

# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-577**  
(22) Přihlášeno: **14.02.2011**  
(40) Zveřejněno: **22.08.2012**  
(**Věstník č. 34/2012**)  
(47) Uděleno: **09.08.2012**  
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **19.09.2012**  
(**Věstník č. 38/2012**)

(11) Číslo dokumentu:

## 303 458

(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 patentu:

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 úmrtí po infarktu  
myokardu**

(57) Anotace:

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

CZ 303458 B6

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

### Oblast techniky

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

### Dosavadní stav techniky

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

Identifikace genů pomocí molekulárně biologických metod znamenala v posledních letech výrazný posun nejen v odhalení příčin některých závažných, život ohrožujících, onemocnění člověka (např. některé onkologické diagnózy, závažné dědičné poruchy metabolismu člověka či další poruchy neuromuskulárního, gastrointestinálního a oběhového systému, včetně aterosklerózy atd.), ale v neposlední řadě také významně rozšířila naše znalosti o vzniku a rozvoji akutního infarktu myokardu (AIM) (Yukihiro Hojo, Uich Ikeda, Yun Zhu, Motoi Okada, Shuichi Ueno, Hiroshi Arakawa, Hideyuki Fujikawa, Taka-aki Katsuki, and Kazuyuki Shimada, Expression of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *J Am. Coll Cardiol*, 35(4): 968 až 973, March 2000; Merry L. Lindsey, NMP Induction and Inhibition in Myocardial Infarction. *Heart Failure Reviews*, 9(1):7 až 19, January 2004). Detailnějším pochopením jednotlivých stádií IM se dostávají do popředí i otázky možnosti prevence a účinnější léčby onemocnění. S rozvojem moderních technologií se molekulárně biologický výzkum obecně posouvá od klasického modelu odhalování konkrétních genetických lokusů, resp. genetických polymorfismů, působících poruchu jednoho genu ke snaze monitorovat polygenní a multifaktoriální poruchy člověka pomocí genomických a expresních čipů, jejichž analýza v současnosti poskytuje komplexnější obraz onemocnění (Joseph S. Verducci, Vincent F. Melfi, Shili Lin, Zailong Wang, Sashwati Roy, and Chandan K. Sen. Microarray analysis of gene expression: considerations in data mining and statistical treatment. *Physiological Genomics*, 25(3):355 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 stádiu 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).

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 vznika- jícím zánětlivým procesům v cévách (Gemma Satterthwaite, Sheila E. Francis, Kim Suvarna, Stephen Blakemore, Chantelle Ward, Don Wallace, Martin Braddock, and David Crossman. Differential gene expression in coronary arteries from patients presenting with ischemic heart disease: further evidence for the inflammatory basis of atherosclerosis. *American heart journal*,

150(3):488 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; 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. Ginsberg, 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):1–2, October 2008; Daphne, Maroeska M. Rovers, Diederick E. Grobbee, Joannes J. Marx, Jill Waalen, Cristina Ellervik, Børge G. Nordestgaard, John K. Olynyk, Peter R. Mills, James Shepherd, Bernard Grandchamp, Jolanda M. Boer, Calogero Caruso, Marcello Arca, Beta J. Meyer, and Yvonne T. van der Schopuw. 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).

Nárůst četnosti vědeckých prací v roce 2009, zabývajících se akutním infarktem myokardu, ukazuje nejen narůstající zájem o toto problematiku, ale také závažnost studovaného tématu (Kahraman Tanriverdi and Jane E. Freedman. Blood and Cardiovascular Disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 1(1):7 až 9, October 2008). Také další vědecké práce hledají v poslední době příčinné vztahy mezi projevy některých genů a vznikem akutního infarktu myokardu (AIM). To, že se jedná o komplexní proces, zahrnující celou řadu genů či pouze jejich částí (polymorfni místa), je všeobecně známo. Jsou popsány polymorfismy ve struktuře endoteliálního růstového faktoru, diskriminující pacienty s AIM, u nichž se vyvinulo srdeční selhání (Panagiotis Douvaras, Dionisios G. Antonatos, Kiriaki Kekou, Sotirios Patsillinakos, 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).

Je popsán vliv akutní koronární okluze na uvolňování arteriálního natriuretického peptidu, který působí na vasodilataci, natriurézu a zánětlivou odpověď, čímž zvyšuje rozsah infarktu myokardu a mortalitu (Aiilyan K. Houg, Rachel A. McNamee, Attila Kerner, Pallawi Sharma, Almois Mohamad, Jonathan Tronolone, and Guy L. Reed. Atrial natriuretic peptide increases inflammation, infarct size, and mortality after experimental coronary occlusion. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 296(3):H655 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).

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 Bnciani B. Nader, Aline Mendes, rose Kanishiro, Paulo Tucci, Antonio Carlos C. Lopes, Jose Carlos Costa C. Baptista–Silva, Ana Paula Cleto P. Marolla, Leonardo Pinto P. de Carvalho, Priscila Martins Andrade M.

Denapoli, and Maria Aparecida da Silva A. Pinhal. Long-term effects for acute phase myocardial infarct VEGF165 gene transfer cardiac extracellular matrix remodeling. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 27(1):22 až 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):1269 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., Glekler 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., Koning I. R., Erdmann J., *et al.*: Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease, *Nat Genet*, 2009, DOI:10.1038/ng.314) či na sekrečním materiálu osob s chronickou ischemií (Józefa Dabek, Aleksander Owczarek, Zbigniew Gasior, Rafal Ulczok, Mariusz Skowerski, Adnzej Kulach, Urszula Mazurek, and Andrzej Bochenek. Oligonucleotide microarray analysis of genes regulating apoptosis in chronically ischemic and postinfarction myocardium. *Biochemical genetics*, 45(5 až 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. Ginsburg, and Pascal J. Goldschmidt-Clermont. Gene Expression Analysis of Cardiovascular Diseases: Novel Insights Into Biology and CLinical Applications. *J. Am Coll Cardiol*, 48(2):227 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-Densite 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., Bjornsdittir, U.S., Halapi E., *et al.*: Sequence variants affecting eosinophil numbes associate with asthma and myo cardial 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 diferencální diagnostikou, funkčními testy, resp. statimovým měřením základních biochemických markerů pro AIM. Toto užívané schéma diagnostiky je používáno (u pacienta při první události) bez jakékoliv možnosti monitorovat (predikovat) celkový stav organismu v období před AIM. Přesnějším charakterizováním základního expresního profilu pacienta přežívajícího i nepřežívajícího akutní stadium infarktu myokardu a jeho porovnáním s vybranými osobami kontrolního souboru české populace, se otevírá do budoucna reálná možnost průběžného, ekonomicky dostupného sledování osob přežívajících infarkt myokardu (období do 3 až 6 měsíců po první a další události).

Pokusy o expresní analýzu a průběžné monitorování nejrůznějších, především ale nádorových, onemocnění člověka byly již učiněny. Jsou dnes připravovány nejrůznější selektivní expresní sady genů, které charakterizují nejen aktuální stav organismu, ale také mohou monitorovat úspěšnost a adekvátnost léčby (David T. Miller, Paul M. Ridker, Peter Libby, and David J. Kwiatkowski. Atherosclerosis: The Path From Genomics to Therapeutics. *J Am Coll Cardiol*, 49(15):1589 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 Gasior, Rafal Ulczok, Mariusz Skowerski, Adnrezej Kulach, Urszula Mazurek, and Andrzej Bochenek. Oligonucleotide microarray analysis of genes regulationg 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 Vitto, 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.

V posledních letech celosvětově vzrůstající prevalence kardiovaskulárních chorob člověka motivuje stále intenzivněji vědeckou veřejnost k hledání nových strategií diagnostiky a léčby (James A. Wingrove, Susan E. Daniels, Amy J. Sehnert, Whittemore Tingley, Michal 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 perihperal 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, Russel 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 Julier 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 například 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 insight from genome-wide association studies. *Deutsches Arztlblatt international*, 107(40): 694 až 699, October 2010).

Výsledky rozsáhlé GWAS studie (Myocardial Infarction Genetics Consortium, Sekar Kathiresan, Benjamin F. Voight, Shaun Purcell, Kiran Musunuru *et al.* Genome-wide association of early-Onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics*, 41(3): 334 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 kardiovaskulárních příčin zemřeli v průběhu 6–měsíčního sledování po primární srdeční příhodě, dále též gen MRPS6T (mitochondriální ribozomální protein), jehož varianty MRPL9, MRPL39, MRPL48, MRPL48, MRPS33 a MRPS30 byly statisticky významné také v našich datech, nikoliv však klinicky a neprosadily se do množin genů s prediktivními vlastnostmi. Nejsou proto uváděny v našich konečných výsledcích. Varianty WDR57, WDR61 a WDR75 genu WDR12 identifikovaného v této publikaci byly podobně statisticky, nikoliv však klinicky významné v našich datech. Naopak geny CDKN2A, CDKN2B identifikované v souvislosti s incidencí akutního infarktu myokardu ve výše zmíněné publikaci a dále např. v publikaci autorů Anna Helgadóttir, Gudmar Thorleifsson, Andrei Manolescu, Solveig Gretarsdóttir, Thorarinn Blöndal, Aslaug Jonasdóttir, Adalbjörg Jonasdóttir, Asgeir Sigurdsson, Adam Baker, Arnar Pallson, Gisli Masson, Daniel F. Gudbjartsson, Kristinn P. Magnusson, Karl Andersen, Allan I. Levey, Valgerdur M. Backman, Sigurborg Matthíasdóttir, Thorbjörg Jónsdóttir, Stefan Pálsson, Helga Einarsdóttir, Steinunn Gunnarsdóttir, Arnaldur Gylfason, Viola Vaccarino, W. Craig Hooper, Muredach P. Reilly, Christopher B. Granger, Harland Austin, Daniel J. Rader, Svati H. Shah, Arshed A. Quyyumi, Jeffrey R. Gulcher, Guðmundur Þorgeirsson, Unnur Þorsteinsdóttir, 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 až 1493, June 2007, Nebyly v našich datech v souvislosti s výskytem akutního infarktu myokardu zjištěny.
- Recentní publikace z roku 2010 naznačují stoupající zájem o aplikaci moderních metod pro studium kardiovaskulárního systému člověka, mezi něž se zařazuje i technologie celogenomové expresní analýzy. Tato technologie umožňuje získání informace o okamžité odpovědi organismu na akutní stádia závažných, život ohrožujících, onemocnění, jakými jsou např. mrtvice či infarkt myokardu. Dovoluje nám současně i nový pohled na desetiletí známý proces. Využitím mononukleárních buněk periferní krve jako zkoumaného materiálu se naskytá reálná možnost získat expresní profily ze snadno a rutinně dostupného biologického materiálu a z těchto profilů poté vytipovat ty signifikantní hladiny genové exprese, které by mohly charakterizovat určitá stádia onemocnění. Takto získaná data se dají v budoucnu použít jako základ pro zlepšení diagnostického komfortu pacienta. Ze studií publikovaných na konci roku 2009 a v průběhu roku 2010 lze zmínit práce, zabývající se úlohou hladin HDL a LDL frakcí cholesterolu či celkového cholesterolu ve vztahu ke genetické predispozici kardiovaskulárních chorob (Anna C. Calkin and Peter Tontonoz. Genome-Wide Association Studie 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, Soni Sharma, Shaoqi Rao, Kalil G. Abdullah, Kenneth G. Mackinlay, Robert C. Elston, Qiuyun Chen, Eric J. Topol, and Qing Kenneth K. Wang. A genome-wide linkage scan identifies multiple quantitative trait loci for HDL-cholesterol levels in families with premature CAD and MI. *Journal of lipid research*, 51(6):1442 až 1451, June 2010), nebo práce snažící se predikovat významné geny exprimující se v akutním stádiu mrtvice (Boryana Stamova, Huichun Yu, Glen Jickling, Chryl 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 a 2177, October 2010).
- Několik prací se v roce 2010 zabývalo hledáním genetických příčin či nejrůznějších nových biomarkerů ventrikulární fibrilace, která bývá pozorována v akutním stádiu infarktu myokardu a může mít vliv na přežití pacienta (Connie R. Bezzina, Raha Pazoki, Abdennasser Bardai, Roos F. Marsman, Jonas S. de Jong, Marieke T. Blom, Brendon P. Scicluna, J. Wouter Jukema, Navin R. Bindraban, Peter Lichtner, Arne Pfeufer, Nanette H. Bishopric, Dan M. Roden, Thomas Meitinger, Summet S. Chugh, Robert J. Myerburg, Xavier Jouven, Stefan Käbb, Lukas R. Dekker, Hanno L. Tan, Michael W. Tanck, and Arthur A. Wilde. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus and 21q21 for ventricular fibrillation in acute myocardial infarction. *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 alpha expression in post-myocardial infarction left ventricular remodeling. *Circulation research*, 106(3):601 až 610, February 2010 Yvan Devaux,

Francisco Azuaje, Mélanie Vausort, Céline Yvorra, and Daniel R. Wagner. Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarker after myocardial infarction. *Functional & integrative genomics*, 10(3): 329 až 337, August 2010).

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

20 Studován byl rovněž vliv microRNA-modul, 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 (Emanuella 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 dislipidémii a riziku vzniku infarktu myokardu (Bernard Keavney. The interleukin-1 cluster, Cyslipidaemia and risk of myocardial infarction. *BMC medicine*, 8(1):6+,

25 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, Fervuary 2009; Tetsuo Fujimaki *et al.* Association of genetic variants in SEMA3F, CLEC16A, LAMA3, and PCSK2 with myocardial infarction in Japanese individual. *Atherosclerosis*, 210 (2): 468 až 473, June 2010). Jsou studovány i další typy genetických variací (SNP-single nucleotide polymorphisms a CNV-copy number variantions) 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 nuclatide polymorphisms and copy number variant. *Nature genetics*, 41(3):334 až 341, March 2009).

30

35

40

V neposlední řadě je nutné zmínit také práce zabývající se infarktem myokardu na experimentálním zvířeti (Jessica M. Berthiaume *et al.* The myocardial contractile response to physiologicl stress improves with high saturated fat feeding in heart failure. *American journal of*

45 *physiology. Heart and circulatory physiology*, 299(2), Augusts 2010; Dongshend Hong, Xioawei 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, Fungjun Jia, Mei Huang, Xiaoyan Xie, Robert C. Robbins, Sanjiv S. Gambhi, 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, Williams E. Kraus, Simon G. Gregory, Elizabeth R. Hauser, and Neil J. Freedman. Aging-related atherosclerosis id exacerbated by arterial expression of tumor necrosis factor receptor-1: evidence from

50

55

mouse models and human association studies *Human Molecular Genetics*, 19(14): 2754 až 2766, July 2010; Lars Bochmann, Padmini Sarathchandra, Federica Mori, Enriquer 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 či genetického lokusu vybraného ze skupiny zahrnující TCRA, LOC650751, LOC-650761, 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 úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací do 6 měsíců od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu.

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

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

Postup stanovení míry genetického rizika spočívá v tom, že se změří genové exprese v biologickém vzorku a její logaritmovaná hodnota při základu 2 se srovná s referenční hodnotou intenzity exprese uvedenou pro jednotlivé geny a genetické lokusy. V posledním sloupci tabulky je pro každý gen/lokus uvedena minimální odchylka od referenční hodnoty exprese, značící zvýšené riziko. Je třeba mít na paměti, že vypovídací hodnotu má sada jako celek, nikoliv jednotlivé geny/lokusy, a tedy pro naplnění kritéria zvýšeného genetického rizika je nutné, aby se u sledovaného pacienta hodnoty genové exprese lišily od hodnot referenčních alespoň o požadovanou hodnotu u všech genů/lokusů v sadě.

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

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



Expresí 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 ribonukleázové ochrany (Ribonuclease Protection Assay) či na úrovni exprese translatovaných proteinů metodou western blot, ELISA (enzymová imunoanalýza, enzyme-linked immunosorbent assay), využitím GFP (zelený fluorescenční protein, green fluorescent protein), průtokovou cytometrií či imunohistologicky.

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

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

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

#### Přehled obrázků na výkresech

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

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

#### Seznam sekvencí

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

Příklady provedení vynálezu

5      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.*

10      Sběr vzorků plné kver do *RNAlater<sup>(R)</sup>* (kat. č. AM7024, Ambion, Applie Biosystems) byl prováděn tak, že vzorek nesrážlivé plné krve (2,4 ml) byl nejpozději do 15 min od odběru smíchán s *RNAlater<sup>(R)</sup> Tissue Collection: RNA Stabilization Solution* (7,6 ml). Vzorek byl řádně promíchán a poté přesunut do mrazicího boxu -70 °C k dlouhodobému skladování. Izolace RNA pomocí kitu *RiboPure<sup>TM</sup> – Blood*, Ambion Inc. (kat. č. AM1928, Ambion, Applied Biosystems)

15      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 připravit najednou. Pro izolaci RNA bylo pipetováno 1,8 ml vzorku krve s *RNAlater<sup>(R)</sup>* do 2ml zkumavky bez RNase. Vzorek krve v roztoku *RNAlater<sup>(R)</sup>* byl centrifugován na 16 100 g (13 200 rpm) 1 min. Supernatant byl odstraněn včetně bílé fáze těsně nad teletem. 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

20      500 µl kyselého fenol:chloroformu. Směs byla promíchána 30 s na vortexu a ponechána stát 5 min při laboratorní teplotě. Směs byla centrifugována na 16 100 g 1 min. Celá vodná fáze, které bylo kolem 1,2 ml, byla přenesena do nové 2ml zkumavky bez RNase, znovu centrifugována a vodná fáze bez jakékoli pelety odebrána do čisté zkumavky bez RNase. Bylo přidáno 600 µl

25      100% etanolu a promícháno na vortexu.

700 µl vzorku byl přeneseno na dodanou kolonku umístěnou v kolekční zkumavce a 5 až 10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a znovu do nich byly nanесeny kolonky. Do kolonek bylo nanесeno dalších 700 µl a poté zbytky vzorku a vždy 5 až

30      10 s centrifugováno na 16 100 g. Kolekční zkumavky byly vyprázdněny a znovu do nich byly vsazeny kolonky. Do kolonek bylo 2x nanесeno 700 µl promývacího roztoku 2/3 (láhve 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 nanесeno 50 µl elučního roztoku (předehřátého na 75 °C). 20 s ponecháno stát při laboratorní teplotě a 20 až

35      30 s centrifugováno na maximum. Při druhé eluci dalšími 50 µl elučního roztoku centrifugováno 1 min.

40      K RNA ve 100 µl elučního pufru bylo přidáno 5µl DNase pufru a 1 µl DNase I a ponecháno 30 min inkubovat při 37 °C. K RNA po odstranění DNA bylo přidáno 20 µl DNase inaktivační reagentie. Směs byla jemně promíchána na vortexu a ponechána 2 min stát při laboratorní teplotě. Během této doby byla směs dvakrát promíchána.

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

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

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

K cca 110  $\mu$ l vzorku RNA izolované pomocí *RiboPure<sup>TM</sup> Blood Kit*, Ambion z plné krve s *RNAlater<sup>®</sup>* bylo přidáno 11  $\mu$ l octanu sodného (*RiboPure<sup>TM</sup>*), případně 0,35  $\mu$ l *GlycoBlue* (AM9616, Ambion, Applied Biosystems) a 300  $\mu$ l 100% ethanolu, vše bylo řádně promícháno. Vzorky byly uskladněny na 1 h v mrazicím boxu při teplotě  $-20$   $^{\circ}$ C. Pak byly centrifugovány při 16 100 g 30 min, 4  $^{\circ}$ C, a supernatant byl opatrně odstraněn. Bylo přidáno 0,7 ml ledového 70% ethanolu, vzorek vortexován, centrifugován 10 min při 4  $^{\circ}$ C a supernatant opatrně odstraněn. Peleta byla rozpuštěna ve 14  $\mu$ l vody bez nukleáz (v 15  $\mu$ l pokud chceme v tomto kroku měřit koncentraci na Nanodropu).

10 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.

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

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

25 Streptavidinové magnetické kuličky (30  $\mu$ l/vzorek): do inkubátoru (50  $^{\circ}$ C) byly vloženy zkumavky s 2x hybridizačním pufrem a pufrem pro streptavidinové kuličky minimálně na 15 min, před použitím řádně vortexovány. 6x 30  $\mu$ l (180  $\mu$ l) homogenizovaných streptavidinových magnetických kuliček bylo pipetováno do čisté 1,5 ml zkumavky, centrifugováno cca 2 s na méně než 1000 g a zkumavka byla umístěna do magnetického stojánu na dobu 3 až 5 minut (dokud není roztok průsvitný). Supernatant byl opatrně odstraněn a přidáno 6x 30  $\mu$ l (180  $\mu$ l) pufru pro streptavidinové kuličky předehřátého na 50  $^{\circ}$ C, řádně vortexováno a ponecháno inkubovat po dobu nejméně 15 min při 50  $^{\circ}$ C před dalším použitím. Ke vzorkům RNA ve 14  $\mu$ l (1 až 10  $\mu$ g) byl přidán 1  $\mu$ l *Capture Oligo Mix*. Ke směsi bylo přidáno 15  $\mu$ l 2x hybridizačního pufru předehřátého na 50  $^{\circ}$ C. Vzorky byly krátce vortexovány a rychle centrifugovány při max. 1000 g a ponechány inkubovat při 50  $^{\circ}$ C po dobu 15 minut (dojde k hybridizaci s globinovou mRNA).

35 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  $\mu$ l připravených streptavidinových magnetických kuliček, směsi řádně promíchány vortexováním, stočeny cca 2 s na 1000 g a ponechány inkubovat 30 min při teplotě 50  $^{\circ}$ C. Po vyjmutí z inkubátoru jemně vortexovány, centrifugovány cca 2 s na max. 1000 g a zkumavky umístěny do magnetického stojánu na 3 až 5 min (dokud není roztok průsvitný). Supernatanty obsahující celkovou RNA bez globinové mRNA opatrně odstraněny a přeneseny do čistých 1,5 ml zkumavek.

45 Byl předehřát eluční pufr na 58  $^{\circ}$ C. Ke každému RNA vzorku bylo přidáno 100  $\mu$ l RNA vazebného pufru. Kuličky resuspendující směs řádně homogenizovány vortexováním a následně přidáno 20  $\mu$ l směsi ke každému vzorku. Směs 10 s řádně vortexována, aby došlo k navázání RNA na kuličky, centrifugovány cca 2 s na 1000 g. Zkumavky byly umístěny do magnetického stojánu na 3 až 5 min (dokud není roztok průsvitný). Opatrně byly odstraněny veškeré supernatanty. Zkumavky byly vyjmuty z magnetického stojánu. Až poté bylo ke každému vzorku přidáno 200  $\mu$ l RNA promývacího roztoku, řádně 10 s vortexováno, krátce a jemně stočeno (viz výše). Zkumavky se vzorky umístěny do magnetického stojánu na 3 až 5 minut než došlo k usazení magnetických kuliček s navázanou RNA, opatrně byl odstraněn veškerý supernatant a zkumavky vyjmuty ze stojánu. Zkumavky krátce a jemně stočeny, umístěny zpět do magnetického stojánu a malou špičkou byla odstraněna veškerá kapalina. Zkumavky se vzorky vyndány z magnetického stojánu a otevřené nechány 5 min na vzduchu oschnout. Ke každému vzorku

přidáno 30 µl elučního pufru předehřátého na 58 °C, řádně 10 s vortexováno a směs inkubována 5 minut 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.

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

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<sup>(R)</sup> Total Prep RNA Amplification Kit*, Ambion (kat. č. IL1791). Systém biotinem označí amplifikovanou RNA k hybridizaci na čípech. Protokol se skládá z reversní transkripce s využitím oligo(dT) primeru pro syntézu cDNA obsahující T7 promotorovou sekvenci. K získané cDNA je syntetizován druhý řetězec při využití DNA polymerázy a RNasy H. Přečištěný cDNA produkt vstupuje do in-vitro transkripce s T7 RNA polymerázou. Výsledná cRNA je následně přečištěna od neinkorporovaných nukleotidů, solí, enzymů a anorganického fosfátu. Vstupní množství RNA, které jsme využívali pro amplifikaci, bylo 150 ng v maximálně 11 µl. Pro jednotlivé kroky byl využit *DNA EngineDyad Peltier Thermal Cycler*, Bio-Rad Laboratories.

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 nukleáz. Při laboratorní teplotě byl připraven master mix pro reversní transkripci – syntézu jednořetězcové DNA:

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

Master mix byl jemně vortexován a krátce centrifugován (5a). Bylo přidáno 9 µl 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).

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

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

Master mix byl jemně vortexován a krátce stočen (5s). Bylo přidáno 80 µl 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 cykleru na 16 °C. Reakce byly inkubovány 2 h při 16 °C, poté 4 °C.

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

Ke vzorkům cDNA bylo přidáno 250 µl 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. Každou kolonku bylo aplikováno 500 µl promývacího pufru centrifugováno 1 min 10 000 g a eluát byl zlikvidován. Vzorky na kolonkách byly opětovně 1 min centrifugovány 10 000 g (odstranění veškerého promývacího pufru). Kolonky s cDNA byly přendány do elučních zkumavek. Na střed kolonek bylo nanášeno 10 µl vody bez nukleáz 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 přehřáté vody bez nukleáz – 9 µl, centrifugováno 2 min 10 000 g.

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

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

Master mix byl jemně vortexován a krátce stočen (5s). Bylo přidáno 7,5 µl 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 µl vody bez nukleáz ke každému vzorku cRNA a důkladně, ale jemně, vortexovány.

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

#### Zkumavky

s kolonkami byly centrifugovány další 1 min 10 000 g (odstranění veškerého promývacího pufru) a kolonky poté byly umístěny do nových sběrných zkumavek. Na střed kolonky bylo nanášeno 100 µl vody bez nukleáz 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  $\mu$ l). Pokud byla nižší než 150 ng/ $\mu$ l 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 CH<sub>3</sub>COONa, pH 5,2, *RiboPure*<sup>TM</sup> (10  $\mu$ l) a 2,5 násobek objemu 100% etanolu (275  $\mu$ l), důkladně promícháno a ponecháno 60 min v mrazicím boxu při -20 °C. Vzorky byly centrifugovány na 16 100 g po dobu 30 až 60 min při 4 °C a opatrně byl odstraněn supernatant. Pelety byly promyty 500  $\mu$ l 70% etanolu, zkumavky centrifugovány na 16 100 g po dobu 15 min při 4 °C, supernatant opatrně odstraněn, případně byly znovu rychle centrifugovány a odstraněny i zbytky etanolu. Pelety cRNA byly ponechány cca 2 min na vzduchu, aby oschly. Poté byly suspendovány v požadovaném objemu vody bez nukleáz ( $\geq$  12  $\mu$ l).

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

Pokud byla finální koncentrace cRNA  $\geq$  1500 ng/ $\mu$ l a profil v pořádku, byly vzorky použity pro hybridizaci na *Human WG6-v2 Expression BeadChip* firmy Illumina.

Byla předehřátá 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  $\mu$ g. Maximální možný objem je 10  $\mu$ l, případně vzorky na tento objem byly doplněny vodou bez nukleáz 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  $\mu$ g a cRNA v 10  $\mu$ l vody bez nukleáz bylo přidáno 20  $\mu$ l *GEX-HYB*, byly jemně vortexovány a rychle centrifugovány.

*Illumina Hyb Chamber Basket* byl umístěn do *BeadChip Hyb Chamber*. Bylo pipetováno 200  $\mu$ l *GEX-HCB* do každého ze dvou reservoárů pro zvlhčující pufr v každé *HybChamber*. 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 pufru. Čipy byly pinzetou drženy za krycí fólii v oblasti barkódu, vloženy do *Hyb Chamber Insert* tak, aby jejich směr souhlasil se symbolem barkódu na *Insertu*.

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

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

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

Z hybridizační pece byla vyndána *Hyb Chamber* a rozebrána. Čipy byly ponořeny do 250 ml promývacího roztoku E1BC a byla z nich opatrně oddělena krycí fólie. Rozebrání a umístění v E1BC promývacím roztoku bylo opakováno pro všechny aktuálně zpracovávané čipy. Čipy byly následně umístěny do držáku, který byl za rukojet' 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 promývacího roztoku E1BC v čisté barvicí nádobě. Ihned po 10min inkubaci s vysokoteplotním promývacím pufrům byl držák s čipy přesunut do připraveného čerstvého promývacího roztoku E1BC. Držák krátce a intenzivně v nádobě protřepán pohybem nahoru a dolů, poté na 5 min umístěn na rotační třepačku na maximální rychlost, při které nedocházelo k vyšpláchnutí roztoku z nádoby (120 rpm). Přemístěn do čisté barvicí nádoby s 250 ml 100% etanolu. Krátce a důsledně pomocí rukojetí držáku byly čipy proprány a poté 10 min třepány na orbitální třepačce při maximální rychlosti. Čipy byly přemístěny do čisté barvicí nádoby s 250 ml promývacího roztoku E1BC, krátce a intenzivně promíchány a třepány na orbitální třepačce po dobu 2 min. Čipy byly přemístěny do připravených *Wash Tray* se 4 ml blokovacího pufru E1, dány na výkyvnou desku (analyzovaná plocha se vzorky musí vždy směřovat nahoru) a kývány na střední rychlost po dobu 10 min. Čipy byly přendány do čisté *Wash Tray* se 2 ml blokovacího pufru E1 + streptavidin-Cy3, přikryty víkem a kývány na střední rychlost dalších 10 min. Čipy byly přesunuty do připravené čisté barvicí nádoby s 250 ml promývacího roztoku E1BC, krátce proprány a poté 5 min roztečně třepány při laboratorní teplotě. Čipy v držáku byly přesunuty do centrifugy s rotorem na mikrodestičky a točeny při laboratorní teplotě n 270 rcf po dobu 4 min. Usušené čipy byl ihned skenovány pomocí *illumina<sup>®</sup> BeadArray Readeru* na skenování faktoru 1,0 a 1,5 a získaná data jsou uchovávána na DVD a webovém úložišti dat.

## Příklad 2: Statistické vyhodnocení expresního profilu

Předkládaný vynález je doložen výsledky, které jsou obdrženy na základě celogenomové analýzy vzorků periferní krve získaných od jedinců hospitalizovaných v letech 2006 až 2009 a Městské nemocnici Čáslav či kardiologické klinice v Pardubicích s diagnózou primárního akutního infarktu myokardu a párových kontrolních osob hospitalizovaných v Městské nemocnici v Čáslavi ve stejném období z důvodu komplikací pohybového ústrojí. Věk případů byl omezen hranicí 80 let. Párové kontrolní osoby nesměly mít pozitivní historii výskytu závažných kardiovaskulárních onemocnění a byly k odpovídajícím případům vybírány tak, aby docházelo k podstatné shodě v rizikových faktorech výskytu akutního infarktu myokardu. Zejména byla požadována shoda v pohlaví, věku (kontroly mohly být o maximálně 5 let starší než případy) a shodný musel být též status diabetu mellitu a kuřácký status. Vzorky byly analyzovány pomocí technologie firmy Illumina, přičemž byly použity čipy verze 2 (*Human WG6-v2 Expression BeadChip*).

Ke genetickému vyšetření pacientů s akutním infarktem myokardu byly zařazovány osoby, které byly přijaty či ambulantně ošetřeny s diagnosou akutního infarktu myokardu (AIM) na příjmové ambulanci Interního oddělení MN Čáslav. Do souboru byli rovněž zařazováni pacienti, kteří byli vezeno 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<sup>®</sup>*, jejich uskladnění a transport krevních vzorků byly prováděny dle pracovních protokolů v souladu s platnými právními předpisy a veškerá data ke vzorkům jsou uložena v příslušných databázích.

Akutní infarkt myokardu byl diagnostikován na základě anamnestických údajů, EKG křivky laboratorního průkazu nekrosy myokardu. Byl definován jako bolest na hrudi nebo její ekvivalent trvající alespoň 10 min v posledních 24-ti hodinách s elevací úseku ST na EKG křivce (STEMI) či bez elevací ST (NONSTEMI). Biologický průkaz nekrózy byl stanovován v naší laboratoři vyšetřením Troponinu I. Jako pozitivní hodnotu Troponinu I bylo považováno překročení horního limitu normální hodnoty v čáslavské laboratoři, tj. 0,3 µl/l. Jako pomocná diagnostická metoda byla používána echokardiografie k průkazu regionální poruchy kinetiky levé

5 komory v povodí „infarktové tepny“. Jako standardní panel vyšetření pacientů s podezřením na AIM byl vyšetřován Troponin I okamžitě při přijetí a dále ve 4 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.

10 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 A(IMD6, 4 osoby) a na osoby, které přežily dále (AIM, 41 osob), párové kontroly čítaly dalších 45 osob. Tabulka 1 ukazuje vybraná data osob v analyzovaném souboru a základní data ke zpracovaným vzorkům.



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

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

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

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

5 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 od 45 kontrolních pacientech. V datovém souboru bylo 60 mužů a 30 žen. Ve skupině AIM bylo 13 žen a 28 mužů, ve skupině AIMD6 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 10 diagnózou a 31 bez ní.

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

| Proměnná                   |          | Počty a procentuální údaje ve skupinách |           |           |
|----------------------------|----------|---|-----------|-----------|
|                            |          | AIM                                     | AIMD6     | Kontroly  |
| Pohlaví                    | Muži     | 28 (68 %)                               | 2 (50 %)  | 30 (67 %) |
|                            | Ženy     | 13 (32 %)                               | 2 (50 %)  | 15 (33 %) |
| Kouření                    | Kuřáci   | 10 (24 %)                               | 0 (0 %)   | 10 (22 %) |
|                            | Nekuřáci | 31 (76 %)                               | 4 (100 %) | 35 (78 %) |
| Diabetes mellitus II. typu | ANO      | 12 (29 %)                               | 2 (50 %)  | 14 (31 %) |
|                            | NE       | 29 (71 %)                               | 2 (50 %)  | 31 (69 %) |

Tabulka 3: Popisné charakteristiky spojitých veličin

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

Vzorky venózní krve odebrané od pacientů byly zpracovávány postupem podle Příkladu 1. Data genové exprese byla analyzována pomocí lineárních modelů pro analýzu dat z microarray experimentů „limma“ (Smyth, G. K.: Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments, 2004, *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3, No. 1, Article 3, doi:10.2202/1544 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). Párový statistický design byl zvolen s cílem snížit počty odhadovaných parametrů, které by jinak bylo nutné zohlednit jako možné zavádějící faktory (pohlaví, věk, výskyt kouření a diabetu mellitu) a dále odlišit klinickou a genetickou komponentu komplexního rizika výskytu akutní srdeční příhody. Síla statistických testů je navíc v párovém designu v porovnání s dvou- a vícevýběrovými plány statistických studií typicky vyšší.

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

45

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

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

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

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

#### Popis výsledků

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

V Tabulce 4 je uvedena prediktivní množina genů identifikovaná v rámci vynálezu, která se u pacientů s výskytem akutního infarktu myokardu jeví z hlediska genové exprese jako prognostická ve smyslu zvýšeného rizika úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací, a to v krátkodobém časovém horizontu (tj. do 6 měsíců od okamžiku výskytu srdeční příhody). Jedná se o sestavu 10 genů (gen CLYBL byl identifikován ve dvou transkriptech, Illumina ID 3180392 a 6550437), jejichž expresní intenzity, stanovené do čtyřia dvaceti hodin od okamžiku primárního výskytu akutní srdeční události, se ve skupinách pacientů zemřelých v období 6 měsíců po srdeční příhodě (AIMD6) a skupině pacientů přežívající výskyt srdeční události po dobu sledování 6 měsíců (AIM) statisticky i klinicky významně odlišovaly. Tato množina exprimovaných genů charakterizuje zvýšenou stresovou zátěž organismu, která měla za následek úmrtí pacienta v průběhu šestiměsíčního sledování od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu v důsledku kardiovaskulárních komplikací.

55

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

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

| Illumina ID | Název / Lokus genu | RefSeq_ID   | Průměrná exprese | $\log_2FC$ | q-hodnota | Pravděpod. Diff. Expr. |
|-------------|--------------------|-------------|------------------|------------|-----------|------------------------|
| 4730669     | ADORA3             | NM_020683.5 | 6,33             | 1,78       | 0,0490    | 0,852                  |
| 6940246     | (M97723)           | M97723      | 7,05             | -1,52      | 0,0130    | 0,997                  |
| 1690309     | ERLIN1             | NM_006459.2 | 6,79             | 1,19       | 0,0490    | 0,823                  |
| 3180392     | CLYBL              | NM_206808.1 | 6,79             | -1,08      | 0,0234    | 0,978                  |
| 5490634     | TCEA3              | NM_003196.1 | 7,09             | -1,66      | 0,0381    | 0,938                  |
| 6760670     | (BC070337)         | BC070337    | 10,81            | -1,42      | 0,0490    | 0,805                  |
| 6550437     | CLYBL              | NM_206808.1 | 6,53             | -1,18      | 0,0130    | 0,988                  |
| 3130019     | HSD17B8            | NM_014234.3 | 7,30             | -1,06      | 0,0490    | 0,818                  |
| 1230333     | FLT3               | NM_004119.1 | 6,04             | 1,14       | 0,0490    | 0,838                  |
| 5090368     | AXIN2              | NM_004655.2 | 7,09             | -1,49      | 0,0388    | 0,932                  |
| 670041      | (CR596519)         | CR596519    | 11,51            | -1,45      | 0,0490    | 0,828                  |

Illumina ID ... Illumina identifikátor genu

RefSeq\_ID ... NCBI Reference Sequence ID ("Accession number")

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

$\log_2FC$  ... 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 prognostické množiny genů pro kontrast AIMD6 vs AIM

| Illumina ID | Sekvence sondy  | Definice  |
|-------------|---|---|
| 4730669     | GTAGTCAGAGGAGCTAT<br>GATAGACCACACCCAA<br>GCAAGGCTGCCCTCAA     | Lidský receptor adenosinu A3, transkripční varianta 1 (Homo sapiens adenosine A3 receptor ( <b>ADORA3</b> ), transcript variant 1), mRNA.   |
| 6940246     | GTACCGTCAGCAACCTG<br>GACAGAGCCTGACACTG<br>ATCGCAACTGCAAATC    | Lidský T-buněčný receptor (Human T-cell receptor (V beta 4.1-variant, J beta 2.1, C beta 2)), mRNA.   |
| 1690309     | TGTTGCCCAAAGTGAT<br>GGCCCTGGAGGCGGGG<br>CTGAGGAACAGGGAAA<br>T | Lidský ER lipidový nosič 1 (Homo sapiens ER lipid raft associated 1 ( <b>ERLIN1</b> )), mRNA.   |
| 3180392     | AGGGTATTGAAGCTGCA<br>GAGGGATCAACTTGTGC<br>TTGCCAGAGGACGCCA    | Lidská beta-podobná citrátová lyáza (Homo sapiens citrate lyase beta like ( <b>CLYBL</b> )), mRNA.  |
| 5490634     | ACCAGGTGCAGACACG<br>CAGTGCTGATGAGCCCA<br>TGACTACCTTTGTCTTA    | Lidský transkripční prodlužovací faktor A, 3 (Homo sapiens transcription elongation factor A ( <b>SII</b> ), 3 ( <b>TCEA3</b> )), mRNA.     |
| 6760670     | AGTAAACCCATATATCC<br>AGAACCCTGACCCTGCC<br>GTGTACCAGCTGAGAG    | Lidský T-buněčný receptor, alfa lokus (Homo sapiens T cell receptor alpha locus), mRNA (cDNA clone MGC:88342 IMAGE:30352166), complete cds. |
| 6550437     | TCGACATGCCATTACTG<br>AAGCAGGCCCAAGAACA<br>CTGTTACGCTTGCCACC   | Lidská beta-podobná citrátová lyáza (Homo sapiens citrate lyase beta like ( <b>CLYBL</b> )), mRNA.  |
| 3130019     | CCGATGGGACACTTGGG<br>GGACCCTGAGGATGTGG<br>CAGATGTGGTTCGCATT   | Lidská hydroxysteroidní (17-bty) dehydrogenáza 8 (Homo sapiens hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 8 ( <b>HSD17B8</b> )), mRNA.          |
| 1230333     | GGATTTGGGGCTACTCT<br>CTCCGCAGGCTCAGGTC<br>GAAGATTTCGTAGAGGA   | Lidská fms-příbuzná tyrosinová kináza 3 (Homo sapiens fms-related tyrosine kinase 3 ( <b>FLT3</b> )), mRNA.                                 |
| 5090368     | ACAGTACCTGTACCTGC<br>ACGGTCACCCGCTCCGT<br>GTGTCGCCCTATATTG    | Lidský axin 2 (Homo sapiens axin 2 (conductin, axil) ( <b>AXIN2</b> )), mRNA.   |
| 670041      | AAACCCGTCACCCAGAT<br>CGTCAGCGCCGAGGCCT<br>GGGGTAGAGCAGGTGA    | Lidský cDNA klon placentálního lůžka (full-length cDNA clone CS0D1056YK21 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)).           |

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

| Illumina ID | Název / Lokus Genu | Průměrná Exprese |                    |
|-------------|--------------------|------------------|--------------------|
|             |                    | AIMD6            | AIM <sup>(*)</sup> |
| 4730669     | ADORA3             | 7,66             | 6,30               |
| 6940246     | (M97723)           | 6,13             | 7,26               |
| 1690309     | ERLIN1             | 7,89             | 6,81               |
| 3180392     | CLYBL              | 5,93             | 6,84               |
| 5490634     | TCEA3              | 5,97             | 7,08               |
| 6760670     | (BC070337)         | 9,74             | 10,87              |
| 6550437     | CLYBL              | 5,75             | 6,55               |
| 3130019     | HSD17B8            | 6,49             | 7,31               |
| 1230333     | FLT3               | 6,77             | 5,99               |
| 5090368     | AXIN2              | 6,33             | 7,15               |
| 670041      | (CR596519)         | 10,72            | 11,57              |

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

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

Výsledky bootstrap studie pro ověření prediktivních vlastností vybraných genových sekvencí

- 25 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 téměř rozsahu. Výsledky studie jsou uvedeny v Tabulce 7.

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

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

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



## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob identifikace osob se zvýšeným genetickým rizikem úmrtí v důsledku kardiovaskulárních komplikací do 6 měsíců od okamžiku výskytu akutního infarktu myokardu, **v y z n a ě n ý t í m**, že se v biologickém vzorku odebraném z těla pacienta, do 24 hodin od výskytu akutního infarktu myokardu, stanoví intenzita exprese sady genů a genetických lokusů.

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

a jejich 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.

10

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.

15

3. Oligonukleotidový čip pro identifikaci osob se zvýšeným genetickým rizikem 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. |
|--------------------|------------|
| ADORA3             | 1          |
| (M97723)           | 2          |
| ERLIN1             | 3          |
| CLYBL              | 4          |
| TCEA3              | 5          |
| (BC070337)         | 6          |
| CLYBL              | 4          |
| HSD17B8            | 7          |
| FLT3               | 8          |
| AXIN2              | 9          |
| (CR596519)         | 10         |

14 stránek sekvencí

+

3 výkresy

20

sequence listing divisional 2.ST25  
SEQUENCE LISTING

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

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

<130> P2

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2161

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atctttgctg caaaggctgg gtatcggtcg tgctcagcaa agcgtcaact cgtgcaagaa      60
cttagcagga atagttctgg ctaaggttag gaggctgcca ccaaagtctc ttttttgttc     120
ctctgcttct cccgtttgcc tccttatcat gagatctttt tgctaagctg gcagaaagat     180
tgcatagtca gtgcttccag ctctgctccc acctgatcct gcactgtcct ctggtccctg     240
aatgaatgaa ctctgatacc caatcttgtc tcgagccttc tctatgccac tcatggctcc     300
tcttctgctc tttccatctt tttgctgaga gttctgagct ctgtacttcc tcttggccca     360
tctcacttcc tgaaacaccc ctgaagaggg ttgcttatct tgatggaact caaaaagcca     420
aaaagctgca ggcagaggcg ttgaggacat ctgtttgggg aactaagagc agcagcactt     480
tcagattcag tccatataga gctgtcctac agcattctgg aaacttgagg atgtgcggtg     540
cataaagggg ctggaagtga cccacctgtg atgagccctt tctaaggaga agggtttcca     600
agagatcacc ccaccagaaa agggtaggaa tgagcaagtt ggaatttta gactgtcact     660
gcacatggac ctctgggaag acgtctggcg agagctaggg ccactggccc tacagacgga     720
tcttgctggc tcacctgtcc ctgtggaggt tcccctggga aggcaagatg cccaacaaca     780
gcactgctct gtcattggcc aatgttacct acatcaccat ggaaattttc attggactct     840
gcgccatagt gggcaacgtg ctggtcatct gcgtgggtcaa gctgaacccc agcctgcaga     900
ccaccacctt ctatttcatt gtctctctag ccctggctga cattgctgtt ggggtgctgg     960
tcatgccttt ggccattggt gtcagcctgg gcatcacaat ccaettctac agctgccttt    1020
ttatgacttg cctactgctt atctttaccc acgcctccat catgtccttg ctggccatcg    1080
ctgtggaccg atacttgcgg gtcaagctta ccgtcagatt cagaattcct gggtccctg     1140
gggtcattct atcattccag ttgaaagttt gtttccttcc agtcatgtgg ctcttcattc     1200
tactctcctt ggctctcatt tcagatgcc a tggtcatgga tgaaaaggtc aagagaagct     1260
ttgtgctgga cacggcttct gccatctgca actacaatgc cactacaag aatcacccca     1320
aatactggtg ccgaggctat ttccgtgact actgcaacat catcgcttc tcccctaaca     1380
gcaccaatca tgtggccctg agggacacag ggaaccagct cattgtcact atgtcctgcc     1440

```

sequence listing divisional 2.ST25

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

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

|            |            |             |            |            |            |     |
|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| <400> 2    |            |             |            |            |            |     |
| gaaggaaaga | tgaacttgag | tttcaacttct | tagtgccttt | tctcagggga | gaggccatca | 60  |
| cttgaagatg | ctgagtcttc | tgctccttct  | cctgggacta | ggctctgtgt | tcagtgctgt | 120 |
| catctctcaa | aagccaagca | gggatatctg  | tcaacgtgga | acctccctga | cgatccagtg | 180 |
| tcaagtcatg | agccaagtca | ccatgatgtt  | ctggtaccgt | cagcaacctg | gacagagcct | 240 |
| gacactgata | gcaactgcaa | atcagggctc  | tgaggccaca | tatgagagtg | gatttgtcat | 300 |
| tgacaagttt | cccacagacc | gccccaacct  | aacattctca | actctgactg | tgagcaacat | 360 |
| gagccctgaa | gacagcagca | tatatctctg  | cagcgttgaa | gatagggaca | gagtctacaa | 420 |
| tgagcagttc | ttcgggccag | ggacacggct  | caccgtgcta | gaggacctga | aaaacgtggt | 480 |
| cccac      |            |             |            |            |            | 485 |

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

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| <400> 3    |            |            |            |            |            |     |
| gatgcgtcac | tgatcggatg | ggcgcggccg | aggggtcggc | tttctctcgc | agcctgcggc | 60  |
| tgggcttctt | ctcagttagt | gccttcacc  | cgggagcgac | ccttgggaga | gggagtttca | 120 |
| ggaagctcac | cgagcagggg | cggcccactg | gcctccgggg | gcggaggagt | tggcaagggg | 180 |
| tcagcgggct | cagccagaag | ggaagaatga | ggggacaggg | gtactggact | ccccggctca | 240 |
| gcctgcgaga | gagcgccaag | tttccggagg | gagagggtag | aaactggagg | gggtggacct | 300 |

sequence listing divisional 2.ST25

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

sequence listing divisional 2.ST25

```

tacaggaagt ttttattttt aaaactggat ctgggggtata ttcatttgcc ccatcacctc 2400
tgtctaaagg cccaagtccct agggctgcca tggtcacaag cacactgatg ctccctaaga 2460
ttgtttatct ggagcccaca tagtgtggaa caaaaagtca cctagaaagc atccttggtc 2520
atcattgtct ccttcccacc tggcccagag atgcttraaat ccaagttgtt tctccagctg 2580
tcacctccc caggagatca ggattccact gacgtcctgg gcagccagtg aatttaattt 2640
tccatgagaa acaacagagt taacctgtgg cattaggaga cctacttcat gtggaccctt 2700
ttttccctc agtttaactt ttctggagca gtgtgctgcg tagttcggcc tgagtttggt 2760
cagcttgta agacaactct tgtgtacgct atgttgaagc tcaacaaaaa agtcatggga 2820
ccacttctag aaatctttca gctgtcaggc ctgtcagtct catgacagtt tgttggttgt 2880
gccaaact ttatttggga aaggaaagcc cagattttaa tgggtctttc ccctgggcct 2940
tacctatag aggcatttgt aatatggaga aaataattt tcatttttgc tcatttaatt 3000
ctataaatc tctttataaa tgaattttgt gttctttagt tctccttaa agaacttttg 3060
aattataaaa ataaaatctt tacctgtcga attgttgcg cagatgattg ttgtggaaaa 3120
tctggatcat tgacctctgt gctttcattc ctagagatgt tttatagtta catgagcaaa 3180
agctgttgcc ccaaagtgat ggccctggag gcggggctga ggaacagggg aatgccgctg 3240
tgaagtctta aagcacttct gcttaaactc ccatgtgtga ggagtgtgcc tccctgtgcc 3300
ctctcagctc tgaggctggc cgtctttcgg ggtgttctt ttggcaaata tacactgtaa 3360
tcttgagtct aaatttatat gttgaaatgc tacctttttt aaaataagaa actaaataaa 3420
attattttac tatcagtga aaaaaaaaaa 3450

```

```

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

```

```

<400> 4
aggcaaaagg cggggcgcgc gcgtcgggaa gatggcgccta cgtctgctgc ggagggcggc 60
gcgcggagct gcggcggcgg cgctgctgag gctgaaagcg tctctagcag ctgatatccc 120
cagacttggg tatagttcct catcccatca caagtacatc ccccgagggg cagtgcctta 180
tgtacctgga aatgatgaaa agaaaataaa gaagattcca tccctgaatg tagattgtgc 240
agtgctcgac tgtgaggatg gagtggctgc aaacaaaaag aatgaagctc gactgagaat 300
tgtaaaaact cttgaagaca ttgatctggg ccctactgaa aaatgtgtga gagtcaactc 360
agtttccagt ggtctggcgg aagaagacct agagaccctt ttgcaatccc gggtccttcc 420
ttccagcctg atgctaccaa aggtggaaag tcttgaagaa atccagtggg ttgcagacaa 480
attttcattc cacttaaaag gccgaaaact tgaacaacca atgaatttaa tcccttttgt 540
ggaaactgca atgggtttgc tcaattttaa ggcagtgtgt gaagaaacct tgaaggctcg 600
gcctcaagta ggtctcttcc tagatgcagt cgtttttgga ggagaagact ttcgagccag 660
cataggtgca acaagtagta aagaaaccct ggatattctc tacgcccggc aaaagattgt 720

```

## sequence listing divisional 2.ST25

|   |      |
|---|------|
| tgtcatagcg aaagcctttg gtctccaagc catagatctg gtgtacattg actttcgaga | 780  |
| tggagctggg ctgcttagac agtcacgaga aggagccgcc atgggcttca ctggtaagca | 840  |
| ggtgattcac cctaaccaaa ttgccgtggt ccaggagcag ttttctcctt cccctgaaaa | 900  |
| aattaagtgg gctgaagaac tgattgctgc ctttaaagaa catcaacaat taggaaaggg | 960  |
| ggcctttact ttccaagggg gtatgatcga catgccatta ctgaagcagg cccagaacac | 1020 |
| tgttacgctt gccacctcca tcaaggaaaa atgatctggt aatgaagct gtcacaggc   | 1080 |
| taaagggat tgaagctgca gagggatcaa cttgtgcttg ccagaggacg ccaatgaagt  | 1140 |
| ttgaaacacc aacaatcaga gattttgttt ctgttctca ttaaactatg agcttttgtg  | 1200 |
| ccgagactct ggacgactgt tccttaagaa attaacagaa tgggaagttt taaactctac | 1260 |
| accaaccttt tcatgacctt cacagcagca acgctgctac tettagacaa acaccgctgg | 1320 |
| gaaggctggt ctgtttattt aaatttgtaa atagaaaaca gttgtttttt actttcattt | 1380 |
| ttcacctcct cctacgccct tttggattat ttctctgctg gcccttagca tgagcccaa  | 1440 |
| ccaggcctcc ccttttcccc acttctctca attcccacag gaagcccag aggtgaggag  | 1500 |
| ctgaggttag acaccaggag aggcaccatc acacaaaagc gcggccgag agtcccaccg  | 1560 |
| ccaccaggcg acccccacc agagagggac agacatgcgg ggagccagca ccgggcaaga  | 1620 |
| tggctctggg gatcctcatt ctgtgaagac accaactcat ttctcaaca caggatccag  | 1680 |
| gagacagata gctcctaaat ggagatggca catgctccgt ggggtccctc atagaggagt | 1740 |
| gccacctcc aactggcca cgctgggctg cccagagcg gccagaaagg aaggtgggag    | 1800 |
| ctagcccat cctcactcag aggccggaag gaggaagatg gcatctcgcc aacttcagag  | 1860 |
| ccgaatggcc tctagccaca ctgcttccag accccagacg gggcagcagc agcagttccc | 1920 |
| agaggagcac ccattgttg agctaggacc caccaaggat gggactcctg gagtcaggtg  | 1980 |
| cacaccaggt aaccaggac cacgctgtg acccccagtc tgcccctctg ctcagaacac   | 2040 |
| agagggatgg gaggatggct tggcagtggg aaggcaaaag aaggcctctc tctctgccc  | 2100 |
| cctgccatac gcaccgctg aggggtgtag aagcagtgga ggcagagctg gccetaagca  | 2160 |
| aaagaagaaa ataaacctca cttgtcctt cctatgggca gccctcacc caatctaact   | 2220 |
| aaccttccca tcctccagcc taatccaaag aagcccttg cttgagggga tgaagggctt  | 2280 |
| gcgttctagt ctccaccca gcccacagc cagccagcca gccagcccca cacagagggg   | 2340 |
| cctcctcaag gcctcactgg gagcctctg tcccagcca aggagcccta cagacctggg   | 2400 |
| gaaaagcagg cccctccgca aggcccctgg gtggtgcgga ggccggaccg gctaggcctc | 2460 |
| ccgctyctgg ccactcccag gccacgggtt cctaggtccc aaccacattg gactgctcgc | 2520 |
| cacgccactg ccctcatccc aaactgcttt gtcaaaaca aaccacctg tttcagctc    | 2580 |
| cccaaagtgc cagttcatta tcttctcat aaccatggt ccttattagg gtaggatcat   | 2640 |
| gagactaaga cctatgagag ccacaaatct ggaccaaagt cccattccct gaacagagac | 2700 |
| ccaaacgacg agggctcccag aagagagttc agtctgatc agaaacccat ggtgccttag | 2760 |

## sequence listing divisional 2.ST25

|            |            |            |             |            |            |      |
|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| tccttgaaga | acaaaactct | aggaagaaga | tgctggaagg  | caaaggggat | tccccctctt | 2820 |
| tccccacccg | cgtctctgtg | gtgccatggg | tgggcccagg  | taccctggga | aaggtgggag | 2880 |
| agcagtcaag | ggtgggtgtg | tgatctccac | tgggctcact  | gggcaccccc | gacacgggga | 2940 |
| agtgagagct | gcccgactcc | tgagccaggc | gtgggtgaca  | ggaagaggac | cttgcagcta | 3000 |
| atctgattca | ttagaaacca | tacctgttta | tgttttgtgt  | agctcatcac | aagccgctta | 3060 |
| gccatatcac | ccccgttatt | aattcttggg | gtctaaatta  | tgggtaacac | tattaaaca  | 3120 |
| ttatcagaac | taatgagaaa | caattactta | gaaaatgagc  | cgggacaaga | ctgagttggg | 3180 |
| aacatcagtg | gtgatcactg | tagattagtt | taataaatca  | tcaggtgcaa | ggcaagactg | 3240 |
| actgtatgta | tgcaaagccc | cgtcacggga | aaatgaaatt  | gagatTTTTT | TTTTTgcat  | 3300 |
| aatTTTTTca | ttaatctcaa | taggaccctg | gtggtgtaga  | ttgctttatt | cccctaatac | 3360 |
| cttgcctgag | gcgggggggg | gggggggtgc | ccaataatgt  | cttcattggt | ttactgaggt | 3420 |
| cttaatgaca | atctgtgaca | acctcatttt | aatgtataga  | ggattatata | aatacagtca | 3480 |
| tgttttattg | aaatggtgaa | gggaactcca | gtcagagtca  | ggcagtgctt | gtgagcacia | 3540 |
| gttaggaagt | ttctcggcat | ccgggagcgt | tcccgtctga  | tgtcccagtg | ttagtcctcc | 3600 |
| cggccgccct | ccccctctct | cctccagggg | cggctgggaa  | aacagtcctg | cgggatgaag | 3660 |
| acttcaccgc | ctccgatttg | aatttgaaag | taactccttc  | cgtggcatat | ttcgtctggc | 3720 |
| agatagaaca | aaccatgtcg | ttttcccccg | tctctaaaat  | agacatatta | ttatcattca | 3780 |
| cacttttgca | cccggctcgt | ttgcgggagt | tcgggaaact  | gactttcttc | attggggaca | 3840 |
| ttgtaatttt | ctgatgatgc | cacgaggaga | aaaaaaatac  | gggtttgttt | taattggaag | 3900 |
| gaccttccgc | ttttatgatt | tcggtttacc | ttggaaaact  | gaatcttctg | tgttttattt | 3960 |
| ctttcctcta | gtactagaaa | agcaatgaat | taattgcaca  | aaacaggttc | tgagacggcc | 4020 |
| cgcaggcccc | gagctcgtgg | acgcggccga | gggtcgggtg  | tgaccgcggg | agccgctgcc | 4080 |
| aggcttccca | gctcgtcttc | gcggggaggc | gggaggcagg  | accagacccc | agcatttcag | 4140 |
| cgtgaaagtc | ttcgcctttc | tttccgcgct | gtctttcccc  | cgggcggagc | ggcgtacctg | 4200 |
| agcgcggtcc | ccacggagga | tcagtgactt | tcccagaccc  | cgcgggcgag | cccgcgcttg | 4260 |
| ggacccggca | gctctgcgcg | ggctggtttt | ggaggggggtg | gtgttcgttt | gtttaaattc | 4320 |
| cagttgttat | ttggcagcat | atcgccttcc | gagtcagtaa  | gaattgccca | cgacgtaaag | 4380 |
| agcgacttgc | aggaaggggg | cgaagccgct | gttagcggcc  | gggcggcggg | ggccactega | 4440 |
| accccgtttc | cgccaagcgc | gctgcaacct | gcggggcgag  | ttcgttttgt | tttgccaaaa | 4500 |
| tcatttgggg | acttctttgt | cattcatgcc | cttcttttta  | aatgattttt | atTTTTTctc | 4560 |
| actgtaagtg | accggctggg | tttgactttt | gcttcttccg  | acggaagggc | accgcgagcc | 4620 |
| ggggtgggcg | gccccgcggg | caggaggagc | gcgggggtaca | cgcggtggcc | gcagacgccc | 4680 |
| agccctgcgg | agccccgagg | cctcgtcgcc | cgcgcccccg  | gtgcgcgcgg | agccggggcc | 4740 |
| gaggccgggc | caggaggagt | gtggcggccc | aggaggcctg  | gactgtgggc | cctgctcgcc | 4800 |

## sequence listing divisional 2.ST25

cgcccgccgc gggccgcccg gagcccgccg gcctgicgcg cagcccggt gtaatggtgg 4860  
 cagatcaaag gcggccccgt gteccccgcg agccccggac aatccccgcg ctttgtgccc 4920  
 tgttgctagg agccccgaaa actaagagaa agtgtcagga gcatgttaat cagactcgtt 4980  
 aactgtaac aataacgtct ctctcgggtc tcccaggccc cagtaccccc gcgcaccctg 5040  
 cgcgcaggcc ggacacctgc gcagggccct tgcgcccgcc ctgggggtccc gccggccctg 5100  
 gggtcctctg agccccgaat ccgcaccgca gccacgcgga acgactagcc ccgaggggccc 5160  
 ccgcaggctc ccggtgcagc tccttggtcg tggctctctt gaccgaagcc ccggcctcac 5220  
 accgcctggc cgcgagcccc agggacgcag ggacgatccc ggtccccctg ttttcagtcc 5280  
 tccagtcgaa tcgcccactt tgttcaatca cagtattcga atcaagagga aaatgaacat 5340  
 tccctttatg gtagcttttt ggttatgagt tttggcaaaa ctgttaaata aactttgccg 5400  
 atttcccttg ggaatccctg gaggccactc taagtggtaa tcccaagttt aagaaggaaa 5460  
 tggggaaatt ttgctgagag taaagatgtc gccgaacttt ttgaagggat ttgcttcatt 5520  
 cattcattta gtcattcaac agacacctgt tgaaccgac tgggtgccag aggggccagt 5580  
 cacaggactt attccagatg aacttttctt ttgaaattag aatgcccttg tggagccaa 5640  
 agggaggagca gaggcctaaa ataatgtcaa gtgtcaaagc aaaaagaagt gccattggct 5700  
 actacagtgt gtgatgataa caagagaggt gcgaattagg aattaaaac gtttgaaaaa 5760  
 ctacaggcca aaaaaaaaaa 5779

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

<400> 5  
 cgcccccgcc gggcgtgtgt gtcgtgtgtg tttggggccc gcgcgggttg cgcgcccctcc 60  
 gccttcgccc ctctgcccc cgaggcccta ctgctgcccc tgtgcccctc gccccgcccg 120  
 gcgtcgcggg ccaacatggg ccaggaagag gagctgctga ggatcgccaa aaagctggag 180  
 aagatggtgg ccaggaagaa cacggaaggg gccctggacc ttctgaagaa gctgcacagc 240  
 tgccagatgt ccatccagct actacagaca accaggattg gagttgctgt taatggggtc 300  
 cgcaagcact gctcagacaa ggaggtggtg tccttgcca aagtccttat caaaaactgg 360  
 aagcggctgc tagactcccc tggacccccca aaaggagaaa aaggagagga aagagaaaag 420  
 gcaaagaaga aggaaaaagg gcttgagtgt tcagactgga agccagaagc aggcctttct 480  
 ccaccaagga aaaaacgaga agaccccaaa accaggagag actctgtgga ctccaagtct 540  
 tctgcctcct cctctccaaa aagaccatcg gtggaaagat caaacagcag caaatcaaaa 600  
 gcggagagcc ccaaacacc tagcagcccc ttgacccccca cgtttgcctc ttccatgtgt 660  
 ctctggccc cctgctatct cacaggggac tctgtccggg acaagtgtgt ggagatgctg 720  
 tcagcagccc tgaaggcgga cgatgattac aaggactatg gagtcaactg tgacaagatg 780



sequence listing divisional 2.ST25

```

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

```

```

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

```

```

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

```

## sequence listing divisional 2.ST25

atgccaccaa ctggatccta cccgaattta tgattaagat tgctgaagag ctgccaaaca 1080  
 ctgctgccac cccctctgtt cccttattgc tgcttgtcac tgctgacat tcacggcaga 1140  
 ggcaaggctg ctgcagcctc ccttggctgt gcacattccc tcctgctccc cagagactgc 1200  
 ctccgccatc ccacagatga tggatcttca gtgggttctc ttgggctcta ggtcccggag 1260  
 aatgttgtga ggggtttatt ttttttaat agtgttcata aagaaagaca tagtattctt 1320  
 cttctcaaga cgtgggggga aattatctca ttatcgaggc cctgctatgc tgtgtgtctg 1380  
 ggcgtgttgt atgtcctgct gccgatgcct tcattaaaat gatttgaag agcgaaaaaa 1440  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 1464

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

<400> 7  
 gggattccca cccaccaca gcccgccatg gcgtctcagc tccagaaccg actccgctcc 60  
 gcactggcct tggtcacagg tgcggggagc ggcacgccc gagcggtcag tgtacgcctg 120  
 gccggagagg gggccaccgt agctgcctgc gacctggacc gggcagcggc acaggagacg 180  
 gtgcggctgc tgggcgggccc agggagcaag gaggggccc cccgagggaa ccatgctgcc 240  
 ttccaggctg acgtgtctga ggccagggcc gccagggtcc tgctggaaca agtgcaggcc 300  
 tgcttttctc gccaccatc tgtcgttctg tcctgtgcgg gcatcaccca ggatgagttt 360  
 ctgctgcaca tgtctgagga tgactgggac aaagtcatag ctgtcaacct caagggcacc 420  
 ttctagtca ctcaggctgc agcacaagcc ctgggtgtcca atggttgtcg tggttccatc 480  
 atcaacatca gtagcatcgt aggaaagggt gggaaactgg ggcagacaaa ctatgcagca 540  
 tccaaggctg gagtgattgg gctgacctag accgcagccc gggagcttgg acgacatggg 600  
 atccgctgta actctgtcct cccaggggtc attgcaacac ccatgacaca gaaagtgcc 660  
 cagaaagtgg tggacaagat tactgaaatg atccccatgg gacacttggg ggaccctgag 720  
 gatgtggcag atgtggctgc attcttggca tctgaagata gtggatacat cacagggacc 780  
 tcagtggaag tcaactggagg tcttttcatg taactgcctc aaggacctg gactctgctc 840  
 accccccac cactctgcct ggccctctgc tgatgaggac tctaagttcc caggatacaa 900  
 aaggggtggc agtgtatggt tcaggaatgc tgaatatggg aagcaggggt gcttgtgacc 960  
 ctaataaatt ccaagtctc ttccctgcc 989

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

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

## sequence listing divisional 2.ST25

|  |      |
|--|------|
| tttgggacta ttacaaatca agatctgcct gtgatcaagt gtgttttaat caatcataag  | 180  |
| aacaatgatt catcagtggg gaagtcacat tcatatccca tggatcaga atccccggaa   | 240  |
| gacctcgggt gtgctgtgag accccagagc tcagggacag tgtacgaagc tgccgctgtg  | 300  |
| gaagtggatg tatctgcttc catcacactg caagtgcctg tcgatgcccc agggaacatt  | 360  |
| tctgtctct gggctcttaa gcacagctcc ctgaattgcc agccacattt tgatttacia   | 420  |
| aacagaggag ttgtttccat ggtcattttg aaaatgacag aaaccaagc tggagaatac   | 480  |
| ctacttttta ttcagagtga agctaccaat tacacaatat tgtttacagt gagtataaga  | 540  |
| aataccctgc tttacacatt aagaagacct tactttagaa aatggaaaa ccaggacgcc   | 600  |
| ctggtctgca tatctgagag cgttccagag ccgatcgtgg aatgggtgct ttgcgattca  | 660  |
| cagggggaaa gctgtaaaga agaaagtcca gctgttgta aaaaggagga aaaagtgctt   | 720  |
| catgaattat ttgggacgga cataaggtgc tgtgccagaa atgaactggg cagggaatgc  | 780  |
| accaggctgt tcacaataga tctaaatcaa actcctcaga ccacattgcc acaattattt  | 840  |
| cttaaagtag gggaaacctt atggataagg tgcaaagctg ttcattgtga ccatggattc  | 900  |
| gggtcacct gggaaattaga aaacaaagca ctgaggagg gcaactactt tgagatgagt   | 960  |
| acctattcaa caaacagaac tatgatacgg attctgtttg cttttgtatc atcagtggca  | 1020 |
| agaaacgaca ccggatacta cacttgttcc tcttcaaagc atcccagtca atcagctttg  | 1080 |
| gttaccatcg taggaaaggg atttataaat gctaccaatt caagtgaaga ttatgaaatt  | 1140 |
| gaccaatatg aagagttttg tttttctgtc aggtttaaag cctaccaca aatcagatgt   | 1200 |
| acgtggacct tctctcgaaa atcatttcct tgtgagcaaa agggctctga taacggatac  | 1260 |
| agcatatcca agttttgcaa tcataagcac cagccaggag aatatatatt ccatgcagaa  | 1320 |
| aatgatgatg cccaatttac caaatgttc acgctgaata taagaaggaa acctcaagtg   | 1380 |
| ctcgcagaag catcggcaag tcagggctcc tgtttctcgg atggataccc attaccatct  | 1440 |
| tggacctgga agaagtgttc agacaagtct cccaactgca cagaagagat cacagaagga  | 1500 |
| gtctggaata gaaaggctaa cagaaaagtg tttggacagt ggggtgctgag cagtactcta | 1560 |
| aacatgagtg aagccataaa agggttcctg gtcaagtgct gtgcatacaa ttcctttggc  | 1620 |
| acatcttggtg agacgatcct tttaaactct ccaggcccc tccctttcat ccaagacaac  | 1680 |
| atctcattct atgcaacaat tgggtgttgt ctctcttca ttgtcgtttt aaccctgcta   | 1740 |
| atgtgtcaca agtacaaaaa gcaaiiaggy iaigaaagcc agctacagat ggtacagggtg | 1800 |
| accggctcct cagataatga gtacttctac gttgatttca gagaatatga atatgatctc  | 1860 |
| aaatgggagt ttccaagaga aaatttagag tttgggaagg tactaggatc aggtgctttt  | 1920 |
| ggaaaagtga tgaacgcaac agcttatgga attagcaaaa caggagtctc aatccaggtt  | 1980 |
| gccgtcaaaa tgctgaaaga aaaagcagac agctctgaaa gagaggcact catgtcagaa  | 2040 |
| ctcaagatga tgaccagct gggagccac gagaatattg tgaacctgct gggggcgtgc    | 2100 |
| acactgtcag gaccaattta cttgattttt gaatactggt gctatggtga tcttctcaac  | 2160 |

## sequence listing divisional 2.ST25

|   |      |
|---|------|
| tatctaagaa gtaaaagaga aaaatttcac aggacttgga cagagatfff caaggaacac | 2220 |
| aatttcagtt tttacccac tttccaatca catccaaatt ccagcatgcc tggttcaaga  | 2280 |
| gaagttcaga tacaccgga ctcggatcaa atctcagggc ttcattggaa ttcatttcac  | 2340 |
| tctgaagatg aaattgaata tgaaaaccaa aaaaggctgg aagaagagga ggacttgaat | 2400 |
| gtgcttacat ttgaagatct tctttgcttt gcatatcaag ttgccaaagg aatggaattt | 2460 |
| ctggaattta agtcgtgtgt tcacagagac ctggccgcca ggaacgtgct tgtcaccac  | 2520 |
| gggaaagtgg tgaagatag tgactttgga ttggctcgag atatcatgag tgattccaac  | 2580 |
| tatgttgca ggggcaatgc ccgtctgcct gtaaaatgga tggcccccga aagcctgttt  | 2640 |
| gaaggcatct acaccattaa gagtgatgtc tggatcatag gaatattact gtgggaaatc | 2700 |
| ttctcacttg gtgtgaatcc ttaccctggc attccggttg atgctaactt ctacaaactg | 2760 |
| attcaaatg gatttaaaat ggatcagcca ttttatgcta cagaagaaat atacattata  | 2820 |
| atgcaatcct gctgggcttt tgactcaagg aaacggccat cttccctaa tttgacttcg  | 2880 |
| tttttaggat gtcagctggc agatgcagaa gaagcgatgt atcagaatgt ggatggccgt | 2940 |
| gtttcggaaat gtcctcacac ctacaaaac aggcgacctt tcagcagaga gatggatttg | 3000 |
| gggctactct ctccgcaggc tcaggtcgaa gattcgtaga ggaacaattt agttttaagg | 3060 |
| acttcattcc tccacctatc cctaacaggc tgtagattac caaaacaaga ttaatttcac | 3120 |
| cactaaaaga aaatctatta tcaactgctg cttcaccaga cttttctcta gaagccgtct | 3180 |
| gcgtttactc ttgttttcaa agggactttt gtaaaatcaa atcatcctgt cacaaggcag | 3240 |
| gaggagctga taatgaactt tattggagca ttgatctgca tccaaggcct tctcaggccg | 3300 |
| gcttgagtga attgtgtacc tgaagtacag tatattcttg taaatacata aaacaaaagc | 3360 |
| atfttgctaa ggagaagcta atatgatttt ttaagtctat gttttaaatt aatatgtaaa | 3420 |
| tttttcagct atttagtgat atattttatg ggtgggaata aaatttctac tacag      | 3475 |

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

|  |     |
|--|-----|
| <400> 9  |     |
| actggctccg cgagcctggc ccgggggagc cggctggagc cggctgcgct ttgataaggt  | 60  |
| cctggcaact cagtaacagc ccgagagccg ggaaataaaa ataaccctc agagcgatgg   | 120 |
| atfttcggggc cgcccggcgg ccgaggcgc cgcgaaggc cctgctgtaa aagagaggag   | 180 |
| gttcagatga gcccctgctg acttgagaga gacagagaga ccacgccgat tgctgagagg  | 240 |
| aactggaaga agaaaaattc ccagactcag tgggaagagc tccctacca tgagtgcgc    | 300 |
| tatgtttggtg acttgccctc cggacccag cagcagcttc cgtgaggatg ccccgcggcc  | 360 |
| cccagtgcc a ggggaagaag gggagacccc accgtgtcag ccaggggtgg gcaagggcca | 420 |
| ggtcaccaa cccatgcctg tctcttcaa caccaggcgg aacgaagatg ggttggggga    | 480 |

sequence listing divisional 2.ST25

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| gccggagggg  | cgggcatctc  | cggatccccc  | tctgaccg    | tggaccaagt  | ccttacactc  | 540  |
| cttattgggc  | gatcaagacg  | gtgcttacct  | gttccgaact  | ttcctggaga  | gggagaaatg  | 600  |
| cgtggatacc  | ttagacttct  | ggtttgccctg | caatggattc  | aggcagatga  | acctgaagga  | 660  |
| tacaaaaact  | ttacgagtag  | ccaaagcgat  | ctacaaaagg  | tacattgaga  | acaacagcat  | 720  |
| tgtctccaag  | cagctgaagc  | ctgccaccaa  | gacctacata  | agagatggca  | tcaagaagca  | 780  |
| gcagattgat  | tccatcatgt  | ttgaccaggc  | gcagaccgag  | atccagtcgg  | tgatggagga  | 840  |
| aaatgcctac  | cagatgtttt  | tgacttctga  | tatatacctc  | gaatatgtga  | ggagtggggg  | 900  |
| agaaaacaca  | gcttacatga  | gtaatggggg  | actcgggagc  | ctaaaggctg  | tgtgtggcta  | 960  |
| tctccccacc  | ttgaatgaag  | aagaggagtg  | gacttgtgcc  | gacttcaagt  | gcaaactttc  | 1020 |
| gccaaccgtg  | gttggcttgt  | ccagcaaaac  | tctgagggcc  | acggcgagtg  | tgagggtccac | 1080 |
| ggaaactggt  | gacagtggat  | acaggctcct  | caagaggagc  | gatcctgtta  | atccttatca  | 1140 |
| cataggttct  | ggctatgtct  | ttgcaccagc  | caccagcgcc  | aacgacagtg  | agatatccag  | 1200 |
| tgatgcgctg  | acggatgatt  | ccatgtccat  | gacggacagc  | agtgtagatg  | gaattcctcc  | 1260 |
| ttatcgtgtg  | ggcagtaaga  | aacagctcca  | gagagaaatg  | catcgcagtg  | tgaaggccaa  | 1320 |
| tggccaagtg  | tctctacctc  | atttcccag   | aaccaccgc   | ctgccaagg   | agatgacccc  | 1380 |
| cgtggaaccc  | gccaccttg   | cagctgagct  | gatctcgagg  | ctggaaaagc  | tgaagctgga  | 1440 |
| gttggagagc  | cgccacagcc  | tggaggagcg  | cctgcagcag  | atccgagagg  | atgaagagag  | 1500 |
| agagggctcc  | gagctcacac  | tcaattcgcg  | ggagggggcg  | cccacgcagc  | acccccctc   | 1560 |
| cctactgccc  | tccggcagct  | acgaggaaga  | cccgcagcag  | atactggacg  | atcacctgtc  | 1620 |
| cagggctctc  | aagaccctg   | gctgccagtc  | tccaggcgta  | ggccgctata  | gcccccgctc  | 1680 |
| ccgctccccg  | gaccaccacc  | accaccacca  | ttcgcagtac  | cactccctgc  | tcccccccg   | 1740 |
| tggcaagctg  | cctccccg    | ccgcctcgcc  | gggcgcctgc  | ccccctctcg  | ggggcaaagg  | 1800 |
| ctttgtgacc  | aagcagacga  | cgaagcatgt  | ccaccaccac  | tacatccacc  | accatgccgt  | 1860 |
| ccccaaagacc | aaggaggaga  | tcgaggcgga  | ggccacgcag  | cggtgcact   | gcttctgccc  | 1920 |
| tgggggcagc  | gagtattact  | gctactcgaa  | atgcaaaagc  | cactccaagg  | ctccggaaac  | 1980 |
| catgcccagc  | gagcagttt   | gcggcagcag  | aggcagtacc  | ttgccc aaac | gcaatgggaa  | 2040 |
| aggcacggag  | ccgggcctgg  | ccctgcccgc  | cagggaaagga | ggggcccccg  | gcggagctgg  | 2100 |
| ggccctgcag  | cttccccggg  | aggaaggaga  | caggtcgcag  | gatgtctggc  | agtggatgct  | 2160 |
| ggagagttag  | cggcagagca  | agccccagcc  | ccatagtgcc  | caaagcacia  | aaaaggccta  | 2220 |
| ccccctggag  | tctgcccgt   | cgtctccagg  | cgaacgagcc  | agccggcacc  | atctgtgggg  | 2280 |
| gggcaacagc  | gggcaccccc  | gcaccacccc  | ccgtgcccac  | ctgttccacc  | aggaccctgc  | 2340 |
| gatgcctccc  | ctgacccccac | ccaacacgct  | ggctcagctg  | gaggaggcct  | gtcgcaggct  | 2400 |
| agctgaggtg  | tcgaagcccc  | caaagcagcg  | gtgctgtgtg  | gccagtcagc  | agagggacag  | 2460 |
| gaatcattcg  | gccactgttc  | agacgggagc  | cacacccttc  | tccaatccaa  | gctgtggctcc | 2520 |

sequence listing divisional 2.ST25

```

agaagatcac aaagagccaa agaaactggc aggtgtccac gcgctccagg ccagtgagtt 2580
ggttgctact tacttttct gtggggaaga aattccatac cggaggatgc tgaaggctca 2640
gagcttgacc ctgggccact ttaaagagca gctcagcaaa aagggaatt ataggtatta 2700
cttcaaaaaa gcaagcgatg agtttgctg tggagcggg tttgaggaga tctgggagga 2760
tgagacggg ctcccgatgt atgaaggccg gattctgggc aaagtggagc ggatcgattg 2820
agccctgggg tctggcttg gtgaactgtt ggagcccgaa gctcttgta actgtcttg 2880
ctgtgagcaa ctgcgacaaa acattttgaa ggaaaattaa accaatgaag aagacaaagt 2940
ctaaggaaga atcggccagt gggccttcgg gagggcgggg ggaggttgat tttcatgatt 3000
catgagctgg gtactgactg agataagaaa agcctgaact atttattaa aacatgacca 3060
ctcttggtta ttgaagatgc tgcctgtatt tgagagactg ccatacataa tatatgactt 3120
cctagggatc tgaatccat aaactaagag aaactgtgta tagcttacct gaacaggaat 3180
ccttactgat atttatagaa cagttgattt ccccatccc cagtttatgg atatgctgct 3240
ttaaacttgg aagggggaga caggaagttt taattgttct gactaaactt aggagttgag 3300
ctaggagtgc gttcatgggt tcttactaa cagaggaatt atgctttgca ctacgtccct 3360
ccaagtgaag acagactgtt ttagacagac ttttaaaat ggtgccctac cattgacaca 3420
tgcagaaatt ggtgcgtttt gttttttttt tctctatgct gctctgtttt gtcttaagg 3480
tcttgagggt tgaccatgtt gcgtcatcat caacattttg ggggttggtg ttgatgggat 3540
gatctgttgc agagggagag gcagggaaacc ctgctcctc gggccccagg ttgatcctgt 3600
gactgaggct cccctcatg tagcctccc aggccaggg ccctgaggcc tgctagaatc 3660
actgccgctg tgctttcgtg gaaatgacag ttcctgttt tttttgttc tgtttttgtt 3720
ttacattagt cattggacca cagccattca ggaactacc cctgccccac aaagaaatga 3780
acagttgtag ggagaccag cagcacctt cctccacaca ccttcatttt gatgttcggg 3840
tttttggtt aagttaatct gtacattctg tttgccattg ttacttgtag tatacatctg 3900
tatatagtgt acggcaaaag agtattaatc cactatctt agtgcttgac tttaaatcag 3960
tacagtacct gtacctgcac ggtcaccgc tccgtgtgc gccctatatt gagggctcaa 4020
gctttccctt gttttttgaa aggggtttat gtataaatat attttatgcc tttttattac 4080
aagtcttgta ctcaatgact tttgtcatga cattttgttc tacttatact gtaaattatg 4140
cattataaag agttcattta aggaaaatta cttggtacaa taattattgt aattaagaga 4200
tgtagccttt attaaaattt tatatttttc aaaaaaaaa a 4241

```

```

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

```

```

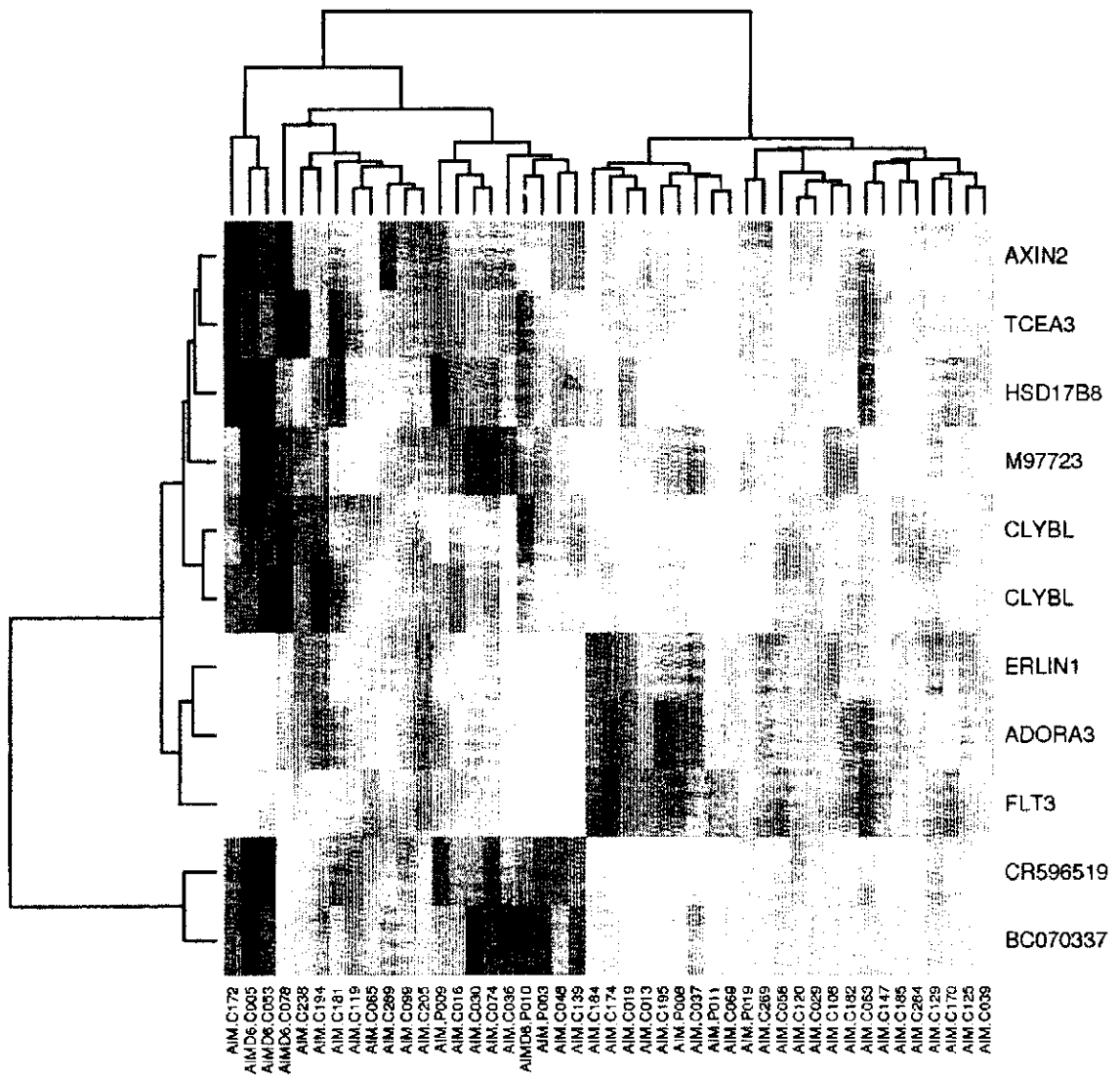
<400> 10
atacgcagta ttttgccca ggcacccggc tgacagtgt cgaggacctg aaaaacgtgt 60
tcccacccga ggtcgtgtg tttgagccat cagaagcaga gatctccac acccaaaagg 120

```

## sequence listing divisional 2.ST25

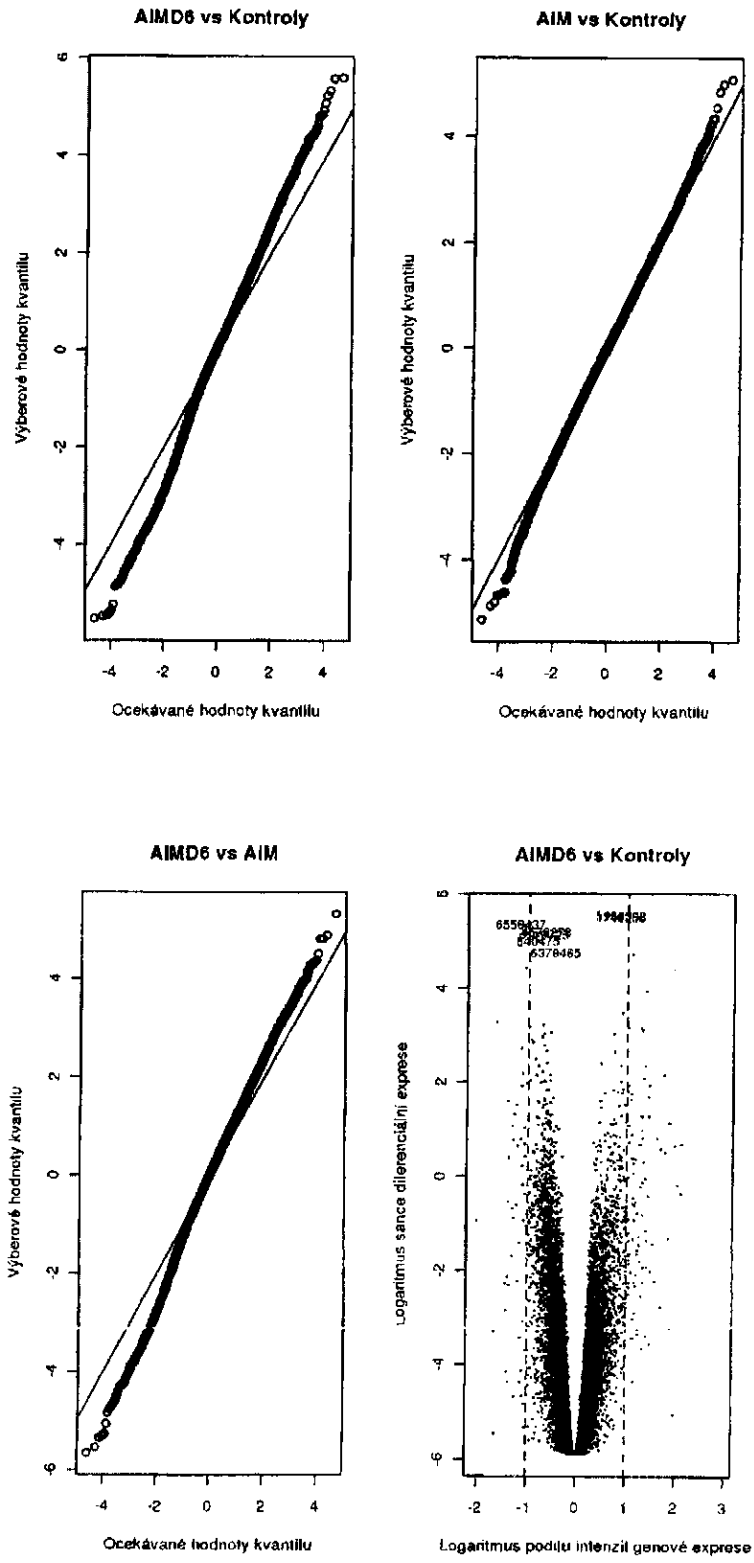
|  |      |
|--|------|
| ccacactggt atgcctggcc acaggcttct accccgacca cgtggagctg agctggtggg  | 180  |
| tgaatgggaa ggaggtgcac agtgggggtca gcacagacce gcagcccctc aaggagcagc | 240  |
| ccgccctcaa tgactccaga tactgcctga gcagccgcct gagggctctg gccaccttct  | 300  |
| ggcagaacce ccgcaaccac ttccgctgtc aagtccagtt ctacgggctc tcggagaatg  | 360  |
| acgagtggac ccaggatagg gccaaacccg tcacccagat cgtcagcgcg gaggcctggg  | 420  |
| gtagagcagg tgagtggggc ctggggagat gcctggagga gattaggtga gaccagctac  | 480  |
| cagggaaaat ggaaagatcc aggtagcggg caagactaga tccagaagaa agccagagtg  | 540  |
| gacaaggtgg gatgatcaag gttcacaggg tcagcaaagc acgggtgtgca cttccccac  | 600  |
| caagaagcat agaggctgaa tggagcacct caagctcatt cttccttcag atcctgacac  | 660  |
| cttagagcta agctttcaag tctccctgag gaccagccat acagctcagc atctgagtgg  | 720  |
| tgtgcatccc attctcttct ggggtcctgg tttcctaaga tcatagtac cacttcgctg   | 780  |
| gcactggagc agcatgaggg agacagaacc agggctatca aaggaggctg actttgtact  | 840  |
| atctgatatg catgtgtttg tggcctgtga gtctgtgatg taaggctcaa tgccttaca   | 900  |
| aagcagcatt ctctcatcca ttttcttcc cctgttttct ttcagactgt ggcttcacct   | 960  |
| ccgagtctta ccagcaaggg gtccctgtctg ccaccatcct ctatgagatc ttgctagga  | 1020 |
| agggcacctt gtatgccgtg ctggtcagtg cctcgtgct gatggccatg gtcaagagaa   | 1080 |
| aggattccag aggctagctc caaaaccatc ccaggtcatt cttcatcctc acccaggatt  | 1140 |
| ctcctgtacc tgctcccaat ctgtgttctt aaaagtgatt ctcaactctg ttctcatctc  | 1200 |
| ctacttacat gaatacttct ctctttttc tgtttccctg aagattgagc tcccaacccc   | 1260 |
| caagtacgaa ataggctaaa ccaa   | 1284 |

Obr. 1

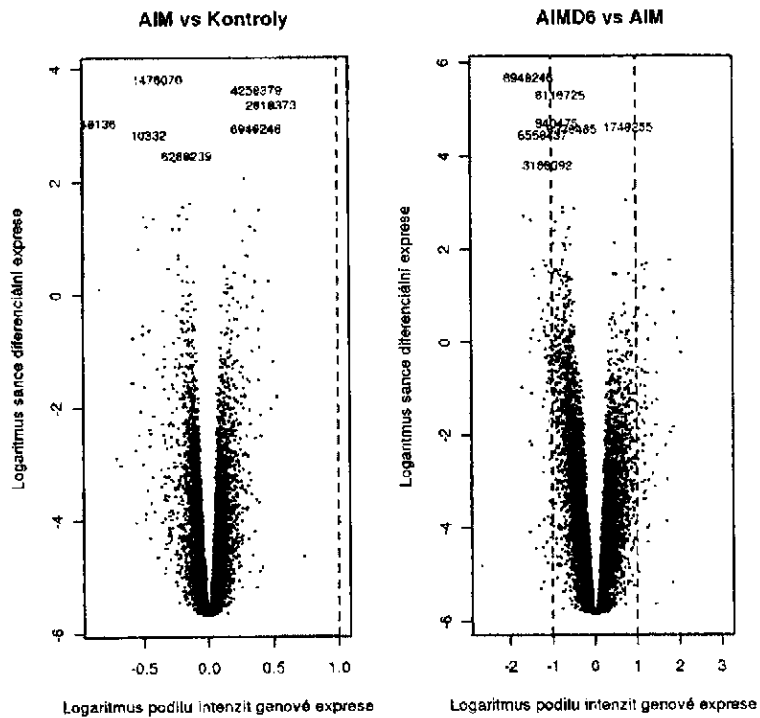




Obr.2



Obr. 2 - pokračování



Konec dokumentu