaga cagaccaact 720
 agaagatgag aagtctgctt tgcagaccga gattgccaac ctgctgaagg agaaggaaaa 780
 actagagttc atcctggcag ctcaccgacc tgcctgcaag atccctgatg acctgggctt 840
 cccagaagag atgtctgtgg cttcccttga tctgactggg ggcctgccag aggttgccac 900
 cccggagtct gaggaggcct tcaccctgcc tctcctcaat gaccctgagc ccaagccctc 960
 agtggaaact gtcaagagca tcagcagcat ggagctgaag accgagccct ttgatgactt 1020
 cctgttccca gcatcatcca ggcccagtg ctctgagaca gcccgctccg tgccagacat 1080
 ggacctatct gggtccttct atgcagcaga ctgggagcct ctgcacagtg gctccctggg 1140
 gatggggccc atggccacag agctggagcc cctgtgcact ccgggtgtca cctgtactcc 1200
 cagctgcact gcttacacgt cttccttctg cttcacctac cccgaggctg actccttccc 1260
 cagctgtgca gctgcccacc gcaagggcag cagcagcaat gagccttctt ctgactcgtt 1320
 cagctacccc acgtgctgg ccctgtgagg gggcagggaa ggggaggcag ccggcaccca 1380
 caagtgccac tgcccagct ggtgcattac agagaggaga aacacatctt ccctagaggg 1440
 ttctgtaga cctagggagg accttatctg tgcgtgaaac acaccaggct gtgggcctca 1500

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

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

<400> 6
 ttcccgggtgg ctggctgctc tgattggctg aacaaatagt ccgagggtgg tgggcatccg 60
 ccctcccagac aaggcagacc agggccccctg cagggtcccct atccgcaccc cggcccctga 120
 gagctggcac tgcgactcga gacagcggcc cggcaggaca gctccagaat gaaaatgcgg 180
 ttcttgggggt tgggtggctg tttggttctc tggaccctgc attctgaggg gtctggaggg 240
 aaactgacag ctgtggatcc tgaaacaaac atgaatgtga gtgaaattat ctcttactgg 300
 ggattcccta gtgaggaata cctagttgag acagaagatg gatataattct gtgccttaac 360
 cgaattcctc atgggaggaa gaaccattct gacaaaggct 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 caaaatatga 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
 acccacgttt gcactcatgt catactgaag gagctctgtg gaaatctctg ttttcttctg 960
 tgtggattta atgagagaaa tttaaataatg 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

gactggcttg cagatgtcta cgacgtcaat atcttactga ctcagatcac caacttggtg	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
ttagggtctg aataggaagc cagtgtctca accatagtat tgtctcttta agtctttaa	1620
atatcactga tgtgtaaaaa ggtcattata tccattctgt ttttaaaatt taaaatatat	1680
tgactttttg cccttcatag gacaaagtaa tatatgtgtt ggaattttaa aattgtgttg	1740
tcattggtaa atctgtcact gacttaagcg aggtataaaa gtacgcagtt ttcatgtcct	1800
tgccttaaag agctctctag tctaacggtc ttgtagttag agatctaaat gacattttat	1860
catgttttcc tgcagcaggt gcatagtcaa atccagaaat atcacagctg tgccagtaat	1920
aaggatgcta acaattaatt ttatcaaacc taactgtgac agctgtgatt tgacacgttt	1980
taattgtca ggttaaataa aatagttttc cggcgtcttc aaaaacaaat tgactgata	2040
aaaacaaaac aaaagtatgt tttaaatgct ttgaagactg atacactcaa ccatctatat	2100
tcatgagctc tcaatttcat ggcaggccat agttctactt atctgagaag caaatccctg	2160
tggagactat accactatnt tttctgagat taatgtactc ttggagcccg ctactgtcgt	2220
tattgatcac atctgtgtga agccaaagcc ccgtgggtgc ccatgagaag tgccttgtt	2280
cattttcacc caaatgaagt gtgaacgtga tgttttcgga tgcaaaactca gctcagggat	2340
tcattttgtg tcttagtttt atatgcatcc ttatttttaa tacacctgct tcacgtccct	2400
atgttgggaa gtccatatnt gtctgctttt cttgcagcat catttctta caatactgtc	2460
cggtggacaa aatgacaatt gatatgtttt tctgatataa ttacttttagc tgcactaaca	2520
gtacaatgct tgtaaatggt taatataggc agggcgaata ctactttgta acttttaaag	2580
tcttaactt 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 gcagcctcct aagagtgggtg aaaaccctc	120
ccactgctca ccttggcttc tcttcttct ctccttctc cttgttcaag ggccccgggt	180
tggcttcaac ccggggcttc catggtttca ggttttctt cccttctt tcccccaagg	240
tcgctggaac cagggctgcc ttccagcact tcatggggca cctgggtactt ctggccgtg	300

ggccaaaggc cccgcagttt ttgcacttga gctgtgggtg gaaaggaagt gatgtcagtg	360
agtgagctga agccacaggc agcgatccca cgtaacatt gggacggatt gtgaattcag	420
agctgaataa ggattccaaa gaggggacac cggcatgggg gccgttaagt gctgggagag	480
ttcggatacg atgttccctc gcaaagcccc tgtgacggag gaactctgaa aggaaggact	540
caaggttcca aggggcacga tggatgaagcc gatgtcaaca acgcagccaa acgtggctac	600
acaggactct aagtagaaag ggagggtgcc cccaagagtc tctcaagga cctatcgggc	660
cggggagaag gtccaagcc acgcccacct tggatgggaa aagcaacctg gctgggtggtg	720
acagaactct ttggaatcca acccagtctc tgaggaccgt gggacacccc ctccccctg	780
ccccacccc accccgatac ccaagagatc cagggtctga cttaccctgg gatcttcttc	840
atcgggcggg ggagccctg gcccaactgg ggccctccgc tgcttctgga gggctctggc	900
tctcaccagt ctcttgccc aagatgtggg gtcccgcagt 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 tgtgctcatt ctccgatatt gtgtgttctt ctgccatgac tacctagtcc	1200
aagagtaaac cccacctgcc acagggcccc tggcctaggt atgggggggt gagctttcaa	1260
ccccaaacaa acaactgatt ctggagactg gacttaggtc tctcacgatt cactccggta	1320
gaagacacgg tgattctatc tcccttgacg gacagaatga tcgaagacac agggcatggc	1380
gtgtgccacc ctttggcagg tctgctttaa gtcagggata agggatgctt cctgtgacaa	1440
cttgaatcgc tactcttgcc atttcattag gcaacttcca aacacaaatt catacagaga	1500
agttaccttc ctctctaccg cactagcagg tgatggctct tctgttcta tcttttggct	1560
ttagctccag cccctcttta tttattttcc tggatattta cgcataccac acgaattcat	1620
ctgaacaaac ggggaagaag tgccatatcg tatcgacgtc ttacacggct caagggccaa	1680
ccacctttt ttccaaagtc ctttggcgt ttaccacca attcagcatg ctgcagtaca	1740
tttcttttcg cattcccatc ttggtcttct cccacacgtg gagacggata tgttttctcg	1800
ttttctgttc caggaattac tagtaacgag aacacatcct accccaccag caagccccag	1860
tgtgatcggg ttctttcggc ctctttgtc tcttctccc cccaccccc cgcaaaaacc	1920
ccccagggat tgcgtgaaag aaacaattgt tcagcgaaac caacctgaaa ttacacgtct	1980
actttctttc ccaggctggc gctgagatgg gcagggtgctg cagcagcccc gctggaagcg	2040
atgcagcatc caggacgacg gaggaagggg cggagagggg cctctgcttt ccaggctgcc	2100
ttttatactg cctctggtca cctgacatgg aacgtaccct aacctaatca gttacctgta	2160
ccttaattgc aattaactta atccaattac atgacctgga aaggctctatc tgcacagccc	2220
actctaagat cctgtccact gctgacagac attctaaaac ctacttgtag agctgcaagc	2280
tttgaacaat agatgttccc cgctcagacat gtaacactgg tgcctgtatc cctgtcttct	2340

tttccatctt ttttgttgtt ttgttttgtt 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 gaccgcaactg ggaaacacag atgaggaaag tcaacaacgc	2640
tttgccttc agtgcctgcc tcctttttca gctcgtcttg cgactcccgg acgcctgtga	2700
ggctgtaatt ccctgggtcc cattgccatg tctctggatt tgcgaagatc caccgcacct	2760
tctgtggaac tcccgtgtcg gtgaactttt gtgccacggc ccctaattct gcccatggtc	2820
atccgcacct gcacgactta ggggtccatgt tccttggacg ggaagagaca ggcaggagtc	2880
ggaatgatga accagcacac tggggcgttt tctcatgtag cccaagtac cccatggctc	2940
tctcgagctt tggaaccagt cgcgtcccct ttgacactgc acccggctcc cagtctctca	3000
atcttgttgg ccctccggcg atctcccgtt ggatgaattg ctctgtctga aactccagtc	3060
ccctttgatt tgcgcttcat taattattca tgattcaggt tggaaggcct gctgacgacc	3120
ccctgtggcc gttctctgag ctttctgtc acatcgttc cttccacgct ctttggttcc	3180
ttatggctct gctccctctg ctgtcagagg agcagagagt tgatcttatt cattctggat	3240
acggatactt tctaggtgat ctggataatc aagataacga ccctcaacag cggcggagag	3300
ggagcagcca gttggtgtgt ctcaaaaaat cccactgagt tccgaggcct cctagatgtg	3360
gaatcctgct gagagttgtt cccaggtcag agaatggaga gagcctgtgc atgatgggat	3420
atccctgect agatctttca gtgagtctct acctcagcta ctcttaggat cagggggaga	3480
accatggtgt cagacatccg gaaagaagac gggatgaatg ttttacctct gaagtacatc	3540
ccaaatgtgg gagttaactt cagctttgct ggggtctatt tggccagtga aactctgect	3600
ggttccttcg cacatccgga agccacttca cggggggccg tcgcaactgg aaccacacac	3660
ttggcatcgg cggttgagcc aaatggggac tcgtggtgca agcaacgctc cccacgtgtt	3720
agcgtgcgtg agatgcggtt ggcgggattt tactaggtgc gtgttggtag agtggggctg	3780
aggttttctt gctcctgtgg atgtatagca agtcaaaggc cctgcccagc cctgcggtcc	3840
cctcagtcaa ctctgtttcg gagacgtaac gatttggatt gccaacaagt caagaaatgt	3900
tcaagccctt ggatgtaggg taaagaaaga gagatcagac tgtcactgtg tctatgtaga	3960
aggggaagac ataagagact ccattttgaa aaagacctgt agtttaaca attgctttgc	4020
tgagatgttg ttcatttgtt gccttgctc atccacttg ccccagcccc ttgacccaa	4080
cttggagctc acaaaaacct gtgttgata aaatcgaggt ttaggggatc tagggctgtg	4140
caggatgtgc tttgttaacc aaatgtttac aagcagtata cttggtaaaa gtcattgcca	4200
ttctctagtt tcaataaacc aggggcacta tgcaccgtgg aaagccgcag cgacctctac	4260
ccttgaaagc agggatttgt ccaaggtttc tccccatgtg atagtctgaa atatggcctc	4320
gtgggatgag aaagacctga ccatccccca gcccccccc cgtaaagggt ctgtgctgag	4380

gtggattact caaagaggaa agcctcttgc agttgagaga gaggaaggcc gctgtttccct 444U
 gcctgcccct gggaactgaa tgtctcggta 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 taagggaaact cagaggcctg tgccgggtgca 4800
 ggctccttgt atgctgagcg ccggtccccct aggccactg 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
 tcaagtcat agccaagtca ccatgatgtt ctggtaccgt cagcaacctg gacagagcct 240
 gacactgatc gcaactgcaa atcagggctc tgaggccaca tatgagagtg gatttgtcat 300
 tgacaagttt cccatcagcc gcccacacct aacatttctca actctgactg tgagcaacat 360
 gagccctgaa gacagcagca tatatctctg cagcgttgaa gatagggaca gagtctacaa 420
 tgagcagttc ttcgggccag ggacacggct caccgtgcta gaggacctga aaaacgtgtt 480
 cccac 485

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

<400> 9
 gctttactact cgcgagcgga ccgccacacg ggtccggtgc ccgctgcgct tccgccccag 60
 cgctcctgag gcggccgtac aatcctcggc agtgtcctga gactgtatgg tcagctcagc 120
 ccggcctccg actccttccg actcccagca ttcgagccac ttttttttt ctttgaaaac 180
 tcagaaaagt gactcctttt ccagggaaaa aggaacttgg gttcccttct ctccgtcctc 240
 ttttcgggtc tgacagctc caccactcc tccccggac cccgcctccg cgcgcaggtt 300
 cctcccagtc acctttctcc acccccgcc ccgcacctag cccgccgcgc gccaccttcc 360
 acctgactgc gcggggcgct cgggacctgc gcgcacctc gaccttacc acccgcccgg 420
 gccgcgggga gcggacgagg gccacagccc cccacccgcc agggagccca ggtgctcggc 480
 gtctgaacgt ctcaaagggc cacagcgaca atgacagctg acaaggagaa gaaaaggagt 540
 agctcggaga ggaggaagga gaagtcccgg gatgctgcgc ggtgccggcg gagcaaggag 600

acggaggtgt tctatgagct ggcccatgag ctgcctctgc cccacagtgt gagctcccat	660
ctggacaagg cctccatcat gcgactggca atcagcttcc tgcgaacaca caagctcctc	720
tcctcagttt gctctgaaaa cgagtccgaa gccgaagctg accagcagat ggacaacttg	780
tacctgaaag ccttggaggg ttctattgcc gtggtgacct aagatggcga catgatcttt	840
ctgtcagaaa acatcagcaa gttcatggga cttacacagg tggagctaac aggacatagt	900
atctttgact tcactcatcc ctgcgacct gaggagattc gtgagaacct gagtctcaaa	960
aatggctctg gttttgggaa aaaaagcaaa gacatgtcca cagagcggga cttcttcatg	1020
aggatgaagt gcacggtcac caacagagge cgtactgtca acctcaagtc agccacctgg	1080
aaggtcttgc actgcacggg ccaggtgaaa gtctacaaca actgccctcc tcacaatagt	1140
ctgtgtggct acaaggagcc cctgctgtcc tgcctcatca tcatgtgtga accaatccag	1200
cacccatccc acatggacat ccccctggat agcaagacct tcctgagccg ccacagcatg	1260
gacatgaagt tcacctactg tgatgacaga atcacagaac tgattgggta ccaccctgag	1320
gagctgcttg gccgctcagc ctatgaattc taccatgagc tagactccga gaacatgacc	1380
aagagtcacc agaacttgtg caccaagggt caggtagtaa gtggccagta ccggatgctc	1440
gcaaagcatg ggggctacgt gtggctggag acccagggga cggctatcta caaccctcgc	1500
aacctgcagc cccagtgcat catgtgtgtc aactacgtcc tgagtgagat tgagaagaat	1560
gacgtggtgt tctccatgga ccagactgaa tcctgttca agccccacct gatggccatg	1620
aacagcatct ttgatagcag tggcaagggg gctgtgtctg agaagagtaa cttcctattc	1680
accaagctaa aggaggagcc cgaggagctg gccagctgg ctcccacccc aggagacgcc	1740
atcatctctc tggatttcgg gaatcagaac ttcgaggagt cctcagccta tggcaaggcc	1800
atcctgcccc cgagccagcc atgggccacg gagttgagga gccacagcac ccagagcgag	1860
gctgggagcc tgcctgcctt caccgtgccc caggcagctg ccccgggcag caccaccccc	1920
agtgccacca gcagcagcag cagctgctcc acgcccata gccctgaaga ctattacaca	1980
tctttggata acgacctgaa gattgaagtg attgagaagc tcttcgccat ggacacagag	2040
gccaaggacc aatgcagtac ccagacggat ttcaatgagc tggacttggga gacactggca	2100
ccctatatcc ccatggacgg ggaagacttc cagctaagcc ccatctgccc cgaggagcgg	2160
ctcttggcgg agaaccaca gtccaccccc cagcactgct tcagtgccat gacaaacatc	2220
ttccagccac tggcccctgt agccccgcac agtcccctcc tcctggacaa gtttcagcag	2280
cagctggaga gcaagaagac agagcccag caccggccca tgtcctccat cttctttgat	2340
gccggaagca aagcatccct gccaccgtgc tgtggccagg ccagcacccc tctctcttcc	2400
atggggggca gatccaatac ccagtggccc ccagatccac cattacattt tgggcccaca	2460
aagtgggccc tgggggatca gcgcacagag ttcttgggag cagcgcctgt ggggcccct	2520
gtctctccac cccatgtctc caccttcaag acaaggtctg caaagggtt tggggctcga	2580
ggcccagacg tgctgagtcc ggccatggta gccctctcca acaagctgaa gctgaagcga	2640

cagctggagt atgaagagca agccttccag gacctgagcg ggggggaccc acctggtggc 2700
 agcacctcac atttgatgtg gaaacggatg aagaacctca ggggtgggag ctgccctttg 2760
 atgccggaca agccactgag cgcaaatgta cccaatgata agttcaccca aaaccccatg 2820
 aggggcctgg gccatcccct gagacatctg ccgctgccac agcctccatc tgccatcagt 2880
 cccggggaga acagcaagag caggttcccc ccacagtgtc acgccacca gtaccaggac 2940
 tacagcctgt cgtcagccca caagggtgtca ggcatggcaa gccggctgtc cgggccctca 3000
 tttgagtctt acctgctgcc cgaactgacc agatatgact gtgaggtgaa cgtgcccgtg 3060
 ctgggaagct ccacgctcct gcaaggaggg gacctcctca gagccctgga ccaggccacc 3120
 tgagccaggc cttctacctg ggcagcacct ctgccgacgc cgtcccacca gcttcactct 3180
 ctccgtctgt ttttgcaact aggtatttct aacgccagca cactatttac aagatggact 3240
 tacctggcag acttgcccag gtcaccaagc agtggccttt ttctgagatg ctcactttat 3300
 tatccctatt tttaaagtac acaattgttt tacctgttct gaaatgttct taaattttgt 3360
 aggatTTTTT tctccccac cttcaatgac ttctaattta tattatccat aggtttctct 3420
 ccctccttct ccttctcaca cacaactgtc catactaaca agtttgggtc atgtctgttc 3480
 ttctgtaggg agaagcttta gcttcatttt actaaaaaga ttctcgtta ttgttgttgc 3540
 caaagagaaa caaaaatgat tttgctttcc aagcttgggt tgtggcgtct ccctcgcaga 3600
 gcccttctcg tttctttttt aaactaatca ccatattgta aatttcaggg ttttttttt 3660
 tttgtttaag ctgactcttt gctctaattt tggaaaaaaa gaaatgtgaa gggtaactc 3720
 caacgtatgt ggttatctgt gaaagttgca cagcgtggct tttcctaaac tgggtgtttt 3780
 cccccgatt tgggtgattt tttattatta ttcaaaaaca taactgagtt ttttaaaaga 3840
 ggagaaaatt tatactctggg ttaagtgttt atcatatata tgggtacttt gtaatatcta 3900
 aaaacttaga aacggaaatg gaatcctgct cacaaaatca ctttaagatc ttttcgaagc 3960
 tgttaatttt tcttagtggt gtggacactg cagacttgtc cagtgtcccc acggcctgta 4020
 cggacactgt ggaaggcctc cctctgtcgg ctttttgcca tctgtgatat gccataggtg 4080
 tgacaatccg agcagtggag tcattcagcg ggagcactgc gcgctatccc ctacattct 4140
 ctatgtacta tgtatgtatg tattattatt attgctgcca agagggctctg atggcacgtt 4200
 gtggggctcg ggggtggggc ggggaagtgc tctaactttt ctttaagggtt tgttgctagc 4260
 ccttcaagtg cactgagcta tgtgactcgg atggtctttc acacggcaca tttggacatt 4320
 tccagaacta ccatgagatg gtttagacgg gaattcatgc aatgagggg tcaaaaatgg 4380
 tatagtgacc ccgtccacgt cctccaagct cacgacctg 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 caactcccctg ggtaagaggg acgacacctc tggtttttca ataccaatta 4680

catggaactt ttctgtaatg ggtacaatga agaagtttct aaaaacacac acaaagcaca	4740
ttgggccaac tatttagtaa gcccggatag acttattgcc aaaaacaaaa aatagctttc	4800
aaaagaaatt taagtctat gagaaattcc ttagtcatgg tgttgcgtaa atcatatfff	4860
agctgcacgg cattacccca cacaggggtg cagaacttga agggttactg acgtgtaaat	4920
gctggtatff gatttcctgt gtgtgttgcc ctggcattaa gggcattffa cccttgcagt	4980
tttactaaaa cactgaaaaa tattccaagc ttcataataa ccctacctgt caacgtaacg	5040
atftcatgaa cgftattata ttgtcgaatt cctactgaca acattataac tgtatgggag	5100
cttaactffa taaggaaatg taffttgaca ctggtatcft attaaagtat tctgatccta	5160
ccactgaaaa aaaaaaaaaa aaaa	5184
<210> 10	
<211> 4007	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 10	
acttccgctc cacgcagcgc ctgtgctgcc gcgtctcgac gtgtcaccgg cggcgccgct	60
gctgtggcaa aggaaggagc tgactggggg agttcgaggc ggcggggcggc ggtgaccccc	120
gcctggaact gccccggtac ggaagtgtc cggggtccgt ggggagcagg agagggaggc	180
ggcggaccgt cccgcgcggg gcacgatgtt gaacatgtgg aagggtgcgcg agctggtgga	240
caaagccacc aatgttgta tgaattatc agagatcgag tctaaggffc gagaggcaac	300
gaacgatgat ccttggggac cttctgggca actcatggga gagattgcca aggctacatt	360
tatgtatgaa caatttccag aacttatgaa catgctttgg tcacgaatgt taaaagacaa	420
caaaaagaat tggagaagag ttataagtc gttgctgctc cttagcttacc tcataaggaa	480
tggatcagag cgtgttgta caagtccag agaacacatt tatgatttac gatccctgga	540
aaattaccac ttgtagatg agcatggtaa ggatcaaggf ataaatattc gacagaaggf	600
gaaggaattg gttgaattg cccaggatga cgacaggctt cgtgaagagc gaaagaaagc	660
aaagaagaac aaagacaagt atgttggggt ttcctcagac agtgttggag gattcagata	720
cagtgaaaga tatgatcctg agcccaaatc aaaatgggat gaggagtggg ataaaaacaa	780
gagtgcffff ccattcagtg ataaattagg tgagctgagt gataaaattg gaagcacaat	840
tgatgacacc atcagcaagt tccggaggaa agatagagaa gactctccag aaagatgcag	900
cgacagcgat gaggaaaaga aagcgagaag aggcagatct cccaaaggf aattcaaaga	960
tgaagaggag actgtgacga caaagcatat tcatatcaca caggccacag agaccaccac	1020
aaccagacac aagcgcacag caaatcctc caaaaccatt gatcctggag cagcagcaca	1080
ttacacaggg gacaaagcaa gtccagatca gaatgcttca acccacacac ctcagcttfc	1140
agftaagact tcagtgccta gcagcaagtc atctggtgac cttgttgatc tgtttgatgg	1200
caccagccag tcaacaggag gatcagctga tttattcgga ggatttgctg actttggctc	1260
agctgctgca tcaggcagft tcccttccca agtaacagca acaagtggga atggagactt	1320

tggtgactgg agtgccttca accaagcccc atcaggccct gttgcttcca gtggcgagtt	1380
ctttggcagt gcctcacagc cagcggtaga acttgtagt ggctcacaat cagctctagg	1440
cccacctcct gctgcctcaa attcttcaga cctgtttgat cttatgggct cgtcccaggc	1500
aaccatgaca tcttcccaga gtatgaattt ctctatgatg agcactaaca ctgtgggact	1560
tggtttgcct atgtcaagat cacagaatac agatatggtc cagaaatcag tcagcaaaac	1620
cttgccctct acttggtctg accccagtgt aaacatcagc ctagacaact tactacctgg	1680
tatgcagcct tccaaacccc agcagccatc actgaataca atgattcagc aacagaatat	1740
gcagcagcct atgaatgtga tgactcaaag ttttgagct gtgaacctca gttctccatc	1800
gaacatgctt cctgtccggc cccaaactaa tgctttgata gggggaccca tgcctatgag	1860
catgcccaat gtgatgactg gcaccatggg aatggccctt cttggaaata ctccgatgat	1920
gaaccagagc atgatgggca tgaacatgaa catagggatg tccgctgctg ggatgggctt	1980
gacaggcaca atgggaatgg gcatgcccac catagccatg acttctggaa ctgtgcaacc	2040
caagcaagat gcctttgcaa atttcgccaa ttttagcaaa taagagattg taaaagaagc	2100
agattgaatg aagaattttt agctgtgcag ataggtgatg ttgggatgga aatgctaata	2160
caactaccct ttcttttatac aagtaattaa aataaatcta cataaagaac caaaaaggct	2220
gttttataaa agtgaaatat ccagtatttc agagggccag gcaagagcac ttcagatgag	2280
gcagtcaaaa tcattttttt ccagtgagga tagaccacaa gtgggtgggtg agaccattga	2340
aagcctttat caactgaaga gtccatttaa cagcataatt tgtgggaaga ctggaatagg	2400
gctgaataaa tgtgtttgaa tctctaattt tatactttct tttcctgagg aacttgattt	2460
ttctgtccct ggatcgctt gtcataattg ggtctgttcc ttttactacc actcttgagt	2520
ccatatatga aatcattaaa gttggatgat cagttttta taaaatata tatttttgtc	2580
caagaaaaaa aaaagcatac atatgtgatt atggctaaat caaaggtaac tggaatgtat	2640
atacttttgc taatgttcca gcaacactgc tattatacta tccaaatttt tattgtaaca	2700
aaacctcttt aagcaattgg tgattgccat 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
tatttttttt attttttttt tgggtgtctg caaaggtaaa aatccattaa aaccttaagt	3000
taaatataaa tgttacaact caatgtttgc ttttagattt tatacagtat ttgttttgtt	3060
ttggttttga gtgtatataa tgcagcatta gcaatatggg 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

tttattaaat tgataaaact ttatttccat tatattcata atgttctggt atacataaca	3420
ttaaaatggt cattaaaatc aatgttgaac tgctttttct ttcgttctgt tagacatttg	3480
agaccatttg gggaaaaaat aattatagtt tgggcaaagt aatttttata aataatttaa	3540
aattatttaa tgacttctct attctttcct atcagactct actgttagga attaaaaatg	3600
aagcagcaaa gatatcctga cctgctccat tcttgcta atgttccatcta 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 atgggtccctg atatttataaa ccgatcatct	3900
taagtaaatt ttttcttaa gaagtatct ttcactttct caaatatgta tggttcttag	3960
acgaagtaaa tgtttatctg aaccttaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa	4007
<210> 11	
<211> 3066	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 11	
ttccttttat gcgaacacaa gtatatgagg ggttggtgtaa aaattatttt tctcttgctg	60
tactacaaag agatagaatc aaactgcttt ttttcgacat actgggtttt ctttctgttt	120
ttcttctctt tcttctatct cttgtggata ttatggctaa taacacaaca agtttaggga	180
gtccatggcc agaaaacttt tgggaggacc ttatcatgtc cttcactgta tccatggcaa	240
tcgggctggt acttgaggga tttatttggg ctgtgttcat ttgtctgtct cgaagaagaa	300
gagccagtgc tcccattctca cagtggagtt caagcaggag atctaggctt tcttacaccc	360
acggcctcaa cagaactgga tttaccgcc acagtggctg tgaacgtcga agcaacctca	420
gcctggccag tctcaccttc cagcgacaag cttccctgga acaagcaaat tcttttcaa	480
gaaaatcaag tttcagagct tctactttcc atccctttct gcaatgtcca ccacttctg	540
tggaaactga gagtcagctg gtgactctcc cttcttcaa tatctctccc accatcagca	600
cttcccacag tctgagccgt cctgactact ggtccagtaa cagtcttcca gtgggccttt	660
caacaccgcc cccacctgcc tatgagtcca tcatcaaggc attcccagat tcttgagtag	720
ggtggctttt ggtttttggt tctttcttgt cttgtctttt attgaaagga aatcaaaaat	780
aggctaaaca gaattttgag ggcattggccc aaataactca tgagttcaa gttgaaacat	840
ggttggtgcaa 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 tcactttaaa gaaaaatctt ctaagggatt	1140

tggattttac tttctttaga atgacaagtg aatcatattg acattttaca atcttagatt 1200
 tttctttttt tttcttttga gacagggctt tgatccgctg cccagggcggg agttgcagta 1260
 gcatgatcag gactcactgc agcctctatc tcccaggctc aagtaatcct cccatcttag 1320
 tgccccaagt agctgggact acaggggtgc actaccacac cggggttgaat ttttttttaa 1380
 ttttagtaga gatgaagtgt cactatgtta ccaaggctgg tctcaaactc ctaaactcag 1440
 atgatcctcc tgcctcggcc tcccaaagtg ctggaattag cctggccaat cttggatttt 1500
 taatggaata tgtgggcaca aatgacaga acataggaca ttctaaagt cttgattttg 1560
 atcattataa gaagtgtggg actcaagcac aggaaactga actcttttgg tgcatttggg 1620
 tgtttcattt ttgacactaa ttttttctgg acaaactctt tatgtgtttt tcccaagaat 1680
 agttatctac ttcttgaggg caaaatcctt ggatttacta acatgatgat ttaccttttc 1740
 ttcaccgttg tcgttacatt gttagaaaag caacaggaaa aatccaatt catttgacct 1800
 aaaaacaagc ctcaagttta aaaccaagct cacgtttttc ttaagggaaa aattttcttt 1860
 cttaaactta catctagcaa cttggaaagc actttctctg gggatcttct tttgtaactt 1920
 tgcagacaaa taagtatgag tcaactgggga gagagtgtgt tattgaaata gatgttgcct 1980
 atgaagaatt ctcttctctg gattgactct taatcatcag gcatcattcc tggtttgctt 2040
 ctctacgaat ctcaattcca acttctctgc agagtctgta cagtgattaa gccatgccag 2100
 atggtctttg gtgcacacag ttatttaaga atccacttcc acaggtggct gcccttgtaa 2160
 ggaagaatgc atccctaaat gtggccacca gagagtcca gtgggcagat gtctgtggct 2220
 gcccttctca ttttaaggaca tgagttcact ggagtattac tcaaaaagtc tgtggttcat 2280
 ttccagtatt gtgaatatatt agtttatgtg gccgtttctt tgtttctttg aacagtggga 2340
 ttttcagtga aaaagtacc cttttttcat ttctattgc agtggtcaca gctaatagtg 2400
 tctgaacatg gttcaagaat aagagattcc atgtagcatt ttctttatta ttttcatttc 2460
 cttatatta tccatcattc cttaaggaca attattctta ataatgctta tagaaaatgt 2520
 tctctaatta aacatgcaa aaggaaaaag taagagaaag agggagcaag aagaaaatgg 2580
 aagaaaaagg gaaaaaagct aaccggataa ccaatttgtt ataagttggg tttcaacaaa 2640
 gaaatttagc agccaagtaa ggtttcaagg gaatattaac ttggtatcag ggctactttt 2700
 tttttttttt ttttacttgc atgtcatcct taatgtctaa catgaaaaat cagcaaagag 2760
 tatggttttt atcaagaatt tgtggtggga gtaaaaactg ctttatagct cccaaattag 2820
 gaagagaaga gcagaaatcc tctggggcat ttaaccatct ggcagaattg ttgctgcacc 2880
 cttatcccag ttataagaca gtcaaaatga ctatttccta aatattgtga gtgtatgaaa 2940
 tgtgaaatta aagcaaaaac tggagacttt taatgtattt ctttaatttg aatgtttttg 3000
 tggattgtga aataaaaata aatttatgtc aagttttatt caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3060
 aaaaaa 3066

<210> 12

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

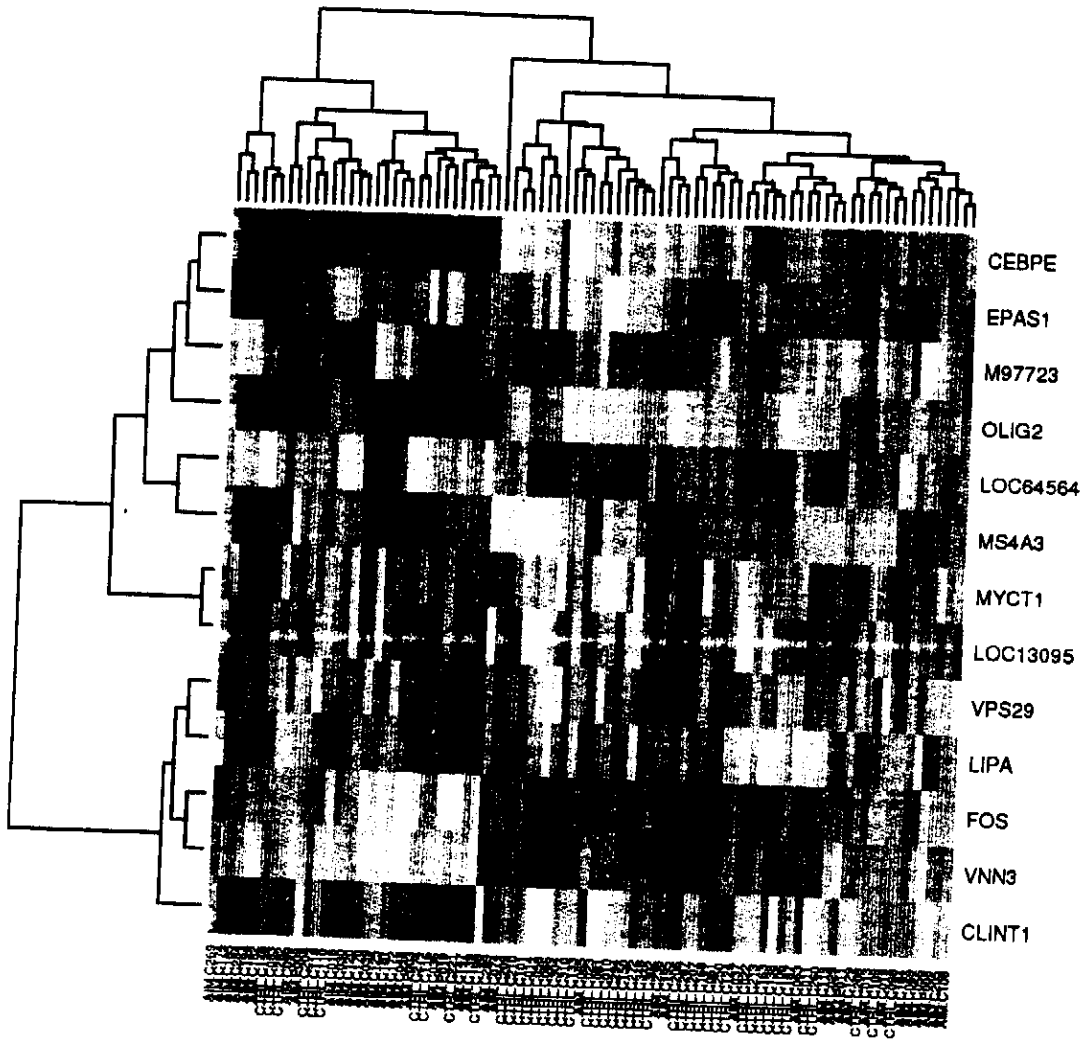
<400> 12
 gaggagcctg aggaagaggg cggcgacggt ggtggtgact gagcggagcc cggtgacagg 60
 atgttggtgt tggattagg agatctgcac atcccacacc ggtgcaacag tttgccagct 120
 aaattcaaaa aactcctggt gccaggaaaa attcagcaca ttctctgcac aggaaacctt 180
 tgcaccaaag agagttatga ctatctcaag actctggctg gtgatgttca tattgtgaga 240
 ggagacttcg atgagaatct gaattatcca gaacagaaaag ttgtgactgt tggacagttc 300
 aaaattggtc tgatccatgg acatcaagtt attccatggg gagatatggc cagcttagcc 360
 ctgttgacaga ggcaatttga tgtggacatt cttatctcgg gacacacaca caaatttgaa 420
 gcatttgagc atgaaaataa attctacatt aatccagggt ctgccactgg ggcataataat 480
 gccttggaag caaacattat tccatcattt gtgttgatgg atatccaggc ttctacagtg 540
 gtcacctatg tgtatcagct aattggagat gatgtgaaag tagaacgaat cgaatacaaa 600
 aaaccttaa gccaggcctg tcttgatgat ttttggtttt ttttcattgt cctgttgaaa 660
 tcaagtaatt aaacatttaa gagccacaaa attgtatcac ttttataata ttttgagta 720
 aaatataata ccatcttctc tgtaataca taattgctcc aagcttctctg taaactataa 780
 gaatatattt agtttacagt atatggattc tatgaaaaaa tgtccacaac acagtaattg 840
 gtcacttggt aagaaaaatt tacccttgta agtatcttca aagttgatat ttggaacttt 900
 attccaaaag tagtgcattg ggagaaagaa tctagacttt cttgtataca tttttctctt 960
 ctccagtaat aaacaattac ctttcattta tactttgata acctgtattt aatttaaaaa 1020
 aaaacataaa aatgaggaac caagtgaac tacggatata aatattaaag tggacgagat 1080
 gacctttca 1089

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

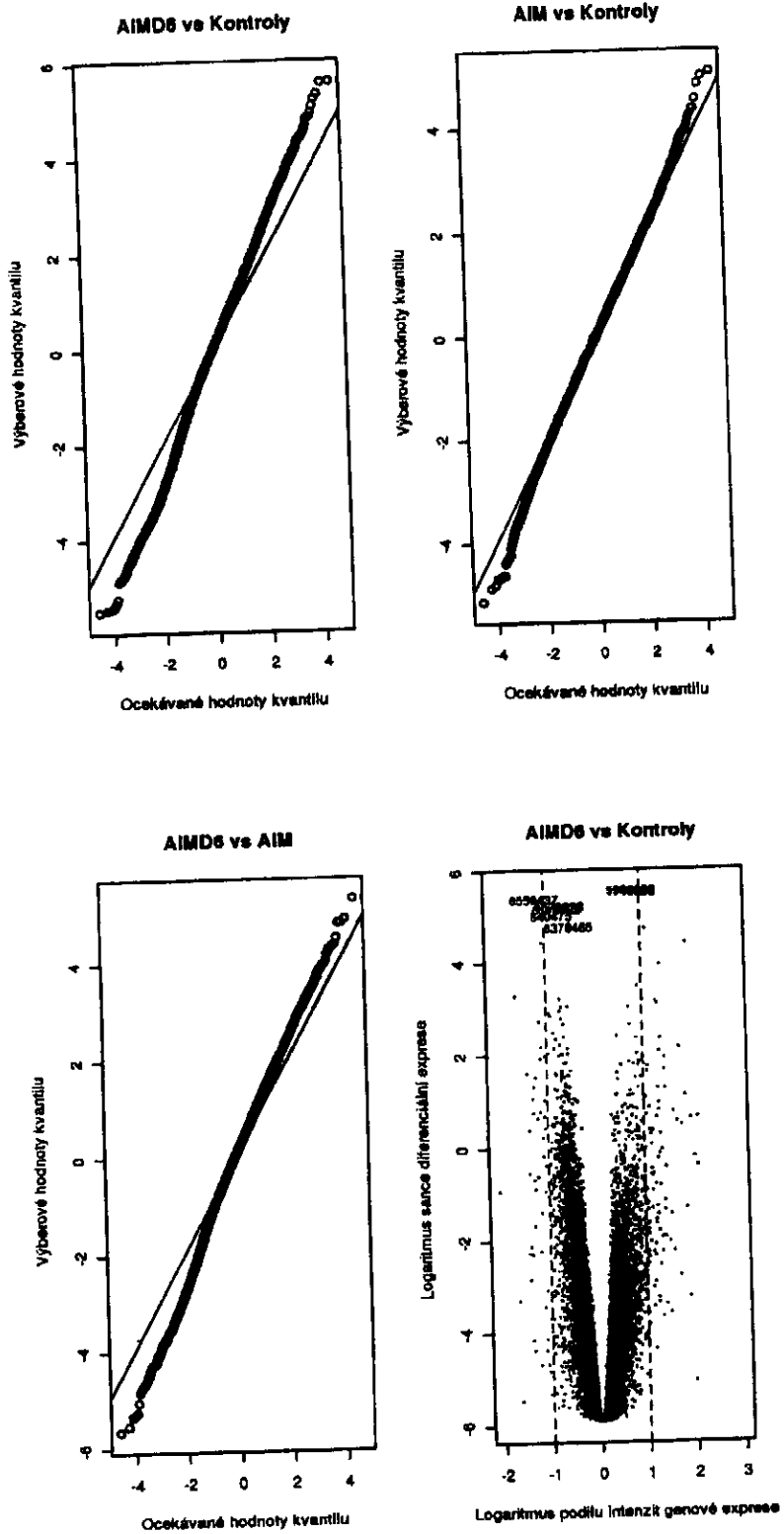
<400> 13
 gggcctggag cttctccgc ggggccccca ggcccagagg ccgggctgct gatccgccag 60
 gcacggtgta aagaatatcc agctggtggc tacagttccc cctctggttt tgctgccatg 120
 catcctgggc gaactactgg taaaggcccc tctactcaca ctcagattga ccagcaacct 180
 ccacggcttc tcattgtgca cattgctcta ccgtcctggg ctgacatctg caccaacctc 240
 tgtgaggctc tgcagaactt cttctctcta gctgcagct tgatggccc cagccgcatg 300
 tccctgttca gtttatacat ggtacaagat cagcatgagt gcatectccc tttgtgcaa 360
 gtgaaagggg actttgctag gttgcagacc tgcattctag aactccgcat gttacagaga 420
 gaaggggtgt tcagatcaca aggtgcttct ctgaggctgg cagtagagga tgggctccag 480
 caattcaaac aatacagcag acatgtgacc acaagggcag ctctgacctt tacctcctg 540

gagattacta ttctgacttc tcagcctgga aaagaggtgg tcaaacagtt ggaggaaggg	600
ttgaaagata cagacctagc cagagtcagg aggtttcagg tcggtgaggt cacaaagggg	660
atcctagagc acgtggactc agcgtctcct gttgaggata ccagcaatga tgagagttct	720
attctgggaa ctgacattga ccttcagact atagacaatg atatcgtcag catggagatt	780
ttcttcaaag cctggctaca taacagtgga acagaccaag acaaatcca tcttcttctt	840
tcttcacagt gtttcagcaa catttcaga cccagagata atccaatgtg tctgaaatgt	900
gatctccaag agcgactgct ctgccccatcc ctactcgctg gcacagctga cggctccttg	960
agaatggatg accctaaagg agacttcac acactctacc agatggcttc ccagtcacgc	1020
gcctctcatt acaagctcca agtgatcaag gctttaaata ctagcgggct ctgagagtca	1080
ttgacatatg gactcccgtt cctcctcaga cctacaagct gttggcagct ggactgggat	1140
gagctggaga caaatcagca acatttccat gctttgtgtc acagcctgct gaaaagggaa	1200
tggctgctgt tagccaaggg ggaaccaccg ggcccaggac acagccagag aattcctgcc	1260
agcaccttct atgtgatcat gccgtcacac tccctcacac tgctggtaaa ggcggtggcc	1320
acgcgggaac tgatgctgcc cagcaccttc cccctgctac ctgaggacc acatgatgat	1380
agccttaaga atgtggagag catgctggac agcctggagc tggagccac ctacaacccc	1440
ttgcatgttc aaagccacct gtactcacac ctgagcagca tctatgcaa gcctcagggg	1500
cggctccacc cacactggga gagccgagct ccgagaaagc atccctgcaa gactgggcag	1560
ttgagacca accgagctcg agctactgtg gccccctgc ctatgactcc tgtcccaggc	1620
agagcctcca agatgccagc agccagcaaa tcttcctcag atgccttctt cctgccttca	1680
gagtgggaga aggatccctc aaggccctaa gtcaccagca ccagagccca gctgcccagc	1740
ttaaccatat ccatgctcag gttcacataa tggctatctg tggtcagact tgctctctat	1800
ccgcctgagc ctctgtgagt gagggctgac tgggaaacaa cagccttctt gtcctgtttc	1860
agtgtgttcc cactcctcaa gtctggaagc gacacaccg agcctgtcct tctccagca	1920
aggactttca ttttcttttag aatcatttgc tactgtttac acaggtgaag attaaacacc	1980
cagtaagctt ctaccattgt taggagcatt cataactcag aatttcttct thtagctctg	2040
tgtaagcagg tggatgaggt cagatcacct ttggtaaact ggacctcagg aacaaggatg	2100
aggttttgaa agctcataaa agacaagtaa gattgaaatc caagcctcat ttcagagcct	2160
gtgcccctcc cactacacca ccaggcttca gcctccaaag agacaagtgc ttggtaccta	2220
catgcaaagt gtgtgtgctg ggggggtggga gggctgccc gaacagggga gaggatggtg	2280
taaaaaaaga cctactcctt tctgttacc ctctccccac atgtaccaac ctctctgttg	2340
ctccctccat ccacagaata atagctacca ttataaaat gtttactctg ggctgggagc	2400
agtggctcac acctgtaatc ccaacacttt gagaggctga ggtgggatga tcaactgagg	2460
ccaggagttc gagaccagcc tgagcaacac tgtgagacc ccccgccatc tctacataaa	2520
taataaaaac ttttaaaaaa acaaaaaaaa aaaaaaaa	2558

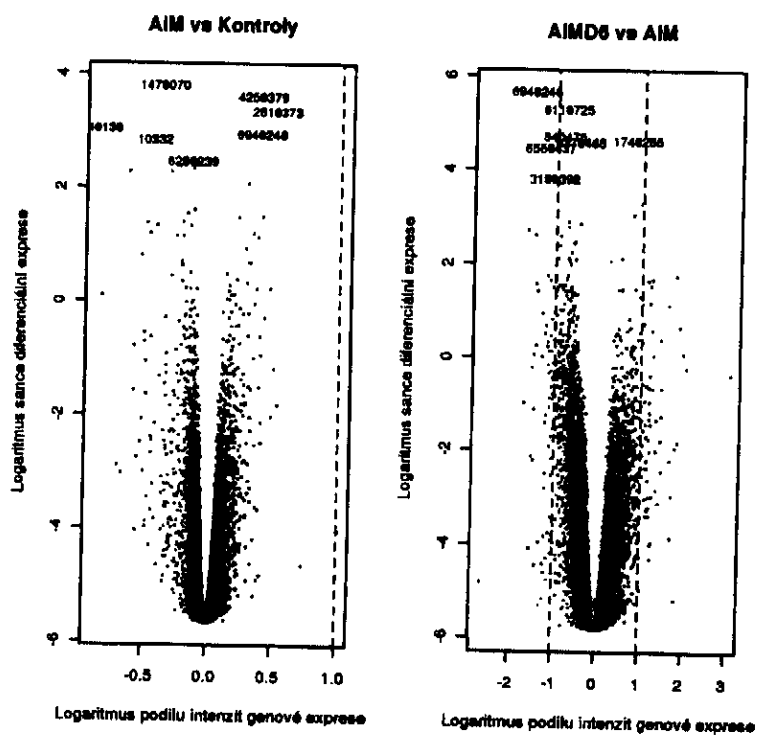
Obr. 1



Obr.2



Obr. 2 - pokračování



Konec dokumentu