



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΣΤΕΡΕΑΣ ΕΛΛΑΔΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ
ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΙΑΤΡΙΚΗ**

**ΠΟΛΥΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ
ΜΙΚΡΟ-ΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (microarrays)**

Πελέκα Γεωργία

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επιβλέποντες

**Ιωαννίδης Αναστάσιος
Επισκέπτης Επίκουρος Καθηγητής**

**Μπάγκος Παντελής
Επίκουρος Καθηγητής**

Λαμία, 2009



**University of Central Greece
Department of Computer Science
and Biomedical Informatics**

MULTIVARIATE ANALYSIS OF MICROARRAY DATA

Peleka Georgia

Graduate Thesis

Supervisors

**Ioannidis Anastasios
Visiting Assistant Professor**

**Bagos Pantelis
Assistant Professor**

Lamia, 2009



Εξεταστική Επιτροπή.

- I. Ιωαννίδης Αναστάσιος, επισκέπτης επίκουρος καθηγητής (επιβλέπων).
- II. Μαγκλογιάννης Ηλίας, επίκουρος καθηγητής.
- III. Μπάγκος Παντελής, επίκουρος καθηγητής (επιβλέπων).

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη έλαβε χώρα στη Λαμία στο Πανεπιστήμιο Στερεάς Ελλάδος στο Τμήμα Πληροφορικής με Εφαρμογές στη βιοϊατρική από τον Νοέμβριο του 2007 έως τον Ιούνιο του 2009. Η υλοποίησή της πραγματοποιήθηκε χάρη στη βοήθεια ανθρώπων που θα ήθελα να αναφέρω και να ευχαριστήσω στο εισαγωγικό αυτό σημείωμα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ.Αναστάσιο Β. Ιωαννίδη Επισκέπτη Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Πληροφορικής με Εφαρμογές στη Βιοϊατρική για την πολύτιμη βοήθειά του και για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ.Παντελή Μπάγκο Επίκουρο Καθηγητή του τμήματος Πληροφορικής με Εφαρμογές στην Βιοϊατρική για την αποτελεσματική βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος, αισθάνομαι για άλλη μια φορά την ανάγκη να ευχαριστήσω τους γονείς μου Περικλή και Αναστασία, την αδερφή μου Άννα και τους φίλους μου για την υποστήριξη και την υπομονή τους.

Faint section header text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint section header text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Faint paragraph of text.

Περιεχόμενα

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ.....	4
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
ABSTRACT	12
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	14
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ	16
1.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ	16
1.1.1.1 Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ.....	16
1.1.1.2 ΔΙΕΥΚΟΛΥΝΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΕΙ Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ.....	16
1.1.1.3 DNA ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ: ΤΑ ΤΕΧΝΙΚΑ ΘΕΜΕΛΙΑ.....	17
1.1.1.4 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΑΚΡΙΒΩΣ ΜΙΑ DNA ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΑ.....	17
1.1.1.5 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΜΙΑ DNA ΣΥΣΤΟΙΧΙΑ.....	18
1.1.2 ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ DNA.....	19
1.1.2.1 ΤΥΠΟΙ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ.....	21
1.1.2.2 ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ.....	21
1.1.2.3 ΕΝΘΕΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΠΩΛΕΙΕΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ.....	22
1.1.2.4 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟ DNA.....	23
1.1.2.5 ΟΡΟΛΟΓΙΑ ΠΟΥ ΑΦΟΡΑ ΤΙΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ.....	23
1.1.3 ΠΩΣ ΔΗΜΙΟΥΡΓΟΥΝΤΑΙ ΟΙ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ	24
1.1.3.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ: ΤΑ ΒΑΣΙΚΑ ΒΗΜΑΤΑ.....	24
1.1.3.2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	26
1.1.3.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	27
1.1.3.4 ΒΑΣΙΚΑ ΒΗΜΑΤΑ ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΕ ΜΙΑ ΣΥΣΤΟΙΧΙΑ (ARRAY).....	29
1.1.3.5 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ.....	29
1.1.4 Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ.....	29
1.1.4.1 ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΕΣ ΠΡΟΣΕΓΙΤΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ.....	30
1.1.4.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΠΛΑΤΦΟΡΜΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΩΝ.....	31
1.1.4.3 ΓΟΝΙΔΙΑΚΟ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ.....	34
1.1.4.4 ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	35
1.1.5 ΓΙΑΤΙ ΕΙΝΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΕΣ ΟΙ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ.....	36
1.1.5.1 Η ΠΙΘΑΝΗ ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ.....	38
1.1.6 ΔΗΜΟΣΙΕΣ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΓΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	39
1.1.6.1 ΤΟ NCBI ΚΑΙ Η ΔΙΑΧΕΙΡΗΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ.....	39
1.1.6.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΡΜΗΝΕΙΑ.....	39
1.1.6.3 ΤΙ ΕΙΝΑΙ ΤΟ GEO (GENE EXPRESSION OMNIBUS).....	40
1.1.6.4 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΗΣ MAML: ΑΠΟΚΡΥΠΤΟΓΡΑΦΩΝΤΑΣ ΤΗΝ ΙΔΙΑ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ.....	40
1.1.6.5 ΤΑ ΟΦΕΛΗ ΑΠΟ: GEO ΚΑΙ MAML.....	41
1.1.7 ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ	42
1.1.7.1 ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ.....	42
1.1.7.2 ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΠΑΚΕΤΑ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ.....	43
1.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΕΤΑΝΑΛΥΣΗ	45
1.2.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ	45
1.2.2 Ο ΟΡΟΣ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗ	45

1.2.3 Η ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΤΑ-ΑΝΑΛΥΣΗΣ	47
1.2.3.1 ΜΟΝΤΕΛΟ ΒΑΣΙΜΕΝΟ ΣΕ T-ΤΕΣΤ.....	48
1.2.3.1.1 ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ.....	49
1.2.3.1.2 ΜΟΝΤΕΛΟ ΤΥΧΑΙΩΝ ΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ.....	51
1.2.3.2 ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΤΑΞΙΝΟΜΙΣΗΣ ΓΙΝΟΜΕΝΩΝ.....	52
1.2.3.3 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ χ^2 ΤΟΥ FISHER.....	54
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	56
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ	58
2.1.1 ΕΥΡΕΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	58
2.1.2 ΕΞΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	58
2.1.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	59
2.2 RANKPROD	60
2.3 METRADISC	62
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
3.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΚΤΗΘΗΚΑΝ ΜΕΣΩ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΖΗΤΗΣΗΣ	66
3.2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟ RANKPROD ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	73
3.2.1 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΟ RANKPROD.....	74
3.2.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	74
3.2.1.2 ΕΞΑΓΩΓΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ.....	75
3.3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟ METRADISC ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	79
3.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟ METRADISC ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	79
3.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	82
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1	86
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2	89
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	172

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA δημιουργήθηκε για να διευκολύνει τον προσδιορισμό και την ταξινόμηση του μεγάλου πλήθους των ακολουθιών που είναι διαθέσιμες παρέχοντας την δυνατότητα στους ερευνητές να προσδιορίσουν μέσα σε άγνωστες ακολουθίες έναν μεγάλο αριθμό νέων γονιδίων και την ανάθεση λειτουργιών σε αυτά. Οι μικροσυστοιχίες λειτουργούν με την εκμετάλλευση της εξής ιδιότητας, ένα δεδομένο μόριο mRNA προσδέεται ή υβριδοποιείται μόνο με το μητρικό DNA από το οποίο προήλθε, αποτελούν μικρές, στερεές υποδοχές επάνω στις οποίες είναι ακινητοποιημένες οι ακολουθίες από χιλιάδες διαφορετικά γονίδια σε σταθερές θέσεις. Το DNA είναι τυπωμένο, ιχνηθετημένο, ή πραγματικά συντεθημένο άμεσα επάνω στην υποδοχή. Οι επιστήμονες χρησιμοποιούν συστοιχίες που περιέχουν πολλά διαφορετικά δείγματα DNA. Έτσι μπορούν να καθορίσουν, σε ένα ενιαίο πείραμα, τα επίπεδα έκφρασης εκατοντάδων ή χιλιάδων γονιδίων μέσα σε ένα κύτταρο, με τη μέτρηση της ποσότητας του mRNA που δεσμεύεται σε κάθε περιοχή στη συστοιχία. Με την βοήθεια ενός υπολογιστή η ποσότητα του mRNA που δεσμεύεται μετριέται ακριβώς, παράγοντας ένα σχεδιάγραμμα της έκφρασης των γονιδίων στο κύτταρο.

Λόγω της συνεχούς αύξησης συστηματικών μελετών που χρησιμοποιούν την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών είτε κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είτε χρησιμοποιώντας ομάδες δεδομένων μικροσυστοιχιών που είναι δημόσια διαθέσιμες, πλέον είναι αναγκαία η χρήση στατιστικών μεθόδων για τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων διαφόρων μελετών που αφορούν το ίδιο ερώτημα. Μία μέθοδος η οποία αποτελεί οργανωμένη και δομημένη αξιολόγηση ενός προβλήματος χρησιμοποιώντας πληροφορίες (συνήθως υπό την μορφή πινάκων) από διαφορετικές μελέτες οι οποίες ερευνούν το ίδιο πρόβλημα, είναι η μετα-ανάλυση.

Έχουν δημιουργηθεί κατά καιρούς διάφορες μέθοδοι για την μετα-ανάλυση δεδομένων μικροσυστοιχιών, κάποιες από αυτές τις μεθόδους αναφέρονται στη μελέτη αυτή καθώς γίνεται και εφαρμογή τους με χρήση δεδομένων που είτε ανακτήθηκαν από δημόσιες βάσεις δεδομένων είτε ανακτήθηκαν μέσω βιβλιογραφικής έρευνας.

Λέξεις-Κλειδιά: Μικροσυστοιχίες, Ανάλυση μικροσυστοιχιών, Γονιδιακή Έκφραση, Μετα-ανάλυση

Abstract

DNA microarray technology was created to facilitate the definition and classification of the large amount of the available sequences , giving researchers the potential to determine ,within unknown sequences, a large number of new genes and to assign operations to them. The microarrays operate with the exploitation of the following property: a given mRNA molecule is bound or hybridized only to the DNA template which it originated from. They are small , solid slots on which the sequences of thousands of different genes are immobilized on fixed positions. The DNA is printed , trailed or actually composed directly on the support slot. Scientists use sequences that contain many different DNA samples. Hence, they can determine in an integrated experiment the expression levels of hundreds or thousands of genes in a cell, with the measurement of the mRNA amount that is engaged in every region of the array. With the help of a computer the mRNA amount that is bound is measured precisely, generating a profile of the gene expression in the cell.

Because of the constant increase of the systematic studies that use microarray technology, either during the experiment process or by using publicly available microarray datasets , the use of statistic methods to combine the results of different studies concerning the same question is now necessary. A method which is an organized and structured evaluation of a problem using information (usually in the form of tables) from different studies which examine the same problem is called meta-analysis.

At times , various methods for the meta-analysis of microarray data have been created. Some of these are mentioned in this study as there is also an application of them with data which were retrieved from public data bases or from bibliographical research.

Key-Words: Microarrays, Microarrays analysis, Gene Expression, Meta-analysis

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΙΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ

1.1.1 Εισαγωγικά

1.1.1.1 Η έκφραση των γονιδίων

Κάθε κύτταρο του σώματος περιέχει ένα πλήρες σύνολο χρωμοσωμάτων και πανομοιότυπων γονιδίων. Παρ'όλα αυτά μόνο ένα μέρος αυτών αποτελούν λειτουργικά γονίδια, είναι αυτά τα οποία "εκφράζονται" και παρέχουν εξειδικευμένες ιδιότητες σε κάθε τύπο κυττάρου. Η "έκφραση των γονιδίων" είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη μεταγραφή των πληροφοριών που περιλαμβάνονται στο DNA στα μόρια του αγγελιοφόρου RNA (mRNA), έπειτα οι πληροφορίες μεταφράζονται σε πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στις λειτουργίες του κυττάρου. Οι επιστήμονες για να μάθουν ποια γονίδια εκφράζονται σε ένα κύτταρο, μελετούν τα είδη και τις ποσότητες του mRNA που παράγονται σε αυτό. Η διαδικασία αυτή παρέχει ενδείξεις για το πώς το κύτταρο ανταποκρίνεται στις μεταβαλλόμενες ανάγκες του. Η έκφραση των γονιδίων είναι μια ιδιαίτερα σύνθετη και αυστηρά ρυθμισμένη διαδικασία που επιτρέπει σε ένα κύτταρο να ανταποκριθεί δυναμικά στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που δέχεται. Με τον μηχανισμό αυτό, το κύτταρο μπορεί να ελέγξει ποιοτικά και ποσοτικά ποια γονίδια θα εκφραστούν.

1.1.1.2 Διευκολύνσεις που παρέχει η τεχνολογία

Με την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών και την αύξηση του όγκου των γνώσεων η βιοϊατρική έρευνα προωθείται και εξελίσσεται συνεχώς. Οι ερευνητές χρησιμοποιώντας τις παραδοσιακές μεθόδους για την διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων, μπορούσαν να μελετήσουν ταυτοχρόνως έναν σχετικά μικρό αριθμό γονιδίων. Η εμφάνιση νέων τεχνικών επιτρέπει στους ερευνητές να ξεπεράσουν τα προηγουμένως δυσεπίλυτα προβλήματα και να αποκαλύψουν νέους τρόπους θεραπείας. Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays) είναι μια από αυτές τις τεχνικές, καθώς επιτρέπει να αναλυθεί, γρήγορα και αποτελεσματικά, η έκφραση πολλών γονιδίων σε ένα ενιαίο πείραμα.

Από την περιγραφή της αρχικής χρήσης cDNA μικροσυστοιχιών στην ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης το 1995 [1], η τεχνολογία αυτή έγινε σε μικρό χρονικό διάστημα προσιτή για ολόκληρη την επιστημονική κοινότητα, μέσω κεντρικών εγκαταστάσεων σε πολλά ακαδημαϊκά ιδρύματα ερευνών. Οι ίδιες οι συστοιχίες έχουν εξελιχθεί, αφού αρχικά μπορούσαν να αναπαραστήσουν λιγότερα από 50 γονίδια ενώ τώρα μπορούν να αναφερθούν σε περισσότερα από 50,000 αντίγραφα ολόκληρων γονιδιωμάτων, τα οποία προέρχονται από πολύπλοκους οργανισμούς θηλαστικών. Αυτές οι συστοιχίες μετρούν την διαφοροποίηση στην έκφραση γνωστών και άγνωστων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες.

Οι μικροσυστοιχίες αντιστοιχούν σε μια σημαντική μεθοδολογική πρόοδο αποδεικνύοντας ότι η εύρεση νέων τεχνολογιών παρέχει ισχυρά εργαλεία στον επιστημονικό κόσμο. Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών χρησιμοποιείται για την κατανόηση των θεμελιωδών πτυχών της ανάπτυξης και της εξέλιξης καθώς επίσης και για την έρευνα των ελλοχεύουσων γενετικών αιτιών πολλών ανθρώπινων ασθενειών.

1.1.1.3 DNA μικροσυστοιχίες: Τα τεχνικά θεμέλια

Δύο πρόσφατες συμπληρωματικές ανακαλύψεις διευκολύνουν τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων και την αποκάλυψη των ρόλων που διαδραματίζουν συγκεκριμένα γονίδια στην εμφάνιση κάποιας ασθένειας.

Ως αποτέλεσμα του προγράμματος για την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) [2], υπήρξε μια τεράστια αύξηση στο πλήθος των ακολουθιών που είναι διαθέσιμες παρέχοντας την δυνατότητα στους ερευνητές να προσδιορίσουν μέσα σε άγνωστες ακολουθίες έναν μεγάλο αριθμό νέων γονιδίων. Μόνο αφότου ανακαλυφθούν οι λειτουργίες των νέων γονιδίων θα αποκαλυφθεί ο πλήρης αντίκτυπος του προγράμματος ανθρώπινου γονιδιώματος. Η πρόκληση που υπάρχει αυτήν την περίοδο στην επιστημονική κοινότητα είναι να βρεθεί ένας τρόπος να οργανωθεί και να καταχωρηθεί αυτό το μεγάλο πλήθος δεδομένων σε μια κοινώς χρησιμοποιήσιμη μορφή.

Η εμφάνιση της τεχνολογίας μικροσυστοιχιών DNA μπορεί να διευκολύνει τον προσδιορισμό και την ταξινόμηση αυτών των δεδομένων και την ανάθεση λειτουργιών σε αυτά τα νέα γονίδια: Οι μικροσυστοιχίες λειτουργούν με την εκμετάλλευση της ιδιότητας ότι, ένα δεδομένο μόριο mRNA υβριδοποιείται με το μητρικό DNA από το οποίο προήλθε. Οι επιστήμονες χρησιμοποιούν συστοιχίες που περιέχουν πολλά διαφορετικά δείγματα DNA. Έτσι μπορούν να καθορίσουν, σε ένα ενιαίο πείραμα, τα επίπεδα έκφρασης εκατοντάδων ή χιλιάδων γονιδίων μέσα σε ένα κύτταρο, με τη μέτρηση της ποσότητας του mRNA που δεσμεύεται σε κάθε περιοχή στη συστοιχία. Με την βοήθεια ενός υπολογιστή η ποσότητα του mRNA που δεσμεύεται μετρίεται ακριβώς, παράγοντας ένα σχεδιάγραμμα της έκφρασης των γονιδίων στο κύτταρο.

1.1.1.4 Τι είναι ακριβώς μία DNA μικροσυστοιχία

Οι DNA μικροσυστοιχίες είναι μικρές, στερεές υποδοχές επάνω στις οποίες οι ακολουθίες από χιλιάδες διαφορετικά γονίδια είναι ακινητοποιημένες σε σταθερές θέσεις (εικόνα 1). Οι υποδοχές οι ίδιες είναι συνήθως γυάλινες αντικειμενοφόροι πλάκες μικροσκοπίου, αλλά μπορούν επίσης να είναι τσιπ πυριτίου ή νάιλον μεμβράνες. Το DNA είναι τυπωμένο, ιχνηθετημένο, ή πραγματικά συντεθημένο άμεσα επάνω στην υποδοχή.

Μία μικροσυστοιχία (microarray) είναι ένα εργαλείο για την κατανόηση της έκφρασης γονιδίων που αποτελείται από μια μικρή φωτογραφική διάφανη επιφάνεια μεμβράνης ή γυαλιού που περιέχει τα δείγματα πολλών γονιδίων τα οποία είναι τακτοποιημένα σε ένα κανονικό σχέδιο.

Εικόνα 1 .Ορισμός μικροσυστοιχιών.

Το αμερικανικό λεξικό American Heritage Dictionary καθορίζει τη λέξη "συστοιχία" (array) ως "η τοποθέτηση σε μια τακτική ρύθμιση". Είναι σημαντικό το ότι οι ακολουθίες γονιδίων σε μία μικροσυστοιχία είναι συνδεδεμένες με την υποδοχή τους με έναν τακτικό ή σταθερό τρόπο. Συνεπάγοντας ότι κάθε ερευνητής μπορεί να χρησιμοποιήσει τη θέση κάθε σημείου στη συστοιχία για να προσδιορίσει μια ιδιαίτερη ακολουθία γονιδίων. Τα προσδεδεμένα μόρια στα σημεία αυτά μπορούν να είναι DNA, cDNA, ή ολιγονουκλεοτίδια.

1.1.1.5 Τι είναι μία DNA συστοιχία

Στην πιο απλή μορφή της, μία DNA συστοιχία είναι μία μεθοδική τακτοποίηση διαφορετικών πολυνουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Κάθε μια από αυτές τις αλληλουχίες είναι ειδική μόνο για ένα γονίδιο και όλες προσδέονται σε ένα στερεό υπόστρωμα.

Όσον αφορά την πρόσδεση, ξεχωριστές θέσεις πάνω στο στερεό υπόστρωμα (αναφερόμενες ως γνωρίσματα ή "features" των GeneChips) [3] οργανώνονται στο χώρο με δικτυωτό-πλεγματούχο τρόπο, έτσι ώστε να συνδέουν αντίστοιχα τις πληροφορίες που λαμβάνουμε σε εκείνη τη θέση με την ταυτότητα της γονιδιακής αλληλουχίας (εικόνα 2).

Η επιλογή των αλληλουχιών που εμπερικλείονται σε μία συστοιχία γίνεται είτε προς παρουσίαση του ολικού εκφραζόμενου γονιδιώματος, είτε προς παρουσίαση μερικών επιλεγμένων υποομάδων γονιδίων (π.χ. γονίδια που σχετίζονται με φλεγμονή ή γονίδια που σχετίζονται με απόπτωση κτλ.).

Ο όρος μικροσυστοιχίες τυπικά χρησιμοποιήθηκε για συστοιχίες που χρησιμοποιούσαν μικρές ποσότητες δείγματος με θέσεις πρόσδεσης μικρότερες ή ίσες των 200μm. Οι προοδευτικές μειώσεις των διαστάσεων των θέσεων πρόσδεσης των GeneChips, επέτρεψαν την δημιουργία αντικειμενοφόρων πλακών που μπορούν δεχτούν κυριολεκτικά δεκάδες χιλιάδες διαφορετικά πολυνουκλεοτιδικά τεμάχια. Έτσι, αυτή η στερεά φάση «μήτρας» εξασφαλίζει ένα μέσο για την πρόσδεση χαρακτηρισμένων συμπληρωματικών αλληλουχιών σε διάλυμα υβριδισμού. Από την κατασκευή των DNA συστοιχιών, έχουν έρθει στο φως δύο βασικές τεχνολογίες:

- 1) η ακινητοποίηση καθαρών cDNA στην αντικειμενοφόρο πλάκα των μικροσυστοιχιών και

- 2) η επί τόπου (in situ) σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων απευθείας σε chips πυριτίου.

Η τελευταία είναι γνωστή στο εμπόριο ως “Affymetrix GeneChips” (Santa Clara, CA, U.S.A.) [4].

1.1.2 Τεχνική των μικροσυστοιχιών DNA

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA αναπτύχθηκε, έτσι ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα η ανάλυση του τρόπου έκφρασης χιλιάδων γονιδίων. Στη συνέχεια, αυτή η τεχνική φάνηκε να πλεονεκτεί σε σχέση με τις παραδοσιακές τεχνικές του ενός γονιδίου όπως : 1) Northern υβριδισμός [5] και 2) RT-PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction) [6].

Η τεχνολογία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτόχρονη διερεύνηση έκφρασης αρκετών γονιδίων σε διαφορετικά δείγματα ή σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης, για τη συγκριτική έκφραση γονιδίων σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις, όπως επίσης και για την ανάλυση της απάντησης εκτεθειμένων κυττάρων σε φάρμακα-ουσίες σε διαφορετικές συνθήκες.

Η αξία αυτής της μεθόδου, για την αναγνώριση του τρόπου έκφρασης γονιδίων, έχει αποδειχθεί καθαρά σε οργανισμούς όπως τη μαγιά, τις φρουτόμυγες, τα ποντίκια και τον άνθρωπο.

Μέχρι το 2001, υπήρχαν μόνον τα ακόλουθα τρία εργαστήρια που χρησιμοποιούσαν τη μέθοδο microarrays για ανάλυση γονιδιακού DNA με υψηλή απόδοση:

- 1- Το εργαστήριο Brown [7] έκανε χρήση cDNA microarrays.
- 2- Το εργαστήριο Gray [8] έκανε χρήση μικροσυστοιχιών από γονιδιακό DNA κλωνοποιημένο σε ξενιστές τεχνητού βακτηριακού χρωμοσώματος (Bacterial Artificial Chromosome, BAC).
- 3- Το εργαστήριο Wigler [9] έκανε χρήση μικροσυστοιχιών από χαμηλής-πολυπλοκότητας γονιδιακού DNA.

The Colors of a Microarray



Reproduced with permission from the Office of Science Education, the National Institutes of Health.

Σε αυτή τη σχηματική αναπαράσταση:

ΠΡΩΤΥΠΟ: Αντιπροσωπεύει το DNA των προτύπων, είναι είτε DNA είτε cDNA που προέρχεται από κανονικό ιστό και υβριδοποιείται στο DNA στόχων.

ΚΟΚΚΙΝΟ: Αντιπροσωπεύει το DNA των δειγμάτων, είναι DNA ή cDNA που προέρχεται από το υπό εξέταση υλικό και υβριδοποιείται στο DNA στόχων.

ΛΕΥΚΟ: Αντιπροσωπεύει έναν συνδυασμό του DNA των προτύπων και των δειγμάτων, όπου και τα δύο υβριδιοποιήθηκαν εξίσου στο DNA στόχων.

ΜΑΥΡΟ: Αντιπροσωπεύει τις περιοχές όπου ούτε το DNA των προτύπων, ούτε το DNA των δειγμάτων υβριδιοποιήθηκε στο DNA στόχων.

Κάθε σημείο σε μια σειρά συνδέεται με ένα ιδιαίτερο γονίδιο. Κάθε χρώμα σε μια σειρά αντιπροσωπεύει είτε τον υγιή (πρότυπα) είτε ασθενή ιστό (δείγματα). Ανάλογα με τον τύπο συστοιχίας που χρησιμοποιείται, η θέση και η ένταση ενός χρώματος θα μας πουν εάν το γονίδιο, ή η μετάλλαξη, είναι παρόντα είτε στο DNA των προτύπων ή/και στο DNA δειγμάτων. Θα παρέχει επίσης μια εκτίμηση του επιπέδου έκφρασης των γονιδίων στο DNA δειγμάτων και προτύπων.

Εικόνα 2. Επεξήγηση χρωματολογίου σε ένα πείραμα μικροσυστοιχιών [10].

1.1.2.1 Τύποι μικροσυστοιχιών

Για την κατασκευή μικροσυστοιχιών DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρεις βασικοί τύποι δειγμάτων, οι δύο είναι γονιδιακοί και ο άλλος είναι μεταγραφικός, δηλαδή μετρά τα επίπεδα του mRNA. Το χαρακτηριστικό που τους καθιστά διαφορετικούς τον ένα από τον άλλον είναι το είδος του ακινητοποιημένου DNA που χρησιμοποιούμε για να παράγουμε τη συστοιχία και, τελικά το είδος των πληροφοριών που λαμβάνουμε από το τσιπ. Ο τύπος του DNA στόχου θα καθορίσει επίσης τον τύπο του DNA των προτύπων και των δειγμάτων που θα χρησιμοποιηθούν για την υβριδοποίηση.

1.1.2.2 Αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων

Αποκαλούμε ανάλυση έκφρασης μικροσυστοιχιών τον καθορισμό του επιπέδου, ή της ποσότητας στην οποία εκφράζεται ένα συγκεκριμένο γονίδιο. Οι συστοιχίες οι οποίες χρησιμοποιούνται σε αυτό το είδος ανάλυσης καλούνται "τσιπ έκφρασης". Το ακινητοποιημένο DNA είναι cDNA το οποίο λαμβάνουμε από το mRNA καθορισμένων γονιδίων το DNA φυσιολογικών δειγμάτων. Το DNA των δειγμάτων που υβριδοποιούνται στο τσιπ είναι cDNA που το λαμβάνουμε από το mRNA φυσιολογικών και ασθενών δειγμάτων, αντίστοιχα. Εάν κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο υπερεκφράζεται σε κάποιο στάδιο της ασθένειας, τότε στο σημείο που αντιπροσωπεύει εκείνο το εκφρασμένο γονίδιο θα υβριδοποιηθεί περισσότερο από το cDNA δείγμα, σε σύγκριση με το DNA των φυσιολογικών δειγμάτων. Έτσι, το σημείο θα εμφανιστεί κόκκινο με μεγαλύτερη ένταση από ότι πράσινο. Μόλις οι ερευνητές καταγράψουν τα σχέδια έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορες ασθένειες, το cDNA που προέρχεται από δείγμα οποιουδήποτε ασθενούς, μπορεί να υβριδοποιηθεί για να καθορίσει εάν το σχέδιο έκφρασης των γονιδίων του, ταιριάζει με το σχέδιο έκφρασης μιας γνωστής ασθένειας. Εάν αυτό συμβαίνει, ταυτοποιείται η νόσος και ξεκινά η ενδεδειγμένη ιατρική περίθαλψη.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι ερευνητές χρησιμοποιούν τα τσιπς έκφρασης για να ανιχνεύσουν σχέδια έκφρασης, εάν δηλαδή συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται κάτω από ορισμένες συνθήκες, τότε αυτά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την εξέταση των αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων κατά τη διάρκεια μιας δεδομένης χρονικής περιόδου, όπως μέσα στον κυτταρικό κύκλο.

Ο κυτταρικός κύκλος είναι μια ακολουθία γεγονότων μεταξύ μιτωτικών διαιρέσεων για κάποιο κύτταρο. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά γονίδια που συνεκφράζονται για τη ρύθμιση αυτού. Σε αυτή την ακολουθία γεγονότων δημιουργούνται επίσης μηχανισμοί που έχουν σκοπό να προστατεύσουν το κύτταρο όταν αυτή αποτυγχάνει ή παθαίνει βλάβη (λόγω μεταλλάξεων σε ένα από τα "γονίδια ελέγχου", όπως συμβαίνει στην δημιουργία του καρκίνου). Ένα πείραμα για την διερεύνηση της έκφρασης με μικροσυστοιχίες θα μπορούσε να σχεδιαστεί ως ένα σύστημα συγχρονισμένων καλλιέργειών. Οι καλλιέργειες αυτές έχουν ως χαρακτηριστικό το ότι ο ρυθμός της κυτταροδιαίρεσης παραμένει μηδενικός για τον

περισσότερο χρόνο. Η ανάλυση των στοιχείων που θα προκύψουν θα μπορούσε να διευκρινίσει τις επιπλέον λεπτομέρειες του κυτταρικού κύκλου και του προγράμματος του, παρέχοντας αναγκαία στοιχεία όσον αφορά τους λόγους που η μετάλλαξη κάποιων γονιδίων οδηγεί σε καρκίνο.

Με αυτό τον τρόπο, τα τσιπ έκφρασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Παραδείγματος χάριν, εάν ένα συγκεκριμένο γονίδιο υπερεκφράζεται σε μια μορφή καρκίνου, οι επιστήμονες μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα τσιπ έκφρασης για να ελέγξουν εάν κάποιο νέο φάρμακο θα μειώσει την υπερέκφραση και θα αναγκάσει τον καρκίνο να υποχωρήσει. Θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν και στη διάγνωση ασθενειών, όπως στον προσδιορισμό των γονιδίων που εμπλέκονται σε νόσους που προκαλούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, εκείνες δηλαδή που έχουν επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό, το νευρικό και το αναπνευστικό σύστημα.

1.1.2.3 Ενθέσεις και απώλειες στο Γονιδίωμα

Τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA είναι η πρώτη γραμμή υπεράσπισης του κυττάρου ενάντια στις μεταλλάξεις και, γι' αυτό το λόγο, διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο. Οι μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια εμφανίζονται συνήθως από την έλλειψη ολόκληρων χρωμοσωμάτων ή κάποιου μέρους αυτών ή σε κατεστραμμένα χρωμοσώματα. Θεωρείται ότι ορισμένες χρωμοσωμικές ενθέσεις και απώλειες συσχετίζονται με τον καρκίνο και ότι τα πρότυπα αυτών των αλλαγών μπορούν να βοηθήσουν στην κλινική πρόγνωση.

Χρησιμοποιώντας διαφορετικές εργαστηριακές μεθόδους, οι ερευνητές μπορούν να βρουν τις ενθέσεις και τις απώλειες των χρωμοσωμικών περιοχών στα κύτταρα όγκων. Κατόπιν, χρησιμοποιώντας μαθηματικά πρότυπα για να αναλύσουν αυτά τα στοιχεία, μπορούν να προβλέψουν ποιες χρωμοσωμικές περιοχές είναι οι πλέον πιθανές, ποιά είναι τα σημαντικά γονίδια, για την έναρξη όγκων και την εξέλιξη ασθενειών. Τα αποτελέσματα μιας τέτοιας ανάλυσης μπορούν να απεικονιστούν με ένα διάγραμμα ιεραρχικής μορφής δένδρου, το οποίο αποκαλείται "πρότυπο δέντρο της εξέλιξης όγκων".

Οι ερευνητές χρησιμοποιούν μια τεχνική που αποκαλείται συγκριτική γενετική υβριδοποίηση (Comparative Genomic Hybridization, CGH) [11] μικροσυστοιχιών για να αναζητήσουν τις γενετικές ενθέσεις και τις απώλειες ή μια αλλαγή στον αριθμό αντιγράφων ενός συγκεκριμένου γονιδίου που εμπλέκεται στην εμφάνιση μιας ασθένειας. Στην CGH, μεγάλες αλληλουχίες γονιδιακού DNA χρησιμεύουν ως DNA στόχου, και κάθε σημείο των DNA στόχων στη συστοιχία έχει μια γνωστή χρωμοσωμική θέση. Το μίγμα υβριδοποίησης περιέχει το ιχνηθετημένο γονιδιακό DNA το οποίο συλλέγεται και από υγιή και από ασθενή ιστό (δειγμάτα).

Επομένως, εάν ο αριθμός αντιγράφων ενός συγκεκριμένου γονιδίου στόχου έχει αυξηθεί, ένα μεγάλο ποσό του DNA του ασθενή θα υβριδοποιηθεί σε εκείνα τα σημεία στη μικροσυστοιχία που αντιπροσωπεύουν το γονίδιο που εμπλέκεται στην ασθένεια, ενώ συγκριτικά μικρά ποσά του DNA από τα υγιή άτομα θα

υβριδοποιηθούν στα ίδια σημεία. Κατά συνέπεια, εκείνα τα σημεία που περιέχουν το γονίδιο της ασθένειας θα εμφανίσουν με μεγαλύτερη ένταση κόκκινο χρώμα από ότι πράσινο, δείχνοντας ότι ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου που εμπλέκεται στην ασθένεια έχει αυξηθεί.

1.1.2.4 Μεταλλάξεις στο DNA

Όταν οι ερευνητές χρησιμοποιούν μικροσυστοιχίες για να ανιχνεύσουν τις μεταλλάξεις ή τους πολυμορφισμούς σε μια ακολουθία γονιδίων, ο στόχος ή το ακινητοποιημένο DNA είναι συνήθως ενός μοναδικού γονιδίου. Σε αυτήν την περίπτωση όμως, η ακολουθία στόχων που τοποθετείται μέσα στη συστοιχία σε οποιαδήποτε θέση θα διαφέρει από αυτή άλλων σημείων στο ίδιο πείραμα, μερικές φορές μόνο κατά ένα ή κατά μερικά συγκεκριμένα νουκλεοτίδια. Ένας τύπος ακολουθίας που χρησιμοποιείται συνήθως σε αυτό το είδος ανάλυσης καλείται πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου, ή SNP (Single Nucleotide Polymorphism), είναι μια μικρή γενετική αλλαγή ή μετάλλαξη που μπορεί να εμφανιστεί μέσα στην ακολουθία DNA ενός ατόμου. Μια άλλη διαφορά στην ανάλυση μετάλλαξης με μικροσυστοιχίες, σε σύγκριση με την έκφραση ή την CGH [11] μικροσυστοιχιών, είναι ότι αυτός ο τύπος πειράματος απαιτεί μόνο το γονιδιακό DNA που προέρχεται από ένα κανονικό δείγμα για να χρησιμοποιηθεί στο μίγμα υβριδοποίησης.

Μόλις καθορίσουν οι ερευνητές ότι ένα SNP συνδέεται με μια συγκεκριμένη ασθένεια, μπορούν να χρησιμοποιήσουν την τεχνολογία των SNP μικροσυστοιχιών για να εξετάσουν ένα άτομο για το πρότυπο έκφρασης της συγκεκριμένης ασθένειας για να καθορίσουν την πιθανότητα (κίνδυνο) να εμφανίσει εκείνη την ασθένεια.

Όταν το DNA από ένα άτομο υβριδοποιείται σε μια συστοιχία που περιέχει διάφορα SNPs, αυτό θα υβριδοποιηθεί με μεγαλύτερη συχνότητα μόνο σε συγκεκριμένα SNPs που συνδέονται με το συγκεκριμένο άτομο. Εκείνα τα σημεία θα χρωματιστούν έπειτα με μεγαλύτερη ένταση, κάτι που θα επιδείξει εάν το άτομο το οποίο εξετάζεται μπορεί να έχει, ή να διατρέχει κίνδυνο για, εκείνη την ασθένεια.

1.1.2.5 Ορολογία που αφορά τις μικροσυστοιχίες

Σε αυτό το σημείο είναι σκόπιμο να κάνουμε μερικές διευκρινίσεις όσον αφορά την ορολογία που χρησιμοποιείται στην τεχνική των μικροσυστοιχιών. Μια δυσκολία που συναντούν οι ερευνητές που διαβάζουν βιβλιογραφία για μικροσυστοιχίες είναι στο τι αποτελεί τον ανιχνευτή (the probe) και τι τον στόχο (the target).

Μολονότι κανείς τείνει να συνδέει μια ιχνηθετημένη αλληλουχία με τον όρο “probe”, το αντίθετο ισχύει στην περίπτωση της προτιμώμενης ονοματολογίας μικροσυστοιχιών. Δηλαδή με απλά λόγια, όλες γενικώς οι υβριδικές αντιδράσεις συνήθως εμπλέκουν τη χρήση μιας *γνωστής* πολυνουκλεοτιδικής αλληλουχίας ή *probe*, προς αναγνώριση μιας *άγνωστης* πολυνουκλεοτιδικής αλληλουχίας ή *target*.

από την πρόσδεση της πρώτης με τη δεύτερη λόγω της συμπληρωματικότητάς τους. Η μία αλληλουχία, όσον αφορά είτε το προσδιορισμένο πολυνουκλεοτίδιο είτε το άγνωστο, είναι συνήθως προσδεδεμένη σε μια στερεά φάση και η άλλη ελεύθερη στο διάλυμα. Στις κλασσικές μοριακές τεχνικές όπως Northern Blot [5], η προσδιορισμένη αλληλουχία ή “probe” είναι στο διάλυμα, ενώ αντίθετα η άγνωστη αλληλουχία (ή αλληλουχίες) “target” είναι ακίνητη (ή ακίνητες) σε μια μήτρα στερεάς φάσης ή μεμβράνη.

Οι μικροσυστοιχίες σχεδιάζονται με παρόμοιο τρόπο όπως οι τεχνικές «καταδίωξης» πυρήνων (Nuclear Runoff Assays) [12], μόνο με ανεστραμμένη στρατηγική. Δηλαδή στις μικροσυστοιχίες οι προσδιορισμένες πολυνουκλεοτιδικές αλληλουχίες “probes” είναι προσδεδεμένες στην στερεά φάση, ενώ οι ιχνηθετημένες “targets” (άγνωστες πολυνουκλεοτιδικές αλληλουχίες) βρίσκονται στη φάση του διαλύματος.

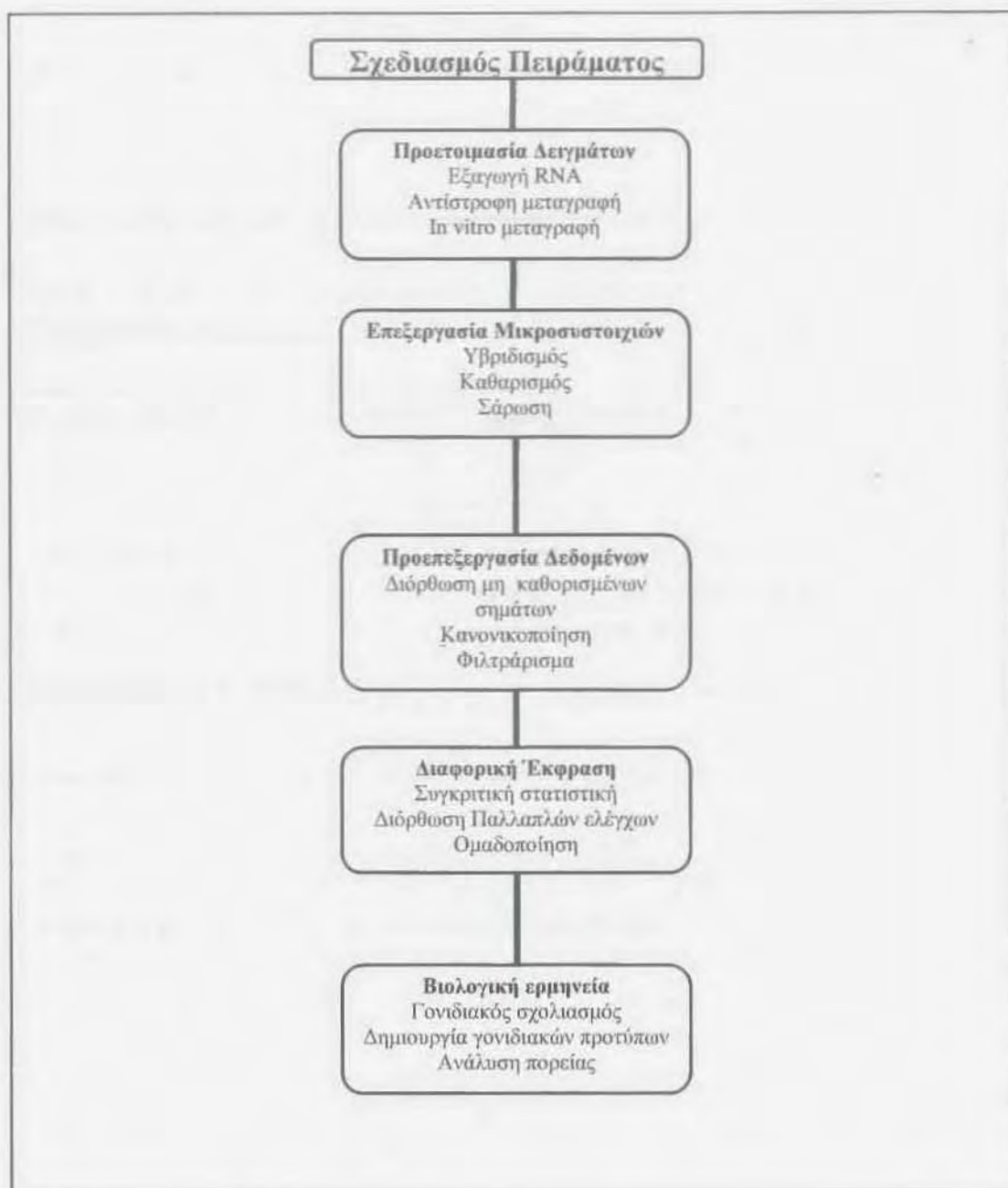
Έτσι ο Phimister (Nature Genetics) προτείνει την εξής ονοματολογία για μικροσυστοιχίες: Ο όρος *probe* να αναφέρεται στις διαφορετικές πολλαπλές και προσδιορισμένες αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων, οργανωμένες στο χώρο και υποχρεωτικά προσδεδεμένες στην μήτρα των συστοιχιών, ενώ ο όρος *target* να αναφέρεται σε ελεύθερες και ιχνηθετημένες αλληλουχίες στο διάλυμα.

1.1.3 Πως δημιουργούνται οι μικροσυστοιχίες

1.1.3.1 Σχεδιασμός ενός πειράματος μικροσυστοιχιών: Τα βασικά βήματα

Η βάση για ένα επιτυχημένο πείραμα γονιδιακής έκφρασης είναι ο καλός σχεδιασμός και η προσοχή στη λεπτομέρεια. Τεχνικά, υπάρχουν πολλά στάδια μεταξύ της προετοιμασίας των δειγμάτων και της σάρωσης των μικροσυστοιχιών (εικ. 3), σε καθένα από τα οποία μπορεί να παρουσιαστούν καινούριες πηγές τεχνικών λαθών και σφαλμάτων (bias), τα οποία μπορούν να έχουν έντονα αντίκτυπα στην ανάλυση και την ερμηνεία των δεδομένων. Για την ελαχιστοποίηση των τεχνικών σφαλμάτων, συνιστάται να γίνεται η επεξεργασία όλων των δειγμάτων απο έναν μόνο τεχνικό, ο οποίος θα τα επεξεργάζεται όλα την ίδια χρονική στιγμή και θα χρησιμοποιεί μικροσυστοιχίες από την ίδια κατασκευαστική παρτίδα [13]. Εάν κάτι τέτοιο δεν είναι εφικτό, τυχαία δείγματα για την κάθε πάθηση θα πρέπει κατανεμηθούν είτε σε διαφορετικούς τεχνικούς είτε να επεξεργαστούν σε διαφορετικές μέρες, για την αποφυγή στατιστικού λάθους [14].

Σε πολύπλοκες συστοιχίες θα πρέπει επίσης να εφαρμοστεί η αρχή της τυχαίας τακτοποίησης, επειδή στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται περισσότερες από μια αντικειμενοφόροι πλάκες τα δείγματα πρέπει να τοποθετούνται σε αυτές με τυχαίο τρόπο. Το βασικό διάγραμμα ροής ενός πειράματος μικροσυστοιχιών φαίνεται στην εικόνα 4.



Εικόνα 3. Διάγραμμα ροής ενός πειράματος μικροσυστοιχιών. Ο σκοπός ενός τυπικού πειράματος μικροσυστοιχιών είναι ο προσδιορισμός των υφιστάμενων βιολογικών διεργασιών με την αναγνώριση εκείνων των γονιδίων που η διαφοροποίηση στην έκφρασή τους είναι στατιστικώς σημαντική. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται σε κάθε στάδιο προσδιορίζονται από τον σχεδιασμό του πειράματος και από το είδος της πλατφόρμας μικροσυστοιχιών που επιλέγεται [77]

1.1.3.2 Σχεδιασμός του πειράματος

Τα πειράματα έκφρασης γονιδίων με μικροσυστοιχίες σχεδιάζονται για τους εξής σκοπούς: 1) για την εκτίμηση της διαφοροποίησης στην έκφραση γονιδίων μεταξύ δύο ομάδων και 2) για μελέτες ταξινόμησης, οι οποίες πραγματοποιούν ανίχνευση και πρόβλεψη ομάδων [15]. Αυτά τα πειράματα είναι χρονοβόρα και δαπανηρά, γι'αυτό το λόγο ο καλός σχεδιασμός του πειράματος είναι απολύτως αναγκαίος.

Ο πειραματικός σχεδιασμός απαιτεί μια επιστημονική υπόθεση, μια εκτίμηση του πλήθους των παραγόντων που πρόκειται να συγκριθούν και την ελπίδα ότι το στατιστικό μοντέλο αυτής της εκτίμησης πλησιάζει και εφαρμόζει καλά στις παρατηρηθείσες μεταβλητές. Το πιο απλοποιημένο σχέδιο είναι συνήθως το βέλτιστο. Η εμπιστοσύνη στα αποτελέσματα, η δύναμη της ανάλυσης, αποκομίζεται από τη χρήση του σωστού πλήθους αντιγράφων. Στις μελέτες μικροσυστοιχιών γίνεται χρήση δύο τύπων δειγμάτων, τεχνητά ή βιολογικά. Τα βιολογικά αντίγραφα, είναι δείγματα από διακεκριμένα αντικείμενα-άτομα, και μας βοηθούν να εξάγουμε συμπεράσματα βιολογικού ενδιαφέροντος. Τα τεχνητά είναι ένα δείγμα ή ένα σύνολο δειγμάτων τα οποία εφαρμόζονται σε πολλές μικροσυστοιχίες και εκτιμούν την συνέπεια του πειραματικού συστήματος παρέχοντας όμως ελάχιστες πληροφορίες βιολογικού ενδιαφέροντος. Σε μερικές περιπτώσεις, όπως στα συστήματα δύο χρωμάτων όταν ελέγχονται οι εξαρτώμενες από τη χρωστική ουσία επιπτώσεις, τεχνητά δείγματα συνδυάζονται με βιολογικά ώστε η μέση ένταση των τεχνητών δειγμάτων να είναι αυτή που θα χρησιμοποιηθεί στους μεταγενέστερους στατιστικούς υπολογισμούς.

Εξαιτίας του πλήθους των δεδομένων που προκύπτουν από ένα πείραμα μικροσυστοιχιών, οι κλασσικές μέθοδοι υπολογισμού του αριθμού των δειγμάτων που απαιτούνται για ένα τέτοιο πείραμα είναι αναποτελεσματικοί, γι'αυτό το λόγο έχουν προταθεί συγκεκριμένοι τρόποι για τον υπολογισμό αυτό ειδικευμένοι στις μικροσυστοιχίες [16-20]. Γενικώς συνιστώνται τουλάχιστον πέντε δείγματα σε κάθε ομάδα.

Στην πραγματικότητα, στα πειράματα μικροσυστοιχιών οι ερευνητές τείνουν να ερευνούν μικρό πλήθος γονιδίων εξαιτίας των περιορισμένων δειγμάτων ή λόγω έλλειψης χρημάτων, ακόμη και σε αυτές τις περιπτώσεις δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται λιγότερα από τρία δείγματα. Συγχώνευση (pooling) των δειγμάτων μπορεί να γίνει σε περιπτώσεις που το κόστος των δειγμάτων είναι κατά πολύ μικρότερο από αυτό των εργασιακών μικροσυστοιχιών, καθώς και σε περιπτώσεις που μπορεί να χρησιμοποιηθεί το ανεπαρκές RNA που ήδη υπάρχει και οι μέθοδοι διεύρυνσης είναι ανεπιθύμητες [18, 21, 22]. Ο ίδιος αριθμός δειγμάτων πρέπει να χρησιμοποιηθεί για κάθε συγχώνευση και επίσης πρέπει να χρησιμοποιηθούν πολλές συγχωνεύσεις για κάθε ομάδα. Η συγχώνευση μπορεί να οδηγήσει σε στατιστικά λάθη και δεν παρέχει την ίδια στατιστική σημαντικότητα στην ανάλυση που παρέχει η εξέταση διακεκριμένων δειγμάτων, αλλά προτιμάται από την σύγκριση

περιορισμένου αριθμού δειγμάτων. Η συγχώνευση δειγμάτων δεν είναι κατάλληλη για μελέτες ταξινόμησης, καθώς βασίζονται στην δια-ατομική διακύμανση και συνδιακύμανση.

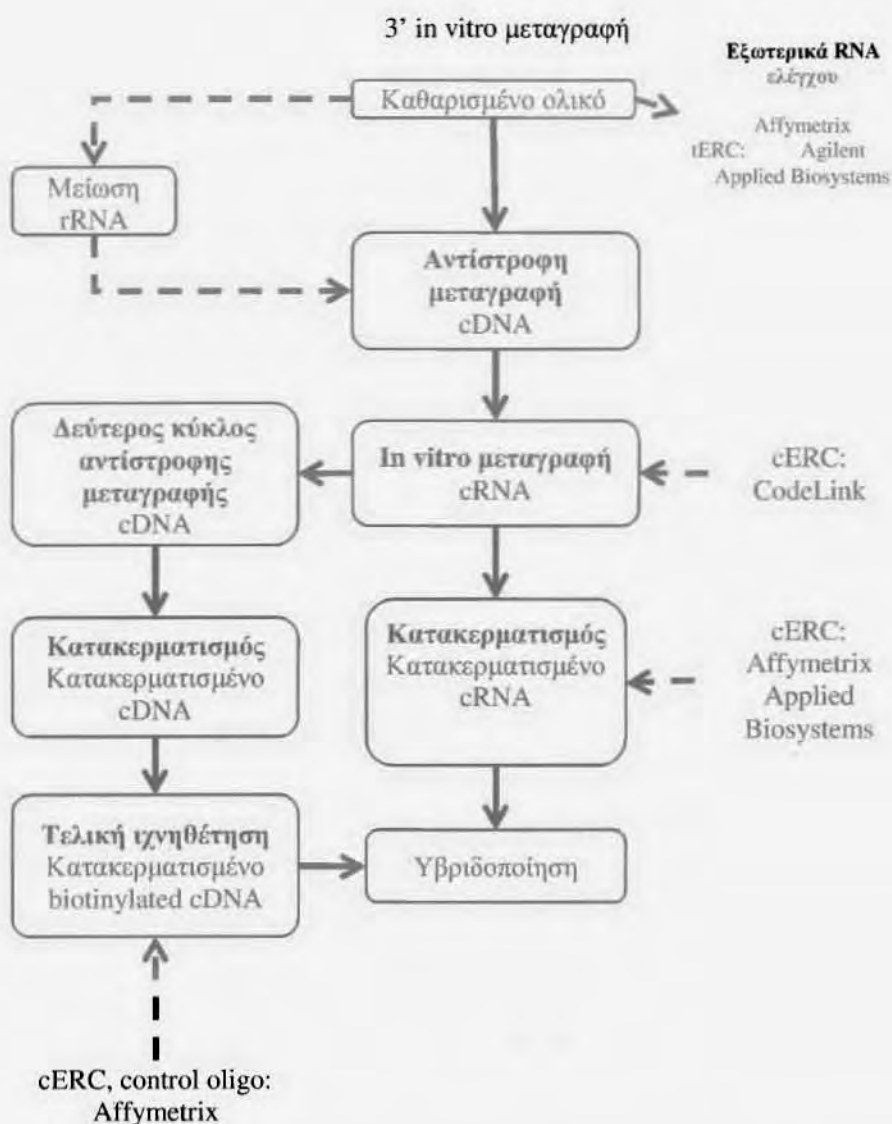
Για τους ερευνητές με περιορισμένο υπόβαθρο στατιστικών γνώσεων που πρόκειται να διεξάγουν πειράματα μικροσυστοιχιών, συνιστάται να αφιερώσουν αρκετό χρόνο στη μελέτη του σχεδιασμού του πειράματος συμβουλευόμενοι έναν στατιστικό, καθώς με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζουν την εγκυρότητα των συμπερασμάτων που θα προκύψουν από τα αποτελέσματα, ειδικά για πιο περίπλοκους σχεδιασμούς πειραμάτων.

1.1.3.3 Προετοιμασία των δειγμάτων

Στην αγορά υπάρχουν διαθέσιμα πολλά διαφορετικά αντιδραστήρια για την απομόνωση του RNA. Ο πιο σημαντικός παράγοντας είναι η εξασφάλιση της υψηλής ακεραιότητας του RNA που εισάγεται. Ο συνήθης τρόπος για να επιτευχθεί αυτό είναι η χρήση ενός μηχανήματος (Agilent 2100 Bioanalyzer) [23], το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να παράγει έναν αριθμό αξιολόγησης ακεραιότητας RNA (RNA Integrity Number, RIN) [24], για τον καθορισμό του επιπέδου ποιότητας του RNA. Οι κατασκευαστές μικροσυστοιχιών γενικώς παρέχουν ή προτείνουν σετ αντιδραστηρίων για την ιχνηθέτηση δειγμάτων. Τα σετ αυτά συνήθως χρησιμοποιούν μια τροποποιημένη μορφή της μεθόδου Eberwine για να παράγουν συμπληρωματικό RNA (cRNA) ιχνηθετημένο με μια χρωστική [25]. Τα σετ για συγκεκριμένες πλατφόρμες περιέχουν συχνά εξωτερικά RNA ελέγχου (ERC, external RNA controls), τα οποία είναι συμπληρωματικά στην ακολουθία με αλληλουχίες ελέγχου στις μικροσυστοιχίες [26].

Τα ERC χρησιμοποιούνται για να ελέγχονται οι αντιδράσεις ιχνηθέτησης του RNA, αφού προστίθενται στο συνολικό δείγμα RNA πριν από την σύνθεση του cDNA, καθώς επίσης και για την παρακολούθηση του υβριδισμού, του καθαρισμού και της διαδικασίας σάρωσης, αφού προστίθενται στο cRNA αμέσως πριν από την υβριδοποίηση. Επί προσθέτως σε αυτή την τυπική προσέγγιση, υπάρχουν πολλές διαφορετικές μέθοδοι για την ενίσχυση του RNA από δείγματα με μικρές συγκεντώσεις RNA [27]. Όσον αφορά την συγχώνευση των δειγμάτων, η ενίσχυση του RNA μπορεί να προκαλέσει στατιστικά λάθη τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά τον σχεδιασμό των πειραμάτων και κατά την ανάλυση των δεδομένων.

Τα στάδια που περιλαμβάνονται στην διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων φαίνονται στην εικόνα 4.



Εικόνα 4. Επεξεργασία δειγμάτων RNA. Ο παραδοσιακός τρόπος ιχνηθέτησης δειγμάτων RNA για τον υβριδισμό τους στις μικροσυστοιχίες χρησιμοποιεί την 3' in vitro μεταγραφή για την παραγωγή ιχνηθετημένου cRNA. Οι κατασκευαστές μικροσυστοιχιών συνήθως παρέχουν σετ για αυτή την διαδικασία τα οποία περιέχουν και εξωτερικά RNA σαν control (cERC). Αυτά είτε προστίθενται στο συνολικό RNA (tERC), σαν controls για τις αντιδράσεις της αντίστροφης μεταγραφής και της in vitro μεταγραφής, είτε στο cRNA (cERC) πριν ή μετά τον κατακερματισμό, σαν controls για τα βήματα επεξεργασία της μικροσυστοιχίας. Για τις Affymetrix συστοιχίες χρησιμοποιείται διαφορετικό πρωτόκολλο, χρησιμοποιώντας εξαμερή εκινητών για την παραγωγή ιχνηθετημένου cDNA, το οποίο υβριδοποιείται στη μικροσυστοιχία. Σε αυτή τη διαδικασία μπορεί να εμπεριέχεται ένα στάδιο μείωσης του rRNA, αναλόγως με το μέγεθος του αρχικού RNA. Μία επιπλέον ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία control, η οποία προστίθεται την ίδια στιγμή ως cERC, εκτελεί έναν επιπλέον έλεγχο στην επεξεργασία μικροσυστοιχιών [77].

1.1.3.4 Βασικά βήματα που εμπλέκονται σε μία συστοιχία (Array)

Ολικό RNA απομονώνεται από βιολογικά δείγματα και χρησιμοποιείται για το σχηματισμό ιχνηθετημένων cRNAs ή cDNAs που θα αποτελούν το στόχο μας. Η ιχνηθέτηση μπορεί να γίνει είτε με μια φθορίζουσα ουσία είτε με μια χημική ομάδα που έχει τη δυνατότητα αργότερα να ανιχνευθεί με μια φθορίζουσα ουσία. Κατόπιν, μείγματα από ιχνηθετημένους στόχους επωάζονται στην μικροσυστοιχία ή GeneChip για την υβριδοποίηση τους με συμπληρωματικές αλληλουχίες οι οποίες βρίσκονται σε προκαθορισμένες θέσεις. Το ποσό κάθε ιχνηθετημένου στόχου που υβριδοποιείται, είναι αντιπροσωπευτικό ενός μόνο γονιδίου και ανάλογο της έκφρασης του στο αρχικό δείγμα. Για να υπολογιστεί η ποσότητα του ιχνηθετημένου στόχου μετράται ο φθορισμός κάθε θέσης στην μικροσυστοιχία. Το ποσό του φθορισμού είναι ανάλογο του αριθμού των προσδεμένων ζευγαριών των cRNAs ή cDNAs σε κάθε θέση.

1.1.3.5 Δημιουργία cDNA μικροσυστοιχιών

Τα εμπλεκόμενα βήματα για τη δημιουργία cDNA μικροσυστοιχιών μπορούν να γίνουν σε πολλά διαφορετικά εργαστήρια μοριακής βιολογίας. Κατά πρώτον καλλιεργούνται βακτήρια που έχουν διαφορετικούς ένθετους σε πλασμίδια cDNA κλώνους. Στη συνέχεια απομονώνονται τα πλασμίδια τους και πραγματοποιείται αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) [28] για να αυξηθεί το ένθετο cDNA, δηλαδή τα πλασμίδια που περιέχουν το ένθετο cDNA δεν τοποθετούνται απευθείας στις συστοιχίες. Αυτό χρησιμεύει στην σημαντική αύξηση της μοριακής ποσότητας των γνωστών πολυνουκλεοτιδικών αλληλουχιών (probes) σε κάθε θέση και στην μείωση του τυχαίου υβριδισμού. Μερικά πρωτόκολλα χρησιμοποιούν απευθείας μια μικρή ποσότητα κατεψυγμένης βακτηριακής καλλιέργειας αντί να χρησιμοποιήσουν καθαρό πλασμιδιακό DNA ως μήτρα για την PCR αντίδραση. Εν τούτης αυτή η προσέγγιση συνδέεται με χαμηλή ιδιότητα απόδοσης στην αντίδραση της PCR.

1.1.4 Η διαδικασία της τεχνικής

Σε μια τυπική εφαρμογή, δείγματα νουκλεϊκού οξέως υψηλής πυκνότητας όπως cDNAs ή ολιγονουκλεοτιδίων, τοποθετούνται (ή εκτυπώνονται) από ένα ρομποτικό σύστημα πάνω σε πολύ μικρές διακριτές περιοχές αντικειμενοφόρων γυάλινων πλακών μικροσκοπίου ή μεμβρανικών φίλτρων.

Η προκύπτουσα μικροσυστοιχία υβριδοποιείται τότε με ένα ιχνηθετημένο σύνθετο μίγμα νουκλεϊκών οξέων (target) το οποίο προέρχεται από μια επιθυμητή πηγή. Αφότου γίνει η υβριδοποίηση, οι δείκτες φθορισμού ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας έναν υψηλής ανάλυσης σαρωτή μονοχρωματικής ακτινοβολίας (laser scanner). Κάθε τρόπος γονιδιακής έκφρασης λαμβάνεται, από την ανάλυση του εκπεμπόμενου σήματος από κάθε σημείο (spot) με ψηφιακή απεικόνιση μέσω

κάποιου λογισμικού. Έτσι, ο τρόπος γονιδιακής έκφρασης του προς μελέτη δείγματος μπορεί να συγκριθεί με εκείνον του ελέγχου, με διαφορικές αναλύσεις.

1.1.4.1 Συγκεκριμένες προσεγγίσεις στην ανάλυση της έκφρασης γονιδίων

Στο παρελθόν οι ερευνητές καλούνταν να επιλέξουν μία από τις δύο τεχνολογίες που τώρα είναι ευρέως διαθέσιμες για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων. Η πρώτη τεχνολογία, χρησιμοποιούσε μικροσυστοιχίες φτιαγμένες με ρομποτική τοποθέτηση και ακινητοποίηση καθαρού cDNA ή συνθετικών ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε αντικειμενοφόρους πλάκες. Αυτή η προσέγγιση εμφανίστηκε στην δεκαετία του 80, ενώ αργότερα, στις αρχές της δεκαετίας του 90 βελτιώθηκε για να καταλήξει στην παρούσα μορφή της. Λόγω του ότι τοποθετούνται πραγματικά cDNAs, αυτή η μέθοδος χρειάζεται καταγραφή, παραγωγή και καθαρισμό πλασμιδίων από ξεχωριστούς βακτηριακούς κλώνους, PCR και καθαρισμό του cDNA. Τώρα οι DNA μικροσυστοιχίες είναι βιομηχανοποιημένες και πωλούνται από αρκετούς εμπορικούς αντιπροσώπους ή μπορούν να φτιαχτούν τοπικά σε ένα ερευνητικό κέντρο που διαθέτει τα κατάλληλα μέσα. Επιπροσθέτως υπάρχει η δυνατότητα επιλογής για ιχνηθέτηση με ένα ή δύο χρώματα. Για τα πειράματα ενός χρώματος, ένα μοναδικό δείγμα υβριδοποιείται στη συστοιχία. Για τα πειράματα δύο χρωμάτων, δύο δείγματα RNA, τα οποία έχουν ιχνηθετηθεί με διαφορετικές χρωστικές ουσίες, αναμιγνύονται και υβριδοποιούνται στην ίδια μικροσυστοιχία. Τα πειράματα δύο χρωμάτων μπορούν να παρέχουν ευλυγισία, αφού το δεύτερο δείγμα μπορεί να είναι είτε ένα πειραματικό δείγμα είτε ένα σταθερό δείγμα RNA το οποίο εφαρμόζεται σε όλες τις συστοιχίες [29]. Παρότι η αρχική ιδέα των δύο χρωμάτων ήταν ότι ο ανταγωνιστικός υβριδισμός θα μείωνε τα σφάλματα λόγω της ποικιλομορφίας στην συστοιχία, παρατηρήθηκε μέσα από καλά ελεγχόμενα πειράματα, ότι αναλύοντας τα δυο δείγματα ξεχωριστά, παρά δημιουργώντας αναλογίες, μπορούσαμε να αυξήσουμε την ακρίβεια του πειράματος. Οι πλατφόρμες που υπάρχουν σήμερα στο εμπόριο είναι κυρίως ενός χρώματος ολιγονουκλεοτιδικές μικροσυστοιχίες. Η πλατφόρμα Agilent [23] αποτελεί εξαίρεση, αφού έχει σχεδιαστεί σαν σύστημα δύο χρωμάτων. Οι περισσότεροι κατασκευαστές προσφέρουν εστιασμένες συστοιχίες για συγκεκριμένα πεδία έρευνας. Παρέχουν επίσης και τη δυνατότητα για τον σχεδιασμό και την κατασκευή ειδικών συστοιχιών κατά παραγγελία.

Η δεύτερη προσέγγιση εμπλέκει συστοιχίες κατασκευασμένες με επιτόπου σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίων, απευθείας σε λεπτό στρώμα πυριτίου ή “chips” γνωστή στο εμπόριο ως “Affymetrix GeneChip” [4]. Τα GeneChips βασίζονται σε μια μετατροπή της φωτολιθογραφικής διαδικασίας που χρησιμοποιείται στην βιομηχανία των επεξεργασιών για ηλεκτρονικούς υπολογιστές. Πολλαπλές γνωστές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (probes) επιλέγονται να αντιπροσωπεύσουν κάθε ξεχωριστό γονίδιο. Οι αλληλουχίες επιλέγονται να σύντιθούν in situ πάνω στα λεπτά στρώματα πυριτίου που έχουν περάσει από ηλεκτρονική διαλογή με κάποιο

λογισμικό που είναι σχεδιασμένο :

1) να βελτιώνει τα ζητούμενα oligονουκλεοτιδικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και

2) να αποφεύγει την ομοιότητα με άλλες γνωστές μεταγραφόμενες ή επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Αφού οι oligονουκλεοτιδικές αλληλουχίες έχουν σχεδιαστεί και συντεθεί εξολοκλήρου βασιζόμενες σε πληροφορίες αλληλουχίας, αποφεύγεται η μεταχείριση χιλιάδων διαφορετικών cDNA κλώνων.

Ωστόσο πρέπει να αναφερθεί πως μεταξύ αυτών των δύο προσεγγίσεων υπάρχουν σημαντικές διαφορές 1) στον τρόπο που εκπροσωπούνται τα διαφορετικά γονίδια και 2) στο πως ποσοτικοποιείται η έκφρασή τους.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ένας αριθμός από ανταγωνιστικά chips θεμελιωμένων oligονουκλεοτιδίων υπάρχουν προς χρήση για τις διαφορετικές μεθοδολογίες. Σε μια πρόσφατη προσέγγιση έγινε χρήση καθιερωμένων μονομερών φωσφοραμίδης που κατανεμήθηκαν πάνω σε μια τροποποιημένη γυάλινη επιφάνεια με εμπορικό αεριοθούμενο μελάνι τυπογραφικών κεφαλών. Μια άλλη στρατηγική χρησιμοποιεί μικρά oligονουκλεοτίδια ή πεπτίδια νουκλεϊκών οξέων ανιχνευτών (probes) (τυπικά 25-μερή έως 80-μερή) που συντίθενται με παραδοσιακή oligονουκλεοτιδική σύνθεση ακολουθούμενη από ρομποτική τοποθέτηση ή εκτύπωση και επιφανειακή πρόσδεση.

1.1.4.2 Σύγκριση των πλατφορμών διαφορετικών κατασκευαστών

Παρά τις προσπάθειες δημιουργίας ενός προτύπου για την παρουσίαση των δεδομένων που προκύπτουν από μικροσυστοιχίες, οι περισσότερες απόπειρες για σύγκριση αποτελεσμάτων τα οποία προέρχονται από διαφορετικές πλατφόρμες τείνουν να έχουν μικρό ποσοστό ταύτισης. Οι αιτίες των αντιφάσεων που προκύπτουν έχουν αναγνωριστεί και είναι οι εξής:

- 1) η δυσκολία σύγκρισης πλατφόρμων στο επίπεδο του γονιδίου,
- 2) η εφαρμογή διαφορετικών πρωτόκολλων κατά την προετοιμασία των δειγμάτων,
- 3) και οι διαφορετικές στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατά την ανάλυση των δεδομένων που προκύπτουν από τα πειράματα

Όταν έγινε σύγκριση μεταξύ πλατφόρμων που χρησιμοποιούν cDNA και κοντές-oligονουκλεοτιδικές αλληλουχίες, παρατηρήθηκε πως τείνουν προς την ίδια κατεύθυνση όσον αφορά την διαφορετική έκφραση, αλλά όχι όσον αφορά το μέγεθος. Παρατηρήθηκε επίσης ότι τα αποτελέσματα παρουσίαζαν περισσότερες διαφορές όταν προέρχονταν από διαφορετικά εργαστήρια παρά από διαφορετικές πλατφόρμες, όταν τα ίδια δείγματα ερευνώνταν σε διαφορετικά μέρη. Η συνέπεια των αποτελεσμάτων μεταξύ των εργαστηρίων και των πλατφόρμων βελτιώθηκε, όταν εφαρμόστηκαν κοινές μέθοδοι και όταν επιτεύχθηκε καλύτερη συνέπεια μεταξύ των αντιγράφων των δειγμάτων.

Η διαφορά μεταξύ των πλατφόρμων βρίσκεται στο πλήθος και το μήκος των ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών που είναι τυπωμένες επάνω στις μικροσυστοιχίες έχοντας είτε κοντές-ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (20-30 βάσεις) είτε μακριές-ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες (50-70 βάσεις). Οι μακριές αλληλουχίες έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία και είναι καλύτερες για την ανάλυση μικρών σε αριθμό mRNAs, οι κοντές αλληλουχίες έχουν καλύτερη ειδικευση, αφού είναι λιγότερο πιθανό να υβριδοποιηθούν με άλλα RNAs. Οι περισσότερες πλατφόρμες έχουν μία γνωστή αλληλουχία (probe) για κάθε άγνωστη (target), κάθε γνωστή αλληλουχία εμφανίζεται μόνο μία φορά σε συγκεκριμένη θέση στην συστοιχία. Τρεις πλατφόρμες έχουν πολλαπλές γνωστές αλληλουχίες για κάθε άγνωστη: οι Illumina BeadChips [30] έχουν πάνω από 20 τυχαίως τοποθετημένα, τεχνητά αντίγραφα για κάθε γνωστή αλληλουχία, οι Affymetrix 3'GeneChips [4] έχουν 11 ζεύγη γνωστών αλληλουχιών σε κάθε ομάδα αλληλουχιών και οι GeneChip Gene ST [4] αλληλουχίες έχουν από 26 γνωστές αλληλουχίες για κάθε γονίδιο.

Επιπλέον όσον αφορά τις διαφορές στην τεχνολογία, οι εταιρείες διαφέρουν επίσης στον αριθμό των συγκεκριμένων αλληλουχιών ανά είδος που προσφέρουν. Η Affymetrix, μέσω του GeneChip Consortia Program [31] της προσφέρει ένα πλήθος μικροσυστοιχιών για την υποστήριξη διαφορετικών ερευνών σε ευκαρυωτικά γονιδιώματα. Όλοι οι κατασκευαστές παρέχουν συστοιχίες ολόκληρου του γονιδιώματος για τον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο. Στον πίνακα 1 γίνεται η σύγκριση των πλατφόρμων των διάφορων κατασκευαστών.

Πίνακας 1.

Σύγκριση των πλατφόρμων διαφορετικών κατασκευαστών, επεξεργασίας μικροσυστοιχιών ανθρώπινου γονιδιώματος. Τα δεδομένα έχουν ληφθεί από τις ιστοσελίδες των κατασκευαστών.

Κατασκευαστής: συστοιχία	Μήκος ολιγονουκλεοτιδίων	Τοποθέτηση ολιγονουκλεοτιδίων	Αλληλουχίες στόχοι (targets)	Probes ανά Target	Πλήθος καθορισμένων θέσεων	Πλήθος συστοιχιών ανά επιφάνεια (slide)	Τοποθεσία αλληλουχίας (probe)
Affymetrix: U133 plus 2 [4]	25	In-situ φωτολιθογραφία	54.000	11 ζεύγη	1.300.000	1	3' άκρο
Affymetrix: Human gene ST 1.0 [4]	25	In-situ φωτολιθογραφία	28.869	26	764.885	1	Εξώνια
Agilent: Human 4 x 44k [23]	60	In-situ ψεκασμός με μελάνι	42.000	1	44.000	4	3' άκρο
Applied Biosystems: Human genome survey v2 [32]	60	Spotted	34.000	1	35.000	1	3' άκρο
Applied Microarrays: CodeLink human whole genome [33]	30	Spotted	57.347	1	54.841	1	3' άκρο
Illumina: Human-6 v2 [30]	50	Beads	48.000	1 x >20	1.800.000	6	3' άκρο
Illumina: HumanRef-8v2 [30]	50	Beads	22.000	1 x >20	900.000	8	3' άκρο
Nimblegen: HG18 [34]	60	In-situ φωτολιθογραφία	47.633	8	385.000	1	3' άκρο
Nimblegen: Hg18 4plex [34]	60	In-situ φωτολιθογραφία	24.000	3	72.000	4	3' άκρο
Phalanx Biotech: Human OneArray [35]	60	Spotted	30.968	1	32.050	1	3' άκρο

1.1.4.3 Γονιδιακό περιεχόμενο

Οι περισσότερες εμπορικές μικροσυστοιχίες με γονίδια ανθρώπων, ποντικών και αρουραίων έχουν κοινές αλληλουχίες στόχους που προέρχονται κυρίως από αντίγραφα της Συλλογής Αλληλουχιών Αναφοράς (Reference Sequence collection, RefSeq) [36] του Εθνικού Κέντρου για Πληροφορίες Βιοτεχνολογίας (National Center for Biotechnology Information, NCBI) [37]. Κάθε κατασκευαστής προσπαθεί να διευρίνει αυτό το βασικό σετ καλά προσδιορισμένων αλληλουχιών στόχων, σε μία προσπάθεια να γίνει η αντιστοίχιση όλων των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στο γονιδίωμα. Πηγές για περισσότερες αλληλουχίες στόχους αποτελούν, οι UniGene ομάδες [38] οι οποίες περιέχουν περιορισμένο αριθμό ακολουθιών επιλεγμένων γονιδίων (EST, Expressed Sequence Tag), ακολουθίες οι οποίες δεν είναι διαθέσιμες για το κοινό, και τα προβλεπόμενα γονίδια. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα probes είχαν σχεδιαστεί για να στοχεύουν το 3' άκρο των αλληλουχιών μεταγραφής (transcripts). Η δυνατότητα χαρτογράφησης μεμονομένων αλληλουχιών πάνω στο γονιδίωμα οδήγησε στη συγχώνευση των μεταγραφόμενων περιοχών. Οι δημόσιες βάσεις δεδομένων ενημερώνονται συνεχώς και οι ομάδες UniGene αναθεωρούνται σε τακτική βάση, κάτι το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση των ομάδων και την επανατοποθέτηση κάποιων αλληλουχιών σε διαφορετική ομάδα από εκείνη στην οποία είχαν καταταχθεί αρχικά. Μία συνέπεια αυτού είναι το ότι probes, τα οποία είχαν χαρτογραφηθεί σε διαφορετικά γονίδια, βρέθηκε ότι τελικά χαρτογραφούνται στο ίδιο γονίδιο, σε μερικές περιπτώσεις μάλιστα και στην ίδια περιοχή μεταγραφής. Αυτή η περίσσεια πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη κατά τη διάρκεια της βιολογικής ερμηνείας των αποτελεσμάτων ενός πειράματος. Επίσης μπορεί να αναθεωρηθεί η θέση κάποιων probes τα οποία είχαν χαρτογραφηθεί σε ένα γονίδιο, και να χαρτογραφηθούν σε κάποιο άλλο, το φαινόμενο αυτό μπορεί να προκαλέσει σύγχυση κατά τη διάρκεια της επανεξέτασης των λιστών γονιδίων. Κατ' επέκταση πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη σημασία στα αποτελέσματα που προκύπτουν από πειράματα μικροσυστοιχιών στα οποία η αλληλουχία στόχου αποτελεί μια αυθεντική μεταγραφή του γονιδίου στο οποίο χαρτογραφείται. Οι κατασκευαστές μικροσυστοιχιών ανανεώνουν τις λίστες χαρτογράφησης των αλληλουχιών, αλλά συνήθως οι αναθεωρήσεις αυτές δεν γίνονται με χρονική συνέπεια και σε συγχρονισμό με τις δημόσιες βάσεις δεδομένων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε συγκρούσεις μεταξύ των πληροφοριών που παρέχονται από τις δημόσιες βάσεις δεδομένων και των σχολιασμό των αλληλουχιών που παρέχουν οι κατασκευαστές μικροσυστοιχιών.

1.1.4.4 Προεπεξεργασία των δεδομένων

Τα Affymetrix GeneChips συντίθενται χρησιμοποιώντας μια διαδικασία συνδυασμού φωτολιθογραφίας με μια διαφοροποιημένη χημική σύνθεση DNA στερεάς φάσης. Για την απευθείας σύνθεση στο χώρο διαφορετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ένα σύνολο από φωτολιθογραφικές μάσκες βιομηχανοποιούν την διαδοχική προσθήκη ειδικών δεοξυνουκλεοτιδίων σε καθορισμένες θέσεις στα chips ή features. Σε μια σειρά από επαναλαμβανόμενα βήματα, μια λάμπα υδραργύρου ανάβει δια μέσου της φωτολιθογραφικής μάσκας, επιτρέποντας την κατά βούληση φωτοπροστασία κάποιων θέσεων. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθεί μια χημική ομάδα που διαφορετικά θα εμπόδιζε τη χημική ένωση του επόμενου δεοξυνουκλεοτιδίου.

Στο επόμενο βήμα, ένα δραστικό δεοξυνουκλεοτίδιο προστίθεται επεκτείνοντας μόνο τα ολιγονουκλεοτίδια που έχουν φωτιστεί κατά τη διάρκεια του προηγούμενου βήματος. Αυτή η διαδικασία είναι διαδοχικά επαναλαμβανόμενη για να συνθέσει διαφορετικά 25-μερή ολιγονουκλεοτιδίων σε εκατοντάδες χιλιάδες ξεχωριστές επιφάνειες 24x24-μm (features) που βρίσκονται σε σιλικονορισμένες επιφάνειες 1,28x1,28-cm. Τα Affymetrix GeneChips [4] χρησιμοποιούν ένα υπεράριθμο σύνολο από ανιχνευτές (probes) για κάθε γονίδιο.

Διαφορετικά γονίδια εκπροσωπούνται πάνω στο GeneChip χρησιμοποιώντας ένα σύνολο (τυπικά 16-20) διαφορετικών “τέλεια ταιριασμένων” (perfect match, PM) 25-μερών ολιγονουκλεοτιδίων. Κάθε probe αλληλουχία επιλέγεται με βάση τη συμπληρωματικότητά της με το επιλεγμένο γονίδιο ή EST, τη μοναδικότητά της όσον αφορά τα διαφορετικά συσχετιζόμενα γονίδια, καθώς επίσης και βάση της μη ύπαρξης συμπληρωματικότητας σε διαφορετικές υψηλά εκφραζόμενες αλληλουχίες (tRNA, rRNA, alu-like αλληλουχίες, διαχειριστικά γονίδια).

Για κάθε σύνολο από “τέλεια ταιριασμένους” (PM) ολιγονουκλεοτιδικούς ανιχνευτές, υπάρχει επίσης και ένα ζευγαρωμένο σύνολο από αταίριαστους (mismatch) ανιχνευτές (MM). Οι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες που χρησιμοποιούνται για το σύνολο των MM ανιχνευτών είναι πανομοιότυπες με αυτές του συνόλου των PM ανιχνευτών, με τη διαφορά ότι οι αλληλουχίες των PM είναι φτιαγμένες έτσι ώστε να έχουν σε κεντρική θέση μια μόνο βάση αντικατεστημένη. Οι MM ανιχνευτές δρουν ως εσωτερικοί έλεγχοι και προσδιορίζουν το βάθος των σημάτων (π.χ. υβριδισμός μη ειδικών αλληλουχιών) που υπάρχει σε σύνθετα δείγματα. Το “ειδικό” σήμα υβριδισμού καθορίζεται από αφαίρεση του MM φθορισμού από τον PM φθορισμό, δίνοντας βάση σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο μέσω του μέσου όρου των probes ζευγαριών. Ο υπολογισμός του μέσου όρου του φθορισμού αντανακλάται στην αφθονία της μεταγραφής. Πειραματικά αυτή η στρατηγική, επιτρέπει υψηλή ευαισθησία σε χαμηλές συγκεντρώσεις στόχου (target) διαχωρίζοντας μεταξύ τους προσεκτικά τις συσχετιζόμενες αλληλουχίες. Έτσι το Affymetrix Software ανιχνεύει αν κάθε ξεχωριστό γονίδιο βρίσκεται σε περρίσεια ή απουσιάζει διαμέσου της υβριδοποίησης των probes ζευγαριών (PM και MM διαφορές και αναλογίες), χρησιμοποιώντας την ένταση του υβριδισμού. Αυτή η

παραμετρική ανάλυση αξιολογεί τα συμπεράσματα που έχουν εξαχθεί πειραματικά και αφορούν την αξιόπιστη ανίχνευση μετεγγραμμένων γονιδίων και διαφορετικών RNAs που υπάρχουν σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης.

Ωστόσο η ύπαρξη προκαρυωτικών και βακτηριοφαγικών γονιδίων είναι απαραίτητη σε μια συστοιχία, για να χρησιμοποιηθούν ως controls για τις συνθήκες υβριδισμού. Πολυαδενινικό RNA, φτιαγμένο *in vitro*, προστίθεται ως control στο αρχικό δείγμα RNA σε καθορισμένες συγκεντρώσεις έτσι ώστε να μπορεί να παρακολουθηθεί η ευαισθησία της ανίχνευσης. Κατά αυτόν τον τρόπο οι GeneChip συστοιχίες προσφέρουν μια εκτίμηση του απόλυτου επιπέδου έκφρασης όταν χρησιμοποιούνται τα κατάλληλα ευκρινή στοιχεία ελέγχου. Κάθε GeneChip σχεδιάζεται για την ανάλυση ενός μόνο δείγματος RNA.

Αντιθέτως, οι cDNA μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται συνήθως για τη συγκριτική ανάλυση μεταξύ ενός ιχνηθετημένου στόχου και ενός προτύπου στο προς εξέταση δείγμα χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα δύο διαφορετικές χρωστικές για την υβριδοποίηση. Τα πειραματικά αποτελέσματα εκφράζονται ως μια πτυχωτή μεταβολή αναλογίας (fold change ratio) σχετική με το δείγμα ελέγχου. Αυτό χρειάζεται ως ένας εσωτερικός έλεγχος για τις διαφορές στο ποσό του εκτυπωμένου cDNA στην μικροσυστοιχία και επιτρέπει να αναλύονται δύο δείγματα σε μία μόνη συστοιχία.

Μια τελευταία διαφορά μεταξύ των συστοιχιών βασισμένων σε cDNA και των Affymetrix ολιγονουκλεοτιδικών συστοιχιών έχει να κάνει με τις ειδικές διαφορές που προέρχονται από τα διαφορετικά μήκη των αλληλουχιών. Οι μεγαλύτερες αλληλουχίες που είναι παρούσες στις cDNA μικροσυστοιχίες, είναι περισσότερο πιθανό να υποστούν σταθερή διασταυρούμενη-υβριδοποίηση με τις παρούσες σχετικά όμοιες αλληλουχίες στον πληθυσμό των ιχνηθετημένων μορίων στόχων. Αυτό μπορεί να προκύψει από παρεμβολή άλλων μελών στενά συσχετισμένων γονιδιακών οικογενειών.

Τα Affymetrix GeneChips είναι λιγότερο ευαίσθητα σ' αυτόν τον τύπο παρεμβολής, διότι εκεί αυτά που δεν ταιριάζουν οδηγούν σε μεγαλύτερη αστάθεια μεταξύ της ολιγονουκλεοτιδικής αλληλουχίας και του ιχνηθετημένου στόχου και επίσης γιατί το συμφύες σινιάλο λόγω κακού ζευγαρώματος αφαιρείται (ομάδα MM ανιχνευτών).

1.1.5 Γιατί είναι σημαντικές οι μικροσυστοιχίες

Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών αποτελεί μια σημαντική τεχνολογική πρόοδο, καθώς μπορεί να ερευνηθεί ταυτόχρονα ένας τεράστιος αριθμός γονιδίων αλλά και λόγω του μικρού μεγέθους τους. Οι μικροσυστοιχίες είναι επομένως χρήσιμες όταν θέλει κανείς να ερευνησει έναν μεγάλο αριθμό γονιδίων γρήγορα ή όταν το δείγμα που μελετάται είναι μικρό. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην έρευνα για την έκφραση γονιδίων μέσα σε ένα ενιαίο δείγμα ή στη σύγκριση της έκφρασης γονιδίων σε δύο διαφορετικούς τύπους κυττάρων ή δειγμάτων, όπως σε δείγματα υγιών και ασθενών. Επειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την

ταυτόχρονη εξέταση της έκφρασης εκατοντάδων ή χιλιάδων γονιδίων, έχουν φέρει επανάσταση στον τρόπο με τον οποίο εξετάζεται η γονιδιακή έκφραση.

Η τεχνολογία αυτή θεωρείται ότι βρίσκεται ακόμα σε αρχικό στάδιο, επομένως πολλές αρχικές μελέτες που χρησιμοποιούν μικροσυστοιχίες αποτελούν απλές έρευνες για τα σχεδιαγράμματα έκφρασης γονιδίων σε ποικίλους τύπους κυττάρων. Εντούτοις, αυτές οι μελέτες αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό και απαραίτητο πρώτο βήμα στην κατανόησή και την καταγραφή του ανθρώπινου γονιδιώματος. Η αρχική φιλοσοφία στον σχεδιασμό μικροσυστοιχιών έκφρασης γονιδίων ήταν να γίνει μέτρηση της έκφρασης όλων των γονιδίων που κωδικοποιούνται σε πρωτεΐνες. Παρ'όλα αυτά με την τελειοποίηση της χαρτογράφησης ολόκληρου του γονιδιώματος έγινε ξεκάθαρο ότι οι αρχικές εκτιμήσεις για τον πλήθος των γονιδίων που εκφράζονται ήταν υπερβολικές. Η συνεχής μείωση του πλήθους αυτού θα οδηγήσει στην ελάττωση του περιεχομένου των πλατφόρμων μικροσυστοιχιών έκφρασης γονιδίων, σταδιακά οδηγώντας στο να παρουσιάζεται το ίδιο σύνολο γονιδίων σε κάθε πλατφόρμα.

Καθώς οι επιστήμονες αποκτούν όλο και περισσότερη γνώση, θα είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν τις μικροσυστοιχίες για να εξετάσουν περισσότερο σύνθετα ερωτήματα και να εκτελέσουν πιο περίπλοκα πειράματα. Με τις νέες εξελίξεις στην τεχνολογία θα είναι σε θέση να συμπεράνουν τις πιθανές λειτουργίες των νέων γονιδίων βασισμένοι στις ομοιότητες που έχουν τα σχέδια έκφρασής τους με εκείνα των ήδη γνωστών γονιδίων. Τελικά, αυτές οι μελέτες υπόσχονται να επεκτείνουν το μέγεθος των υπάρχουσών οικογενειών γονιδίων, να αποκαλύψουν νέα πρότυπα της συντονισμένης έκφρασης σε αυτές, και να ανακαλύψουν εξ' ολοκλήρου νέες γονιδιακές κατηγορίες. Επιπλέον, επειδή το προϊόν ενός γονιδίου αλληλεπιδρά συνήθως με εκείνα πολλών άλλων, η συντισταμένη αυτών των αλληλεπιδράσεων θα γίνει σαφέστερη μέσω τέτοιων αναλύσεων, και θα προκύψει η ακριβής γνώση αυτών των αλληλεξαρτήσεων.

Η χρήση των μικροσυστοιχιών μπορεί επίσης να επιταχύνει τον προσδιορισμό των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη διάφορων ασθενειών, παρέχοντας την ευκολία στους επιστήμονες να εξετάζουν ταυτόχρονα έναν πολύ μεγάλο αριθμό γονιδίων. Η τεχνολογία αυτή θα βοηθήσει επίσης στην εξέταση ολόκληρης της γονιδιακής έκφρασης και λειτουργίας σε κυτταρικό επίπεδο, αποκαλύπτοντας πώς πολλά γονιδιακά προϊόντα λειτουργούν μαζί για να παραγάγουν τις φυσικές και χημικές απαντήσεις στις στατικές και μεταβαλλόμενες κυτταρικές ανάγκες.

Η ανάλυση δεδομένων μικροσυστοιχιών έχει γίνει κατα γενική ομολογία αποδεκτή από το κοινό. Παρ'όλα αυτά, εξελίξεις στην τεχνολογία των μικροσυστοιχιών, νέες ανταγωνιστικές τεχνολογίες και η προετοιμασία των δειγμάτων θα προκαλέσουν την ανάγκη δημιουργίας νέων μεθόδων ανάλυσης ή βελτίωσης των ήδη υπάρχουσών μεθόδων. Είναι απαραίτητη η βελτίωση στις μεθόδους κατηγοριοποίησης και η δημιουργία νέων μεθόδων ομαδοποίησης (clustering) που θα επικεντρώνονται στη βιολογική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Λόγω του αυξημένου ενδιαφέροντος στη μετα-ανάλυση και διασπορά των γονιδίων μεταξύ των μελετών και μεταξύ των διαφορετικών πλατφόρμων θα πρέπει να

υπάρξουν κάποιες βελτιώσεις στις μεθόδους ανάλυσης δεδομένων. Επίσης, τα δεδομένα από πειράματα έκφρασης γονιδίων με μικροσυστοιχίες χρησιμοποιούνται συχνά πλέον μαζί με άλλους τύπους δεδομένων για την εξαγωγή συμπερασμάτων ευρύτερης βιολογικής έννοιας, η διαδικασία αυτή ονομάζεται βιολογία συστημάτων. Αυτή αποτελεί έναν γρήγορα αναπτυσσόμενο κλάδο και η ομαδοποίηση αυτών των ανόμοιων τύπων δεδομένων αποτελεί μια πρόκληση.

1.1.5.1 Η πιθανή συμβολή της τεχνολογίας μικροσυστοιχιών στη θεραπεία ασθενειών

Τώρα που έγινε κατανοητή η έννοια της τεχνολογίας της συστοιχίας, ας σκεφτούμε ένα φορητό εργαλείο που ένας γιατρός θα μπορούσε να χρησιμοποιήσει για να εντοπίσει γρήγορα τον καρκίνο ή άλλες ασθένειες κατά τη διάρκεια μιας εξέτασης ρουτίνας. Επίσης το ίδιο όργανο θα μπορούσε να βοηθήσει σε μια εξατομικευμένη θεραπευτική αγωγή, δημιουργημένη ακριβώς για κάθε άτομο ξεχωριστά.

- Εξατομικευμένα φάρμακα.
- Μοριακά διαγνωστικά.
- Ολοκλήρωση της διάγνωσης και της θεραπείας.

Αυτές είναι οι μακροπρόθεσμες επιτυχίες που υπόσχεται η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών. Ίσως όχι σήμερα ή ακόμα και αύριο, αλλά κάποια μέρα (Εικόνα 5).

Για πρώτη φορά, οι συστοιχίες προσφέρουν την ελπίδα για τη λήψη σφαιρικών απόψεων όσον αφορά τις βιολογικές εργασίες—κατανόηση των διεργασιών των τμημάτων όλου του σώματος—με την παροχή ενός συστηματικού τρόπου για να ερευνηθεί η ποικιλομορφία του DNA και του RNA. Το NCBI [37] με τη συνέχιση των προσπαθειών του για να παρέχει ένα τυποποιημένο πρότυπο για τα δεδομένα των μικροσυστοιχιών και να παρέχει ελεύθερη, και καθολική πρόσβαση σε αυτά, βοηθά την επιστημονική κοινότητα στο να πραγματοποιήσει αυτούς τους στόχους.

Εν συντομία: Εφαρμογές Μικροσυστοιχιών	
Τύπος Μικροσυστοιχίας	Εφαρμογή
CGH [11]	Ταξινόμηση όγκων, αξιολόγηση του κινδύνου, και πρόβλεψη πρόγνωσης.
Ανάλυση έκφρασης	Ανάπτυξη φαρμάκων, αντίδραση φαρμάκων, και ανάπτυξη θεραπειάς.
Ανάλυση μετάλλαξης πολυμορφισμού	Ανάπτυξη φαρμάκων, ανάπτυξη θεραπείας, και παρακολούθηση προόδου ασθενειών.

Εικόνα 5. Παρουσίαση των εφαρμογών των μικροσυστοιχιών.

1.1.6 Δημόσιες βάσεις δεδομένων για δεδομένα έκφρασης γονιδίων

1.1.6.1 Το NCBI και η διαχείριση δεδομένων από μικροσυστοιχίες

Είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός ομοιόμορφου συστήματος που θα μπορεί να διαχειρίζεται και να παράσχει ένα σημείο αποθήκευσης για τα δεδομένα που προέρχονται από μικροσυστοιχίες. Το πλήθος των δεδομένων που μπορεί ενδεχομένως να παραχθεί χρησιμοποιώντας ένα μοναδικό τσιπ είναι πολύ μεγάλο, εάν υποθέσουμε ότι το τσιπ περιέχει 30.000 σημεία του DNA στόχου. Οι ερευνητές που ερμηνεύουν τα δεδομένα που παράγονται από ένα συγκεκριμένο τσιπ θα πρέπει να ξέρουν τη βιολογική ταυτότητα κάθε στόχου, ποιά είναι η θέση του κάθε γονιδίου, τις βιολογικές ιδιότητες του DNA των προτύπων και των δειγμάτων, τις πειραματικές συνθήκες και τις διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στην οργάνωση του πειράματος. Το NCBI θα βοηθήσει αναμφισβήτητα στην κατανόησή της έκφρασης και της οργάνωσης των γονιδίων, δημιουργώντας πολλές νέες προκλήσεις, για παρακολούθηση και ανάλυση τέτοιων δεδομένων.

1.1.6.2 Βιολογική ερμηνεία

Όταν καθοριστεί μια λίστα από γονίδια που εκφράζονται διαφορετικά, το επόμενο βήμα είναι ο καθορισμός των βιολογικών διαδικασιών που αναπαριστά η λίστα αυτή. Οι πληροφορίες που σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο γονίδιο, ο σχολιασμός, είναι διαθέσιμες σε πολλές πηγές στο διαδίκτυο [39-41]. Το NCBI έχει πολλές πηγές σχολιασμού [42], συμπεριλαμβανομένου του Entrez Gene, το οποίο παρέχει ένα μεγάλο όγκο πληροφοριών για γονίδια αρκετών οργανισμών. Υπάρχουν παρόμοιες πηγές στο Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (European Bioinformatics Institute, EBI) [43]. Δύο πηγές παροχής εκτεταμένου σχολιασμού σε επίπεδο γονιδίων και ολόκληρου γονιδιώματος είναι οι Ensembl [44] και UCSC Genome Browser [45], που περιέχουν πληροφορίες για την τοποθεσία των σετ των Affymetrix probes. Για οργανισμούς διαφορετικούς από τον άνθρωπο, το ποντίκι και τον αρουραίο ο σχολιασμός που υπάρχει είναι ανεπαρκής. Οργανισμοί που μελετούνται εκτενώς, όπως η μαγιά και η φρουτόμυγα, έχουν αρκετά εκτενής πηγές πληροφοριών. Πολλοί οργανισμοί με χαρτογραφημένο γονιδίωμα έχουν περιορισμένο πλήθος πληροφοριών, οι οποίες συχνά βρίσκονται σε κάποια εξειδικευμένη βάση δεδομένων η οποία δεν παρέχει προσिता μέσα προσπέλασης. Οι βάσεις δεδομένων Gene Ontology (GO) [46] και Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [47] χρησιμοποιούνται ευρέως για την απόκτηση πληροφοριών που αφορούν λειτουργίες που σχετίζονται με γονίδια.

Θεωρείται εύκολη διαδικασία η συλλογή πληροφοριών που αφορούν ένα μόνο γονίδιο, παρότι είναι χρονοβόρα, αλλά δεν είναι εύκολη η αναγνώριση ευρέων

βιολογικών προτύπων μέσω αυτής της διαδικασίας. Οι λίστες μικροσυστοιχιών γονιδίων μπορούν να περιέχουν χιλιάδες καταχωρήσεις, έτσι μπορεί να καταστεί δύσκολο να γίνει επερώτηση σε μία βάση δεδομένων για να ληφθούν όλες οι σχετικές πληροφορίες καθώς και πληροφορίες παρόμοιων προτύπων. Για την GO έχουν δημιουργηθεί διάφορα εργαλεία με τα οποία μπορεί κάποιος από μία λίστα γονιδίων να βρεί μια λίστα οντολογιών, με στατιστικές μετρήσεις της σημαντικότητάς τους [48-50]. Η στατιστική σημαντικότητα εκτιμάται μέσω των z-scores ή των p-values και των διορθώσεων των ποσοστών λανθασμένης εύρεσης (False Discovery Rate, FDR). Το z-score αναπαριστά το αν το πλήθος των γονιδίων τα οποία έχουν συσχετιστεί με ένα οντολογικό όρο ή μονοπάτι εμφανίζονται αρκετά συχνά (overrepresented), κάτι το οποίο αναπαριστάται με ένα σκορ μεγαλύτερο του 2 (z-score > 2), ή δεν εμφανίζονται όσο συχνά θα έπρεπε (underrepresented), κάτι το οποίο αναπαριστάται με ένα σκορ μικρότερο του -2 (z-score < -2), συγκριτικά με την κανονική κατανομή. Το σύστημα DAVID εμπεριέχει πολλές διαφορετικές πηγές δεδομένων και παρέχει λειτουργικές αναφορές για λίστες μικροσυστοιχιών γονιδίων [51].

1.1.6.3 Τι είναι το GEO (Gene Expression Omnibus)

Όπως προαναφέραμε, η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών είναι μια από τις πιο πρόσφατες και σημαντικές πειραματικές ανακαλύψεις στη μοριακή βιολογία. Σήμερα η παραγωγή των δεδομένων πραγματοποιείται με μεγαλύτερο ρυθμό από ότι η αποθήκευση και η ανάλυσή τους. Ένα μεγάλο μέρος αυτών των πληροφοριών είναι διασκορπισμένο σε ολόκληρο το Διαδίκτυο ή δεν είναι καν διαθέσιμο στο κοινό. Δεδομένου ότι όλο και περισσότερα εργαστήρια αποκτούν αυτήν την τεχνολογία, το πρόβλημα θα πάρει χειρότερη μορφή. Αυτός ο καταίγισμός δεδομένων απαιτεί την τυποποίηση της αποθήκευσης, της κοινής χρήσης, και των τεχνικών δημοσίευσης.

Για να υποστηρίξει τη δημόσια χρήση και τη διάδοση των δεδομένων έκφρασης γονιδίων, το NCBI έχει προωθήσει την καθολική έκφραση γονιδίων (Gene Expression Omnibus, GEO). Η GEO [52, 53] αντιπροσωπεύει την προσπάθεια του NCBI να δημιουργηθεί μια βάση δεδομένων έκφρασης και μια online σύνδεση για την αποθήκευση και την ανάκτηση των δεδομένων έκφρασης γονιδίων από οποιοδήποτε οργανισμό. Πολλοί τύποι δεδομένων έκφρασης γονιδίων, όπως εκείνοι που συζητούνται σε αυτή την πτυχιακή, γίνονται αποδεκτοί και αρχειοθετούνται σε ένα δημόσιο σύνολο δεδομένων.

1.1.6.4 Ανάπτυξη της MAML: Αποκρυπτογραφώντας την ίδια πλατφόρμα

Η γλώσσα σήμανσης μικροσυστοιχιών MAML (Microarray Markup Language), που αναπτύσσεται από την ομάδα εργασίας της βάσης δεδομένων έκφρασης γονιδίων μικροσυστοιχιών MGED (Microarray Gene Expression

Database), είναι μια πρώτη προσπάθεια να παρασχεθεί μια τυποποιημένη πλατφόρμα για την υποβολή και την ανάλυση των τεράστιων όγκων δεδομένων έκφρασης που παράγονται από τα διαφορετικά εργαστήρια σε όλο τον κόσμο.

Ο στόχος αυτής της ομάδας, που περιλαμβάνει και ερευνητές του NCBI, είναι να διευκολύνει τη θέσπιση προτύπων για το σχολιασμό των πειραμάτων DNA-συστοιχίας, την αναπαράσταση δεδομένων, καθώς επίσης και την εισαγωγή των τυποποιημένων πειραματικών μεθόδων ελέγχου και κανονικοποίησης των δεδομένων. Ο πραγματικός στόχος είναι να διευκολυνθεί η καθιέρωση των βάσεων δεδομένων έκφρασης γονιδίων, η συγκρισιμότητα των δεδομένων έκφρασης γονιδίων από διαφορετικές πηγές, η διαλειτουργικότητα των διαφορετικών βάσεων δεδομένων έκφρασης γονιδίων, και η δημιουργία λογισμικού ανάλυσης των δεδομένων.

Η MAML προτείνει ένα πλαίσιο για την ανάλυση των πληροφοριών από ένα πείραμα DNA-συστοιχίας και ένα σχήμα δεδομένων για να μεταβιβάσει αυτές τις πληροφορίες, συμπεριλαμβανομένων των λεπτομερειών για:

- 1 **Πειραματικό σχέδιο:** Το σύνολο της υβριδοποίησης του πειράματος.
- 2 **Σχέδιο συστοιχίας :** Κάθε συστοιχία και κάθε σημείο σε αυτή χρησιμοποιείται.
- 3 **Δείγματα:** Δείγματα που χρησιμοποιούνται, προετοιμασία για τοποθέτηση, και ιχνηθέτηση.
- 4 **Υβριδοποιήσεις :** Διαδικασίες και παράμετροι.
- 5 **Μετρήσεις :** Εικόνες, ποσοτικός προσδιορισμός, και προδιαγραφές.
- 6 **Έλεγχοι:** Τύποι, τιμές, και προδιαγραφές.

Η MAML είναι ανεξάρτητη από κάθε συγκεκριμένη πειραματική πλατφόρμα και παρέχει ένα πλαίσιο για τα πειράματα που γίνονται σε όλους τους τύπους συστοιχιών DNA, συμπεριλαμβανομένων των ιχνηθετημένων και συντεθημένων, καθώς επίσης και για τις oligo και τις συστοιχίες cDNA. Επιπλέον, η MAML παρέχει το σχήμα για την αναπαράσταση των δεδομένων με έναν ευέλικτο τρόπο, ο οποίος επιτρέπει την ανάλυση των δεδομένων που λαμβάνονται από όχι μόνο οποιεσδήποτε υπάρχουσες πλατφόρμες μικροσυστοιχιών αλλά και από πολλές από τις πιθανές μελλοντικές παραλλαγές, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνικών συστοιχιών.

Αν και τα δεδομένα στη GEO δεν παρέχονται αυτήν την περίοδο σε πρότυπο MAML, είναι στόχος του NCBI να παραδώσει τα δεδομένα με διάφορα πρότυπα, συμπεριλαμβανομένου αυτού της MAML, για να αντικατασταθούν σύντομα από μια πιο πρόσφατη έκδοση αποκαλούμενη MAGEML (MicroArray Gene Expression Markup Language, γλώσσα σήμανσης μικροσυστοιχιών έκφρασης γονιδίων) [54].

1.1.6.5 Τα οφέλη από: GEO και MAML

Με την αποθήκευση των άπειρων ποσών δεδομένων που αφορούν τα σχεδιαγράμματα έκφρασης γονιδίων, που προέρχονται από πολλά πειράματα τα οποία χρησιμοποιούν ποικίλα κριτήρια και καταστάσεις, η GEO:

- 1) θα βοηθήσει στη μελέτη του λειτουργικού γονιδιώματος,
- 2) θα διευκολύνει τη μετάβαση, την ανάπτυξη και την εφαρμογή των σφαιρικών πειραματικών προσεγγίσεων για να αξιολογηθεί η λειτουργία των γονιδίων,
- 3) θα παρέχει διευκόλυνση στην επικύρωση των αποκτηθέντων δεδομένων χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές και τεχνολογίες,
- 4) θα βοηθήσει στον καθορισμό συγκριτικών μετρήσεων των επιδόσεων και των προτύπων για επόμενες μελέτες πάνω στην έκφραση γονιδίων.

Με το να καταστήθουν οι πληροφορίες που είναι αποθηκευμένες στη GEO δημόσια διαθέσιμες, οι τομείς της βιοπληροφορικής και του λειτουργικού γονιδιώματος θα προωθηθούν και θα αναπτυχθούν.

1.1.7 Λογισμικό ανάλυσης δεδομένων από πειράματα έκφρασης γονιδίων με μικροσυστοιχίες

Το λογισμικό είναι απολύτως απαραίτητο στην ανάλυση δεδομένων από μικροσυστοιχίες. Παρόλα αυτά υπάρχουν ελάχιστα πακέτα λογισμικού τα οποία καλύπτουν όλα τα βήματα στην ανάλυση μικροσυστοιχιών. Αυτό σημαίνει ότι τα δεδομένα περνούν μέσα από μια σειρά διαφορετικών εφαρμογών λογισμικού τα οποία αντικατοπτρίζουν τα βήματα του διαγράμματος ροής (εικόνα 3).

1.1.7.1 Ελεύθερο λογισμικό

Κάθε μήνα δημοσιεύονται διάφορες έρευνες που σχετίζονται με τις μικροσυστοιχίες και κάθε μία από αυτές παρέχει κάποιο σύνδεσμο με το αντίστοιχο λογισμικό. Μερικές εφαρμογές βρίσκονται σε ιστοσελίδες, κάποιες είναι διαθέσιμες σαν πρόσθετα το Microsoft Excel [55, 56], αλλά οι περισσότερες στατιστικές προσεγγίσεις εμφανίζονται σαν πακέτα λογισμικού στο Bioconductor [57]. Το Bioconductor είναι μια πηγή λογισμικού για την ανάλυση γενομικών δεδομένων για τους ειδικούς βιοστατιστικούς και βιοπληροφορικούς, οι οποίοι αναγνωρίζουν τη δύναμη και την ευελιξία του, χωρίς να τους πειράζει η δύσκολη διεπαφή με το χρήστη. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, υπάρχουν συγκεκριμένα πακέτα λογισμικού στο Bioconductor για τις διαφορετικές πλατφόρμες που κυκλοφορούν στο εμπόριο. Άλλα πακέτα μπορεί να είναι πιο γενικά όσον αφορά τη χρήση τους και να χρησιμοποιούν επιπρόσθετα εργαλεία για πιο συγκεκριμένες προσεγγίσεις ανάλυσης. Για ένα απλό χρήστη η απόκτηση γνώσης πάνω στο λογισμικό αυτό μπορεί να έχει μεγάλη δυσκολία, αφού απαιτείται γνώση της γλώσσας εντολών R, πάνω στην οποία είναι βασισμένο το Bioconductor. Έχουν δημιουργηθεί κάποιες διεπαφές χρήστη ώστε να γίνει το Bioconductor πιο προσιτό.

Η βάση δεδομένων DAVID με τα συσχετιζόμενα εργαλεία αποτελεί μία δημοφιλή εφαρμογή για την βιολογική ερμηνεία των δεδομένων [51]. Η εύρεση άλλων πηγών για την ανάλυση δεδομένων μικροσυστοιχιών και την βιολογική ερμηνεία αυτών είναι μάταια [58], παρότι έχουν γίνει προσπάθειες για την κατηγοριοποίησή τους [59].

1.1.7.2 Εμπορικά πακέτα λογισμικού

Στο εμπορικό λογισμικό που είναι διαθέσιμο για την ανάλυση δεδομένων μικροσυστοιχιών υπάρχουν συγχωνευμένες πολλές από τις λειτουργίες που είναι διαθέσιμες σαν ξεχωριστά πακέτα λογισμικού στο Bioconductor. Οι εφαρμογές συχνά υποστηρίζουν μία ή δύο πλατφόρμες μικροσυστοιχιών. Οι περισσότερες εμπεριέχουν εργαλεία για την προεπεξεργασία, την ανάλυση διαφοροποίησης της έκφρασης και την ομαδοποίηση και επιτρέπουν την χρήση της γλώσσας R [60] ή άλλων γλωσσών γραμμής εντολών. Συχνά δίνεται έμφαση στην οπτικοποίηση των δεδομένων. Παρόλα αυτά δεν είναι καλώς αφομοιωμένα τα εργαλεία για την βιολογική ερμηνεία των δεδομένων, εκτός εάν η συγκεκριμένη εφαρμογή εστιάζει σε αυτό το θέμα. Στον πίνακα 2 συνοψίζονται οι δυνατότητες των πιο δημοφιλών εμπορικών πακέτων λογισμικού. Παρόλο που οι διεπαφές χρήστη τα κάνουν πιο εύχρηστα από τα περισσότερα πακέτα ελεύθερου λογισμικού, έχουν σχεδιαστεί για χρήστες με αυξημένες γνώσεις πάνω στο αντικείμενο και γι'αυτό τον λόγο είναι δύσκολα στην εκμάθηση από χρήστες χωρίς το κατάλληλο θεωρητικό υπόβαθρο. Εξαιρεση αποτελεί το GeneSifter [61], η μόνη εφαρμογή που δουλεύει σε ιστοσελίδα, το οποίο έχει σχεδιαστεί σύμφωνα με τη φιλοσοφία του ότι οι μη-ειδικοί ερευνητές θα πρέπει να έχουν τη δυνατότητα να διεξάγουν ανάλυση σε δεδομένα από μικροσυστοιχίες για σχεδιαστικώς κοινά πειράματα. Αυτό το σύστημα υποστηρίζει ευρύ φάσμα πλατφόρμων, ενσωματωμένη διαχείριση δεδομένων, προεπεξεργασία, ανάλυση διαφοροποίησης της έκφρασης, εργαλεία ομαδοποίησης και ανάλυση βιολογικής σημαντικότητας. Μια κοινή κριτική που αφορά τα εμπορικά πακέτα λογισμικού είναι ότι ο κώδικας που χρησιμοποιείται για την στατιστική ανάλυση, δεν είναι προσβάσιμος από τον χρήστη. Μόνο το GeneSifter χρησιμοποιεί αλγορίθμους γραμμένους στη γλώσσα R και το Bioconductor.

Σύγκριση των δυνατοτήτων των εμπορικών πακέτων λογισμικού ανάλυσης δεδομένων έκφρασης γονιδίων, μικροσυστοιχιών

Εταιρεία: προϊόν	Πλατφόρμα μικροσυστοιχιών	Αποθήκευση δεδομένων	Προεπεξεργασία	Διαφορική έκφραση	Επισήμανση (annotation)	γονιδίων	Ανάλυση λειτουργικότητας	Λειτουργικό σύστημα	Λογισμικό ανάλυσης	στατιστικής
Agilent: Genespring GX [62]	All		X	X	X		X	Win, Mac	Proprietary	
Biotique Systems: X-ray [63]	Affymetrix		X		X			Win	Excel	
DNASTar: ArrayStar [64]	Affymetrix, Nimblegen			X	X			Win	Proprietary	
Genomatix: ChipInspector [65]	Affymetrix		X	X	X		X	Win, Mac, Linux	Proprietary	
Insightful: S + ArrayAnalyzer [66]	Affymetrix, two-color		X	X	X		X	Win, Linux, Solaris	S-Plus	
Molecular Devices: Acuity [67]	Genepix, other	X	X	X	X			Client/server	Proprietary	
Ocimum Biosolutions: Genowiz [68]	Affymetrix, cDNA		X	X	X		X	Win, Mac, Linux	Proprietary	
Partek: Genomics Suit [69]	All		X	X	X			Win, Linux		
Rosetta Biosoftware: Resolver [70]	All	X	X	X	X			Client/server	Proprietary	
SAS: JMP Genomics [71]	Affymetrix, Illumina		X	X	X			Win	Proprietary	
TIBCO: Spotfire Decision Site [72]	All		X	X	X			Win	SAS	
VizX Labs: GeneSifter [61]	All	X	X	X	X		X	Web browser	S-Plus	
Biodiscovery: GeneDirector [73]	All	X	X					Win, Mac, Linux	R	
Genomics: Geneus [74]	Affymetrix, Illumina	X	X					Client/server		
Integromics: ArrayHub [75]	Affymetrix, ABI, two-color	X	X					Win		

1.2 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΕΤΑΝΑΛΥΣΗ

1.2.1 Διαδικασία ανάλυσης δεδομένων από πειράματα μικροσυστοιχιών

Η διαδικασία ανάλυσης των δεδομένων έκφρασης γονιδίων από μικροσυστοιχίες μπορεί να διασπαστεί σε τρία κύρια μέρη: 1) προεπεξεργασία, η μετατροπή του σήματος μια συστοιχίας από ένα σαρωτή σε μια κανονικοποιημένη τιμή, κατάλληλη για να γίνει σύγκριση της έκφρασης μεταξύ των συστοιχιών σε μία μελέτη, 2) συγκριτική στατιστική ανάλυση, για να γίνει ο προσδιορισμός των στατιστικώς σημαντικών διαφορετικών εκφρασμένων γονιδίων ή των γονιδίων που συνεκφράζονται και 3) βιολογική ερμηνεία, κατά προτίμηση με κάποια μέτρηση της στατιστικής σημαντικότητας. Στα πρώτα πειράματα μικροσυστοιχιών λαμβανόταν υπόψη μόνο η διαφορά στην έκφραση ενός γονιδίου μεταξύ δύο σετ δειγμάτων, παράγοντας έτσι αποτελέσματα με μεγάλες αποκλίσεις, γι' αυτό το λόγο οι επιστήμονες γρήγορα συνειδητοποίησαν ότι η στατιστική ανάλυση ήταν απαραίτητη για την απόκτηση ορθών αποτελεσμάτων. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν κοινές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των στατιστικώς σημαντικών γονιδίων, οι οποίες χρησιμοποιούνται ακόμη και σήμερα. Παρ' όλα αυτά, ο μικρός αριθμός αντιγράφων που χρησιμοποιούνται σε μία τυπική μελέτη μικροσυστοιχιών, η διαφοροποίηση που εμφανίζεται με τα πολλά τεχνικά βήματα στην προετοιμασία των δειγμάτων και το μεγάλο πλήθος διαφορετικών πειραμάτων που εφαρμόζονται σε μία μόνο συστοιχία ήταν απαγορευτικά για τις κοινές στατιστικές μεθόδους, έτσι αναπτύχθηκαν καινούριες [78-85]. Πολλές από αυτές έχουν δημιουργηθεί με τη γλώσσα R, συνήθως ως μέρος του πακέτου Bioconductor [57]. Δυστυχώς αυτές οι διαφορετικές προσεγγίσεις μπορούν να οδηγήσουν και σε διαφορετικά αποτελέσματα, συνεπώς, δεν μπορεί να οριστεί καμία ως βέλτιστη μέθοδος. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι αυτές οι διαφορετικές προσεγγίσεις παρουσιάζουν κάποια κοινά πρότυπα, βοηθώντας έτσι να αναγνωριστούν οι πιο κατάλληλες μέθοδοι.

1.2.2 Ο όρος μετα-ανάλυση

Η διαδικασία κατά την οποία χρησιμοποιούνται στατιστικές μέθοδοι, για να συνδυαστούν τα αποτελέσματα διαφόρων συστηματικών μελετών που αφορούν το ίδιο ερώτημα, ονομάζεται μετα-ανάλυση. Αποτελεί οργανωμένη και δομημένη αξιολόγηση ενός προβλήματος χρησιμοποιώντας πληροφορίες (συνήθως υπό την μορφή πινάκων) από διαφορετικές μελέτες οι οποίες ερευνούν το ίδιο πρόβλημα.

Η ανάπτυξη της μεθοδολογίας ξεκίνησε από την εποχή του Fisher (1920). Σαν όρος εμφανίστηκε αρχικά στον τομέα της ψυχολογίας (στα τέλη της δεκαετίας του 1970) αλλά χρησιμοποιείται πλέον ευρέως στην Επιδημιολογία και στις Κλινικές

Δοκιμές. Με τη συνεχόμενη ανάπτυξη της επιδημιολογίας, άρχισε να εφαρμόζεται και εκεί.

Είναι δημοφιλής ως μέθοδος για την εξάλειψη των αποκλίσεων μεταξύ μελετών γενετικής συσχέτισης. Σε μελέτες τέτοιου είδους συχνά παρουσιάζονται κάποιες δυσκολίες όσον αφορά την εξαγωγή σημαντικών και επαληθεύσιμων αποτελεσμάτων. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι οι γενετικές επιδράσεις είναι μικρές και δύσκολα παρατηρήσιμες, για τον λόγο αυτό απαιτούνται μελέτες με πολλές χιλιάδες αντικειμένων προς μελέτη.

Χρησιμοποιώντας την μετα-ανάλυση ως εργαλείο, οι επιστήμονες κατάφεραν να αποκαλύψουν κάποιες απρόσμενες πηγές ετερογένειας, όπως το συστηματικό σφάλμα δημοσίευσης (Publication Bias). Εάν η ετερογένεια καθοριστεί επαρκώς και ληφθεί υπόψη, η μετα-ανάλυση μπορεί να επιβεβαιώσει εάν εμπλέκεται ένας γενετικός παράγοντας, αυτό όμως δεν σημαίνει ότι μπορεί να λειτουργήσει ως υποκατάστατο μιας αρχικής μελέτης με επαρκής πηγές.

Μία γρήγορη αναζήτηση στην PubMed [76], είναι αρκετή για να πείσει τον καθένα ότι ο αριθμός των δημοσιευμένων μελετών γενετικής συσχέτισης αυξάνεται με εκθετικό ρυθμό. Εκτιμάται ότι, στο πεδίο της ψυχιατρικής γενετικής μόνο, ο ρυθμός φθάνει τη μία δημοσίευση μελέτης ανά ημέρα. Είναι απόλυτα σαφές ότι το πλήθος των μελετών δεν αποτελεί κάποιο δείκτη αξιοπιστίας για τα αποτελέσματα: κάθε πειστική συσχέτιση ακολουθείται από μία εξίσου πειστική διάψευση της συσχέτισης αυτής, και αυτή ακολουθείται από ακόμη μια θετική διαπίστωση συνεχίζοντας έτσι επ'άπειρο. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως «Το φαινόμενο του Πρωτέα». Μια επισκόπηση που αφορούσε 600 έρευνες οι οποίες αναφέρονται σε θετικές συσχετίσεις μεταξύ γονιδίων και ασθένειας, έδειξε ότι οι συσχετίσεις που εμφανίζονται με τη μεγαλύτερη συχνότητα δεν είναι σημαντικές: από τις 166 συσχετίσεις που μελετήθηκαν περισσότερες από τρεις φορές, μόνο οι έξι εμφανιζόταν πανομοιότυπα με συνέπεια.

Αφού συμφωνήσουμε ότι οι επιστήμονες γνωρίζουν πραγματικά πως να εκτιμήσουν την αρτηριακή πίεση και να διαγνώσουν τον διαβήτη, ότι οι ψυχολόγοι μπορούν να προσδιορίσουν τις διανοητικές ασθένειες και στο ότι ο ρυθμός εμφάνισης γονοτυπικού λάθους δεν ακυρώνει εντελώς την έρευνα (δηλαδή ότι οι μετρήσεις μας για τις εξαρτημένες και ανεξάρτητες μεταβλητές είναι αξιόπιστες), τότε ως αιτία απομένει ο σχεδιασμός των μελετών που αφορούν θέματα γενετικών συσχετίσεων. Μια εξαιρετικά απλή αρχή (απλά συγκρίνοντας τις συχνότητες εμφάνισης των αλληλόμορφων γονιδίων σε επιλεγμένες ομάδες ασθενών και μαρτύρων και ψάχνοντας για μία στατιστικώς σημαντική διαφορά), είναι το ίδιο υπεύθυνη για την παραγωγή αμέτρητων σελίδων σε επιστημονικά περιοδικά όσο και οι ίδιες οι μελέτες γενετικής συσχέτισης. Για μεγάλο χρονικό διάστημα κατηγορούνταν για το φαινόμενο αυτό η διαστρωμάτωση των πληθυσμών. Έγινε εθυμοτυπική η χρήση του ελέγχου μετάδοσης αστάθειας (Transmission Disequilibrium Test) για να εξασφαλιστεί η δημοσίευση μια μελέτης γενετικής συσχέτισης (ο μεγαλύτερος όγκος σε περιοδικά αφιερώνεται πλέον στις Monte Carlo Μαρκωβιανές Αλυσίδες και σε παρόμοιες μεθόδους). Πρόσφατα, η εξέταση των δομών των απλότυπων, οδήγησε αναπόφευκτα στη δημιουργία καινοτόμων στατιστικών μεθόδων για την εφαρμογή

των απλότυπων στις μελέτες γενετικής συσχέτισης. Πλέον η (σχετικά) καινούρια μέθοδος παρουσιάζεται ως λύση στο «φαινόμενο του Πρωτέα» είναι η μετα-ανάλυση. Ο λόγος για τον οποίο η μέθοδος αυτή είναι δημοφιλής αναφέρεται στο ότι έχει τις δυνατότητες να ανταπεξέλθει στο μεγαλύτερο μειονέκτημα των μελετών γενετικής συσχέτισης: την έλλειψη στατιστικής δύναμης.

Όταν το μέγεθος των δειγμάτων είναι μεγάλο, είναι δυνατόν να εντοπιστούν επιτυχώς ακόμη και τα αλληλόμορφα με την μικρότερη συχνότητα εμφάνισης. Σε πολλές μελέτες σύνδεσης και συσχέτισης η αδυναμία εύρεσης πειστικής απόδειξης για την ύπαρξη συσχέτισης γονιδίου-ασθένειας, ακόμη και για μεγάλα μεγέθη δειγμάτων, υποδεικνύει ότι ο σχετικός κίνδυνος ευπάθειας για την συγκεκριμένη νόσο είναι μέτριος έως χαμηλός. Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης πρέπει να εξετάζουν ένα μεγάλο αριθμό ασθενών και μαρτύρων (χιλιάδες και δεκάδες χιλιάδες) για να έχουν μια εύλογη πιθανότητα να βγάλουν ένα στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα. Παρότι ένα μόνο εργαστήριο μπορεί να μην καταφέρει να συγκεντρώσει τόσο πολυπληθή δεδομένα, ίσως εάν συνδυαστεί η σχετική βιβλιογραφία που υπάρχει σε όλο τον κόσμο θα μπορούσε εάν υπήρχε κάποιος τρόπος να γίνει η ανάλυση όλων των δεδομένων ταυτοχρόνως. Η μετα-ανάλυση αποτελεί ένα εργαλείο με το οποίο μπορεί να επιτευχθεί ακριβώς αυτό.

1.2.3 Η μεθοδολογία της μετα-ανάλυσης

Το γενικό πλαίσιο της μετα-ανάλυσης υποθέτει ότι υπάρχει μία μετρήσιμη σχέση μεταξύ συγκεκριμένων μεγεθών που μας ενδιαφέρουν, και ότι έχουν διεξαχθεί η ανεξάρτητες μελέτες οι οποίες εξετάζουν τη σχέση αυτή. Αναλόγως, μπορεί να προσδιοριστεί αυτή η σχέση έτσι ώστε η κάθε μελέτη να παράγει μία εκτίμηση αυτής. Εάν αυτές οι εκτιμήσεις κανονικοποιηθούν κατάλληλα, τότε η εκτίμηση της κάθε μελέτης μπορεί να ονομαστεί εκτιμήτρια του εκτιμώμενου μεγέθους. Ένα εκτιμώμενο μέγεθος είναι στην ουσία μια κανονικοποιημένη ποσοτική έκφραση της σχέσης που μας ενδιαφέρει. Για παράδειγμα, αρκετά διαφορετικά εργαστήρια μπορεί να ερευνούν ποιο από δύο φάρμακα αντιδρά καλύτερα στην αντιμετώπιση μίας συγκεκριμένης ασθένειας. Σε αυτή την περίπτωση η σχέση που μας ενδιαφέρει είναι η διαφορά μεταξύ των επιδράσεων των δύο φαρμάκων. Εάν το κάθε εργαστήριο παράγει μια κανονικοποιημένη εκτίμηση, έτσι ώστε οι εκτιμήσεις από όλα τα εργαστήρια να αναφέρονται στην ίδια ποσότητα και να είναι στην ίδια κλίμακα, τότε αυτές είναι εκτιμήτριες του εκτιμώμενου μεγέθους.

Υπάρχουν τρεις κύριες ομάδες τέτοιου είδους εκτιμητριών. Η πρώτη και πιθανώς η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη είναι η κανονικοποιημένη εκτίμηση διαφοράς (standardized difference estimate) [81], παράδειγμα της ομάδας αυτής αποτελεί το g του Hedge, που είναι παρόμοιο με το t τεστ μιας μελέτης δύο δειγμάτων: $g = (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)/S_p$. Η δεύτερη είναι η κανονικοποιημένη εκτιμήτρια σχέσης (standardized relation estimate), παράδειγμα της ομάδας αποτελεί ο συντελεστής συσχέτισης r . Η τρίτη είναι ένα μετρητής της σημαντικότητας, παράδειγμα για αυτή

την ομάδα αποτελεί το p-value ενός τεστ υποθέσεων. (Παρ'όλο που δεν αποτελεί εκτιμώμενο μέγεθος με την παραδοσιακή έννοια, η προσέγγιση της μέτρησης της σημαντικότητας, αναφέρεται χάρην αρτιότητας.)

Για να μπορέσουν να συνδυαστούν οι εκτιμήτριες αυτές μεταξύ των διαφορετικών μελετών, θα πρέπει να αναφέρονται στην ίδια κλίμακα ή ποσότητα, να είναι κανονικοποιημένες, και (με εξαίρεση τα p-values, τα οποία συνδυάζονται με διαφορετικό τρόπο) να περιέχουν κάποια μέτρηση της μεταβλητότητας τους. Μόλις η κάθε μελέτη i μπορεί να παρέχει την εκτιμήτρια του εκτιμώμενου μεγέθους δ_i και την μέτρηση της μεταβλητότητας του v_i μπορεί να πραγματοποιηθεί μια μετα-ανάλυση. Υπάρχουν τρεις κύριες μετα-αναλυτικές προσεγγίσεις: το βασισμένο σε t-τεστ μοντέλο το οποίο εμφανίζεται σε δύο μορφές, στο μοντέλο σταθερών επιδράσεων (fixed effects) και στο μοντέλο τυχαίων επιδράσεων (random effects), η προσέγγιση ταξινόμησης γινομένων (rank product approach), και ο αντίστροφος έλεγχος χ^2 του Fisher.

Έστω ότι υπάρχουν δύο καταστάσεις η θ και η E (Θεραπεία και Έλεγχος), επίσης έστω ότι υπάρχουν $i = 1, \dots, n$ ανεξάρτητες μελέτες (σετ δεδομένων) και $(n_{i\theta}, n_{iE})$ αντίγραφα για την i -οστή μελέτη. Έτσι, για ένα δοσμένο γονίδιο, τα δεδομένα καταγράφονται ως τον λόγο θ_{ij}/E_{ij} ο οποίος αντιπροσωπεύει το επίπεδο έκφρασης του γονιδίου στο j -οστό αντίγραφο του θ / E της i -οστής μελέτης.

1.2.3.1 Μοντέλο βασισμένο σε t-τεστ

Το t-τεστ και οι διάφορες παραλλαγές του αποτελούν τις πιο συνηθισμένες προσεγγίσεις όσον αφορά την αναγνώριση των διαφορών στην έκφραση των γονιδίων. Η μεθοδολογία της μετα-ανάλυσης βασισμένης στο t-τεστ άρχισε πρόσφατα να χρησιμοποιείται και στην ανάλυση μικροσυστοιχιών [80, 82]. Γενικώς, από κάθε μελέτη που συμμετέχει στη μετα-ανάλυση λαμβάνεται μια κανονικοποιημένη μέση διαφορά ως εκτιμώμενο μέγεθος, ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση της διαφορικής έκφρασης ενός γονιδίου.

$$\delta_i = \frac{(\bar{\theta}_i - \bar{E}_i)}{S_p}$$

όπου τα $\bar{\theta}_i$ και \bar{E}_i αντιπροσωπεύουν τους μέσους των ομάδων θ και E στην i -οστή μελέτη, και ως S_p αναπαριστάται η εκτιμώμενη διακύμανση. Μέσω ενός ιεραρχικού μοντέλου ορίζουμε τον πίνακα των εκτιμώμενων μεγεθών δ_i από τις μελέτες :

$$\delta_i = \theta_i + \varepsilon_i, \quad \varepsilon_i \sim N(0, \sigma_i^2)$$

$$\theta_i = \mu + \varepsilon_i, \quad \varepsilon_i \sim N(0, \tau^2)$$

όπου μ είναι η παράμετρος ενδιαφέροντος, και τ^2 και σ^2 αντιστοιχούν στην μεταξύ των μελετών και στην ενμέσω (within-study) των μελετών μεταβλητότητα, αντίστοιχα. Το μοντέλο παρουσιάζεται σε δύο διαφορετικές μορφές: η μία είναι το μοντέλο σταθερών επιδράσεων (Fixed-Effect Model, FEM) και η άλλη είναι το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων (Random-Effect Model, REM), το κάθε μοντέλο επιλέγεται αναλόγως με το αν η μεταβλητότητα μεταξύ των μελετών λαμβάνεται υπ' όψη ή όχι. Σε άλλες μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί το στατιστικό τεστ του Q του Cochran για να ελεγχθεί η ομογένεια, υποθέτοντας ότι $\tau^2 = 0$. Εάν η μηδενική υπόθεση δεν απορριφθεί τότε θεωρείται κατάλληλο το FEM. Στην αντίθετη περίπτωση, όπου δηλαδή υπάρξει απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης, θα θεωρηθεί κατάλληλη η χρήση του REM, σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται ο συντελεστής των DerSimonian και Laird (1986) για την εκτίμηση του τ^2 . Έπειτα η εκτίμηση αυτή χρησιμοποιείται για να βρεθεί μια εκτίμηση της παραμέτρου μ και της διακύμανσης αυτής $Var[\mu]$.

$$\hat{\mu}(\tau^2) = \frac{\sum(\sigma_i^2 + \tau^2)^{-1} \delta_i}{\sum(\sigma_i^2 + \tau^2)^{-1}}, \quad Var[\hat{\mu}(\tau^2)] = \frac{1}{\sum(\sigma_i^2 + \tau^2)^{-1}}$$

Από τα $\hat{\mu}(\tau^2)$ και $Var[\hat{\mu}(\tau^2)]$ θα εξαχθεί ένα z-score, για να υπολογιστεί το κανονικοποιημένο μέσο αποτέλεσμα της θεραπείας για κάθε γονίδιο μέσα στις μελέτες. Για την εξακρίβωση της στατιστικής σημαντικότητας των συνδυαστικών αποτελεσμάτων, χρησιμοποιώντας αυτά τα z-scores λαμβάνονται p-values από μια κανονική κατανομή $N(0,1)$.

1.2.3.1.1 Μοντέλο σταθερών επιδράσεων

Αν υποθέσουμε ότι n ανεξάρτητες μελέτες παρέχουν εκτιμήτριες του εκτιμώμενου μεγέθους δ_i και μετρήσεις της μεταβλητότητας τους v_i , $i = 1, \dots, n$. Η πιο γενική μετα-αναλυτική προσέγγιση θεωρεί ότι

$$\begin{aligned} \delta_i &= \theta_i + \varepsilon_i \\ &= \mu + \varepsilon_i \end{aligned}$$

Με δειγματικό λάθος $\varepsilon_i \sim N(0, \sigma_i^2)$. Κάθε δ_i είναι μία εκτιμήτρια της πραγματικής τιμής θ_i του εκτιμώμενου μεγέθους, και υποτίθεται ότι $\theta_1 = \dots = \theta_n$ με την κοινή ποσοτική παράμετρο μ . Αυτό αναφέρεται ως προϋπόθεση ομογένειας και μπορεί να ερμηνευτεί ως η υπόθεση ότι όλες οι μελέτες εξετάστηκαν και παρείχαν εκτιμήτριες της ίδιας παραμέτρου μ , και η οποιαδήποτε διαφορά μεταξύ των

εκτιμητριών αυτών οφείλεται μόνο σε δειγματικό λάθος. Αυτή η κοινή ποσοτική παράμετρος μ εκτιμάται ως ένα άθροισμα βαρών των εκτιμητριών του εκτιμώμενου μεγέθους:

$$\hat{\mu} = \frac{\sum w_i \delta_i}{\sum w_i}$$

Τα βάρη w_i επιλέγονται ώστε ελαχιστοποιηθεί η διακύμανση του $\hat{\mu}$, και αυτό επιτυγχάνεται μέσω του $w_i = 1/v_i$, όπου το v_i είναι η εκτιμώμενη διακύμανση του δ_i . Η διακύμανση του $\hat{\mu}$ είναι $v_{\hat{\mu}} = 1/\sum w_i$. Η υπόθεση της ομογένειας $H_0^Q: \theta_1 = \dots = \theta_n$ μπορεί να ελεγχθεί με τη χρήση του παρακάτω τεστ

$$Q = \sum w_i (\hat{\delta}_i - \hat{\mu})^2$$

Υπό την υπόθεση H_0^Q , η Q κατανέμεται όπως η χ_{n-1}^2 . Έτσι αυτή η κατανομή χ^2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για ένα προσεγγιστικό τεστ ομογένειας. Εάν το Q είναι μεγαλύτερο από το α_Q , το άνω κρίσιμο σημείο της κατανομής χ_{n-1}^2 , η H_0^Q απορρίπτεται στο επίπεδο της α_Q . Εναλλακτικά, το p-value της ομογένειας P_Q έχει τέτοια τιμή ώστε το Q να είναι το άνω κρίσιμο σημείο P_Q της κατανομής χ_{n-1}^2 , και η H_0^Q απορρίπτεται στο επίπεδο της α_Q εάν ισχύει ότι $P_Q < \alpha_Q$.

Ο έλεγχος σημαντικότητας $H_0^Z: \theta = 0$ μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση του τεστ $Z = \hat{\mu}/\sqrt{v_{\hat{\mu}}}$. Υπό την υπόθεση H_0^Z , το Z κατανέμεται σύμφωνα με την κατανομή $N(0, 1)$, και εάν το $|Z|$ είναι μεγαλύτερο από το άνω κρίσιμο σημείο $\alpha_Z/2$ της κατανομής $N(0, 1)$, η H_0^Z απορρίπτεται στο επίπεδο του α_Z . Εναλλακτικά, το p-value της ομογένειας P_Z έχει τέτοια τιμή ώστε το $|Z|$ να είναι το άνω κρίσιμο σημείο $P_Z/2$ της κατανομής $N(0, 1)$, και η H_0^Z απορρίπτεται στο επίπεδο της α_Z εάν ισχύει ότι $P_Z < \alpha_Z$.

Η μετα-ανάλυση στο γενικότερο πλαίσιο των πειραμάτων μικροσυστοιχιών προϋποθέτει ότι διαφορετικά εργαστήρια παρέχουν ποσοτικές μετρήσεις της διαφορικής έκφρασης (το εκτιμώμενο μέγεθος) ενός πλήθους γονιδίων μαζί με εκτιμήσεις της μεταβλητότητας. Για το μοντέλο των σταθερών επιδράσεων, η υπόθεση της ομογένειας (H_0^Q) προϋποθέτει ότι σε κάθε διαφορετικό εργαστήριο το γονίδιο εκφράζεται το ίδιο, και οι διαφορές που τυχόν υπάρχουν μεταξύ των εργαστηρίων οφείλονται μόνο σε δειγματικά λάθη. Αντιθέτως, η υπόθεση H_0^Z έχει την βιολογική έννοια του ότι δεν υπάρχει καμία διαφορά στην έκφραση του γονιδίου ανάμεσα στις συνθήκες ενδιαφέροντος. Αυτό ελέγχει τα αναγνωρισμένα γονίδια που είναι στατιστικά σημαντικά τα οποία παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην έκφραση τους μεταξύ των δύο συνθηκών, χρησιμοποιώντας πληροφορίες από

διαφορετικά εργαστήρια.

1.2.3.1.2 Μοντέλο τυχαίων επιδράσεων

Στην πράξη, η υπόθεση ομογένειας (και το μοντέλο σταθερών επιδράσεων που προκύπτει) είναι μία αρκετά απλουστευμένη τεχνική [78, 82]. Το βασικό μοντέλο τυχαίων επιδράσεων υποθέτει ότι n ανεξάρτητες μελέτες παρέχουν εκτιμήτριες του εκτιμώμενου μεγέθους δ_i και μετρήσεις της μεταβλητότητας τους v_i , $i=1, \dots, n$. Επίσης το μοντέλο υποθέτει ότι

$$\begin{aligned}\delta_i &= \theta_i + \varepsilon_i \\ &= \mu + \varepsilon_i + \varepsilon_{i'}\end{aligned}$$

Σε αυτό το πλαίσιο, μ είναι ο πληθυσμιακός μέσος των εκτιμώμενων μεγεθών, και υπάρχουν και δύο συνιστώσες λάθους, ε και ε' , οι οποίες αντιστοιχούν στην μεταξύ των μελετών και στην ενμέσω των μελετών μεταβλητότητα, αντίστοιχα. Η κάθε μελέτη αναζητά να βρει σχέσεις που αφορούν την ποσότητα μ , για αυτό το λόγο επιλέγει ένα δείγμα ατόμων από ένα συγκεκριμένο πληθυσμό με σκοπό να ερευνήσει το υποκείμενο εκτιμώμενο μέγεθος μ . Παρ'όλα αυτά εξαιτίας διαφορών που υπάρχουν μεταξύ των μελετών όπως ο χρόνος, η τοποθεσία, ο εξοπλισμός και άλλοι μη ελεγχόμενοι (και πιθανώς άγνωστοι) παράγοντες, η κάθε μελέτη θα εκτιμά στην πραγματικότητα μία ελαφρώς διαφορετική ποσότητα. Έτσι, εξαιτίας των διαφορών μεταξύ των μελετών, η μελέτη i εκτιμά το δ_i , ένα τυχαίο εκτιμώμενο μέγεθος από τον πληθυσμό όλων των πιθανών εκτιμώμενων μεγεθών. Η συνιστώσα λάθους $\varepsilon \sim N(0, \tau^2)$ είναι η τυχαία απόκλιση του δ_i από το θ_i (αντιπροσωπεύοντας την μεταβλητότητα μεταξύ των μελετών). Σε αυτό το βασικό μοντέλο, το τ^2 αναπαριστά την τυχαία μεταβλητότητα μεταξύ των μελετών. Μέσα στην μελέτη i , η εκτιμήτρια δ_i θα διαφέρει από το πραγματικό μέγεθος θ_i αναλόγως με το ποιο τυχαίο δείγμα επιλέγεται. Εδώ, το $\varepsilon_{i'} \sim N(0, \sigma_i^2)$ είναι το δειγματικό λάθος (αντιπροσωπεύοντας την μεταβλητότητα μέσα στην ίδια την μελέτη i).

Το Q υπολογίζεται όπως και στο μοντέλο των σταθερών επιδράσεων (το μοντέλο σταθερών επιδράσεων H_3^Q υποθέτει ότι $\tau^2 = 0$). Το μοντέλο των τυχαίων επιδράσεων χρησιμοποιεί την τιμή του Q για τον υπολογισμό νέων βαρών

$$\bar{w}_i = 1/(v_i + \tau_i^2)$$

όπου

$$\tau_w^2 = \max(0, (Q - n + 1) / (\sum w_i - \sum w_i^2 / \sum w_i)).$$

Έπειτα η εκτιμήτρια για τον πληθυσμιακό μέσο του εκτιμώμενου μεγέθους μ προκύπτει από

$$\hat{\mu}_w = \sum \hat{w}_i \delta_i / \sum \hat{w}_i.$$

Η διακύμανση του $\hat{\mu}_w$ είναι $v_{\hat{\mu}_w} = 1 / \sum \hat{w}_i$. Ο έλεγχος σημαντικότητας $H_0^Z: \mu = 0$ μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη χρήση του τεστ $Z_w = \hat{\mu}_w / \sqrt{v_{\hat{\mu}_w}}$. Υπό την υπόθεση H_0^Z , το Z_w κατανέμεται σύμφωνα με την κατανομή $N(0,1)$, και το p-value σημαντικότητας υπολογίζεται με τον ίδιο τρόπο όπως και στο μοντέλο σταθερών επιδράσεων.

Όταν εφαρμόζεται το μοντέλο μετα-ανάλυσης τυχαίων επιδράσεων σε δεδομένα από πειράματα μικροσυστοιχιών, και πάλι υποτίθεται ότι τα διαφορετικά εργαστήρια παρέχουν ποσοτικές μετρήσεις της διαφορικής έκφρασης (το εκτιμώμενο μέγεθος) ενός δεδομένου γονιδίου μαζί με τις εκτιμήτριες μεταβλητότητας. Το μοντέλο τυχαίων επιδράσεων υποθέτει ότι υπάρχει κάποιος πραγματικός βαθμός διαφορικής έκφρασης του γονιδίου, και το κάθε εργαστήριο στην πραγματικότητα εκτιμά έναν ελαφρώς διαφορετικό βαθμό διαφορικής έκφρασης. Επιπλέον, η εκτίμηση του κάθε εργαστηρίου διαφέρει με τυχαίο τρόπο από τον πραγματικό βαθμό έκφρασης του εργαστηρίου αυτού εξαιτίας των δειγματικών λαθών. Έτσι το τ^2 αποτελεί ένα μέτρο της μεταβλητότητας μεταξύ των πραγματικών βαθμών έκφρασης των εργαστηρίων, και το τεστ σημαντικότητας χρησιμοποιείται για την αναγνώριση διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων με τη χρήση πληροφοριών από διαφορετικά εργαστήρια.

1.2.3.2 Προσέγγιση ταξινόμησης γινομένων

Η προσέγγιση ταξινόμησης γινομένων είναι μια μη παραμετρική στατιστική μέθοδος, η οποία εμφανίστηκε αρχικά για τον εντοπισμό διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων σε ένα συγκεκριμένο σετ δεδομένων [79, 80, 83]. Εντοπίζει τα γονίδια τα οποία εμφανίζονται με συνέπεια μεταξύ των γονιδίων που υπερ-εκφράζονται (ή εκφράζονται λιγότερο) σε ένα πλήθος όμοιων πειραμάτων. Η μέθοδος μπορεί να ξεπεράσει το εμπόδιο της ετερογένειας και για αυτό τον λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στη μετα-ανάλυση, παράγοντας μία μεμονωμένη στατιστικώς σημαντική μέτρηση για το κάθε διαφορετικό γονίδιο για τις μελέτες που συμμετέχουν στη μετα-ανάλυση. Για την παρουσίαση του αλγορίθμου της τεχνικής χρησιμοποιούμε σαν παράδειγμα δύο ομάδες δεδομένων με $(n_{1\theta}, n_{1E})$ και $(n_{2\theta}, n_{2E})$

αντίγραφα αντίστοιχα η κάθε μία.

Αλγόριθμος:

(1) Υπολογισμός των λόγων κατά ζεύγος (pair-wise) ή των αλλαγών πτύχωσης (fold-changes) για κάθε ομάδα δεδομένων:

Για συστοιχία μονού καναλιού

$$\theta_{1j}/E_{1m}, j = 1, \dots, n_{1\theta}, m = 1, \dots, n_{1E} \Rightarrow K_1 = n_{1\theta} \times n_{1E} \text{ συγκρίσεις}$$

και

$$\theta_{2j}/E_{2m}, j = 1, \dots, n_{2\theta}, m = 1, \dots, n_{2E} \Rightarrow K_2 = n_{2\theta} \times n_{2E} \text{ συγκρίσεις}$$

Για συστοιχία διπλού καναλιού

$$\theta_{1j}/E_{1j}, j = 1, \dots, n_1 \Rightarrow K_1 = n_1 \text{ συγκρίσεις}$$

και

$$\theta_{2j}/E_{2j}, j = 1, \dots, n_2 \Rightarrow K_2 = n_2 \text{ συγκρίσεις}$$

Αφού $n_{i\theta} = n_{iE} = n_i$.

(2) Ταξινομήσε τις αλλαγές πτύχωσης (Fold-Change, FC) για κάθε σύγκριση (το FC που έχει τη μεγαλύτερη τιμή κατατάσσεται στην τάξη 1) $\Rightarrow r_{gik}$, είναι η θέση που έλαβε το γονίδιο g στην i -οστή μελέτη ύστερα από την k -οστή σύγκριση όπου $k = 1, \dots, K_i$

(3) Συνδύασε τις τάξεις K_1 από την ομάδα δεδομένων 1 και τις τάξεις K_2 από την ομάδα δεδομένων 2, καθόρισε την τελική τάξη του κάθε γονιδίου ως

$$RP = \left(\prod_i \prod_k r_{gik} \right)^{(1/K)}, \text{ όπου } K = K_1 + K_2.$$

(4) Κάνε αντιμετάθεση στις τιμές έκφρασης μέσα σε κάθε συστοιχία που είναι συσχετισμένη με το γονίδιο, επανέλαβε τα βήματα (1)-(3) και καθόρισε την μεταβλητή μηδενικής τάξης $RP_g^{*(b)}$.

(5) Επανέλαβε το βήμα (4) Β φορές και δημιούργησε μια κατανομή αναφοράς με το $RP_g^{*(b)}$ καθόρισε τα P-values και FDR για κάθε δοσμένο γονίδιο g παρόμοια με το μοντέλο που είναι βασισμένο σε t-τεστ.

$$P_g = (1/GH) \sum_b \sum_{(g)} I(|RP_g^{*(b)}| \leq RP_{m=g})$$

$$FDR_g = ((1/B) \sum_b \sum_{(g)} I(|RP_g^{*(b)}| \leq RP_g)) / (\sum_{(g)} I(|RP_{(g)}| \leq RP_g))$$

όπου G το συνολικό πλήθος των γονιδίων σε κάθε μελέτη.

Ο τρόπος λειτουργίας του αλγορίθμου είναι στην ουσία ο υπολογισμός των αλλαγών πτύχωσης ανα ζεύγος με τα αντίγραφα κάθε γονιδίου, μεταξύ της ομάδας θεραπείας και της ομάδας ελέγχου και προς τις δύο κατευθύνσεις. Έπειτα γίνεται αντιστοίχιση των αλλαγών αυτών σε τάξεις για όλα τα γονίδια μέσα σε κάθε μελέτη, στη συνέχεια γίνεται έλεγχος για την εύρεση εκείνων των γονιδίων που βρίσκονται με συνέπεια σε υψηλές τάξεις μεταξύ όλων των αντιγράφων. Η μετατροπή των αλλαγών πτύχωσης σε τάξεις αυξάνει την αντοχή στο θόρυβο και την ετερογένεια μεταξύ των μελετών. Η μέθοδος αυτή μπορεί να υλοποιηθεί και μέσω του λογισμικού Bioconductor μέσω του πακέτου RankProd [83].

1.2.3.3 Αντίστροφος έλεγχος χ^2 του Fisher

Υπάρχουν αρκετές απλοί μέθοδοι για τον έλεγχο σημαντικότητας σε αποτελέσματα συνδυασμένων μελετών, οι οποίες χρησιμοποιούν P-values από την κάθε μελέτη που συμμετέχει στον έλεγχο. Μία από αυτές είναι και ο αντίστροφος έλεγχος χ^2 του Fisher [80]. Υπολογίζει μια παράμετρο από τον συνδυασμό των P-values που έχει λάβει από την κάθε ομάδα δεδομένων, η οποία ακολουθεί την κατανομή χ^2 με 21 βαθμούς ελευθερίας υπό την μηδενική υπόθεση και υπό την προϋπόθεση ότι τα συνδυαστικά P-values μπορούν να υπολογιστούν,

$$S = -2 \log \left(\prod_i p_i \right).$$

Υπάρχει η δυνατότητα επέκτασης της μεθόδου με την ανάθεση διαφορετικών βαρών σε κάθε ένα από τα σύνολα δεδομένων. Η ανάθεση των βαρών μπορεί να γίνει είτε σύμφωνα με την αξιοπιστία του P-value λόγω ποιότητας των δεδομένων, είτε σύμφωνα με άλλους παράγοντες που θα θεωρηθούν σημαντικοί για την έρευνα. Για να αποφευχθεί το φαινόμενο απώλειας ισχύος των αποτελεσμάτων εξαιτίας κάποιας φτωχής εισόδου έχουν δημιουργηθεί μέθοδοι σύμφωνα με τις οποίες τα P-values που είναι μικρότερα από κάποιο P-value κατωφλίου απορρίπτονται.

Πρέπει να τονιστεί ότι η μέθοδος του Fisher πρέπει να εφαρμοστεί στα P-values για τον έλεγχο γονιδίων που υπερεκφράζονται ξεχωριστά από εκείνα για τον έλεγχο γονιδίων που εκφράζονται λιγότερο, καθώς οι τυχαίες αντίθετες διαφορές στην έκφραση σε ένα μικρό δείγμα μπορεί να οδηγήσουν σε οριακά μικρά P-values

τα οποία ορίζουν υψηλό βαθμό σημαντικότητας της παραμέτρου που προκύπτει από τις συνδυασμένες μελέτες.

Μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι και η μέθοδος που είναι βασισμένη στο t-τεστ και η μέθοδος ταξινόμησης προϊόντων μπορούν να εφαρμοστούν σε μία ανεξάρτητη ομάδα δεδομένων, και τα P-values από οποιαδήποτε από αυτές τις ανεξάρτητες αναλύσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μέθοδο του Fisher.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Εισαγωγικά

2.1.1 Εύρεση βιβλιογραφίας

Διεξάγαμε συστηματική και εκτενή έρευνα στο διαδίκτυο για την έρευνα της σχετικής βιβλιογραφίας. Η αναζήτηση έλαβε μέρος στις βάσεις δεδομένων των PUBMED [76], SCOPUS [86] και IEEE [87], χρησιμοποιώντας διάφορους συνδυασμούς λέξεων-κλειδιών, όπως 'microarrays' ή 'micro-arrays' και 'gene expression' σε συνδυασμό με 'metanalysis' ή 'meta-analysis'. Για να μπορέσει να αποφασιστεί εάν τα άρθρα που ανακτήθηκαν εμπεριείχαν πληροφορίες πάνω στο αντικείμενο του ενδιαφέροντός μας, μελετήθηκε ολόκληρο το κείμενο τους. Για να ερευνηθεί το ενδεχόμενο ύπαρξης άρθρων σχετικών με το θέμα τα οποία δεν αναγνωρίστηκαν από την αρχική αναζήτηση, ερευνήθηκαν οι βιβλιογραφίες των άρθρων που ανευρέθηκαν καθώς και οι βιβλιογραφίες κριτικών άρθρων που σχετίζονταν με το θέμα ενδιαφέροντος.

Τα άρθρα που επιλέχθηκαν αποτελούσαν μετα-αναλύσεις ερευνών που αφορούσαν ασθενείς και ελέγχους και χρησιμοποιούσαν δεδομένα μικροσυστοιχιών, επίσης δεν αποκλείστηκαν μελέτες που αφορούσαν την παρουσίαση κάποιας νέας μεθοδολογίας επεξεργασίας δεδομένων μικροσυστοιχιών, εφόσον για την παρουσίαση της μεθοδολογίας αυτής διεξήγαγαν κάποια δοκιμαστική έρευνα με δεδομένα μικροσυστοιχιών.

Από το πλήθος των άρθρων που συγκεντρώθηκαν απορρίφθηκαν εκείνα που αφορούσαν μεν μετα-αναλύσεις με δεδομένα μικροσυστοιχιών, αλλά εξέταζαν την σημαντικότητα ενός μόνου γονιδίου. Επίσης δεν συμπεριλήφθηκαν έρευνες που χρησιμοποιούσαν δεδομένα από οργανισμούς διαφορετικούς του ανθρώπου.

Τα δεδομένα που λήφθηκαν από τα πλήρη κείμενα των άρθρων που επιλέχθηκαν, κωδικοποιήθηκαν και μεταφέρθηκαν στο πρόγραμμα των Windows office, Excel [55] για να γίνει η περαιτέρω επεξεργασία τους με χρήση ενός στατιστικού λογισμικού.

2.1.2 Εξαγωγή δεδομένων

Μετά την συλλογή των άρθρων και την διαλογή τους, καταλήξαμε σε εκείνα τα οποία πληρούν τα κριτήρια της αναζήτησής μας. Η λήψη των δεδομένων από το κάθε άρθρο ακολούθησε ένα συγκεκριμένο πρότυπο, το οποίο περιείχε τα εξής πεδία: τον αριθμό κωδικοποίησης του άρθρου στην PubMed (PubMed ID, PMID), το επώνυμο του κύριου συγγραφέα, το έτος δημοσίευσης, την εθνικότητα του υπό έρευνα πληθυσμού, το πλήθος των μελετών που συμμετείχαν στη μετα-ανάλυση, χαρακτηριστικά των ασθενών από τους οποίους λήφθηκαν τα δείγματα, αντίστοιχα χαρακτηριστικά των ελέγχων, το συνολικό πλήθος των ασθενών που συμμετείχαν στη μετα-ανάλυση, το ελάχιστο και το μέγιστο πλήθος ασθενών που εμφανίστηκε, αντίστοιχα το συνολικό, το ελάχιστο και το μέγιστο πλήθος ελέγχων, η ασθένεια που

ήταν υπό μελέτη, το συνολικό πλήθος γονιδίων που ερευνήθηκαν μέσα στη μετα-ανάλυση, το πλήθος των γονιδίων που βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά καθώς και τα ονόματα των στατιστικώς σημαντικών γονιδίων. Αφού τα δεδομένα εισάχθηκαν στο Excel και κωδικοποιήθηκαν έγινε η επιλογή του στατιστικού λογισμικού για την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων.

2.1.3 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των δεδομένων η επιλογή έγινε μεταξύ των λογισμικών STATA [88] και Bioconductor [57], τα δύο αυτά λογισμικά είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα σε έρευνες που χρησιμοποιούν μετα-αναλυτικές μεθόδους. Και τα δύο προγράμματα παρέχουν επαρκή εργαλεία για την διεξαγωγή μετα-ανάλυσης και την εξαγωγή συμπερασμάτων από αυτή. Παρ'όλα αυτά στην παρούσα πτυχιακή εργασία επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί το Bioconductor για την στατιστική ανάλυση.

Το R Project [60] επιλέχθηκε καθώς προσφέρει μια πληθώρα εξειδικευμένων εργαλείων επεξεργασίας δεδομένων μικροσυστοιχιών. Η επιλογή αυτή έγινε ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος βαθμός εξειδίκευσης στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας. Μέσω των διαφορετικών πακέτων εφαρμογών που παρέχει το Bioconductor λαμβάνονται υπόψη διάφορες παράμετροι κατά την διαδικασία της στατιστικής επεξεργασίας.

Για την έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκε η πλατφόρμα ελεύθερου λογισμικού R έκδοση 2.9.0 και εγκαταστάθηκαν όλα τα πακέτα εφαρμογών που αφορούν στατιστική ανάλυση δεδομένων από μικροσυστοιχίες. Έγινε εγκατάσταση του λογισμικού Bioconductor καθώς και των απαραίτητων πακέτων εφαρμογών: affy, affydata, affyPLM, annaffy, annotate, Biobase, Biostrings, DynDoc, germa, genefilter, geneplotter, hgu95av2.db, limma, marray, matchprobes, multtest, ROC, vsn, xtable, affyQCReport. Επίσης εγκαταστάθηκε το πακέτο RankProd [83] το οποίο αποτελεί βασικό παράγοντα για την διεξαγωγή μετά-ανάλυσης με δεδομένα μικροσυστοιχιών με χρήση του Bioconductor.

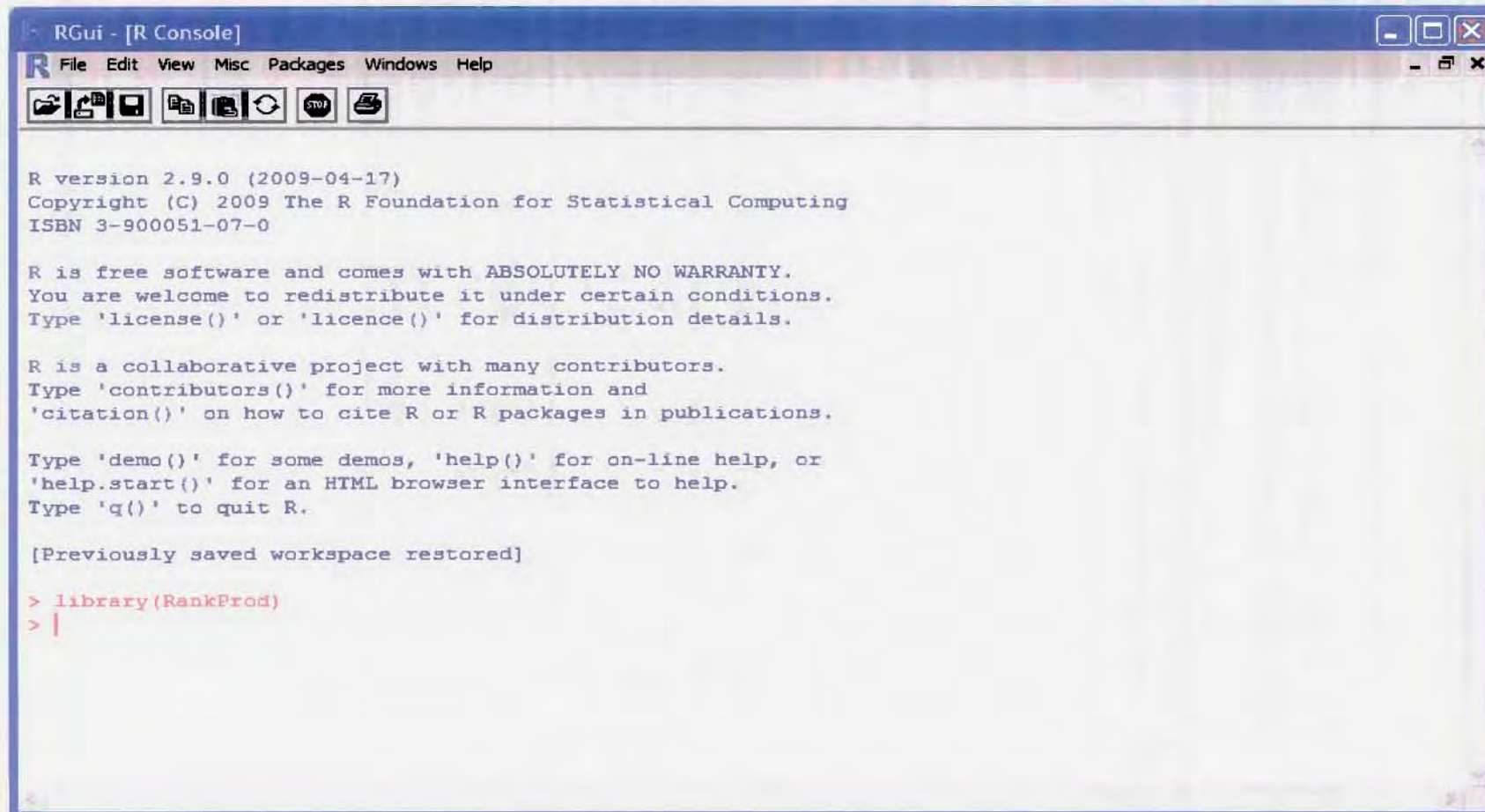
Για την εξαγωγή των διάφορων στατιστικών χαρακτηριστικών των δεδομένων καθώς καθώς και για την δημιουργία των ιστογραμμάτων συχνοτήτων που εμφανίζονται στο επόμενο κεφάλαιο έγινε χρήση του λογισμικού SPSS 17.0 [129].

Για την διεξαγωγή μετα-ανάλυσης ερευνήθηκε και ακόμη μία μέθοδος η οποία παρουσιάζει εξειδίκευση στις μικροσυστοιχίες. Η μέθοδος παρουσιάζεται διεξοδικά στο Zintzaras, E. and J.P. Ioannidis [89] και χρησιμοποιήθηκε για τη μετα-ανάλυση ομάδων δεδομένων που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων ONCOMINE [90].

2.2 RankProd

Πρόκειται για μία μέθοδο με την οποία επιτυγχάνεται η αναγνώριση των διαφορετικώς εκφρασμένων γονιδίων (υπέρ- ή υπό- ρυθμισμένα). Το RankProd κάνει εφαρμογή της μη-παραμετρικής μεθόδου της ταξινόμησης γινομένων, για την αναγνώριση των υπερ-ρυθμισμένων ή υπό-ρυθμισμένων γονιδίων υπό μία συνθήκη έναντι μίας άλλης συνθήκης (δύο διαφορετικές θεραπείες ή δύο διαφορετικοί τύποι ιστών) [83]. Το Rank Product είναι μια στατιστική εφαρμογή που εντοπίζει στοιχεία τα οποία βρίσκονται συνεχώς σε υψηλές θέσεις ταξινόμησης σε πλήθος λιστών, για παράδειγμα γονίδια τα οποία βρίσκονται επανειλημμένα ανάμεσα στα περισσότερο υπέρ-ρυθμισμένα γονίδια σε ένα πλήθος παρόμοιων πειραμάτων. Βασίζεται στην υπόθεση ότι, υπό την μηδενική υπόθεση ότι η σειρά όλων των στοιχείων είναι τυχαία, η πιθανότητα εύρεσης ενός συγκεκριμένου στοιχείου ανάμεσα στα r κορυφαία από τα n στοιχεία σε μια λίστα είναι $p = \frac{r}{n}$. Πολλαπλασιάζοντας αυτές τις πιθανότητες οδηγούμαστε στο ταξινομημένο προϊόν $RP = \prod_i \frac{r_i}{n_i}$, όπου r_i είναι η θέση ταξινόμησης του στοιχείου στην i -οστή λίστα και n_i είναι το συνολικό πλήθος των στοιχείων στη λίστα αυτή. Όσο πιο μικρή είναι η τιμή του RP, τόσο πιο μικρή είναι και η πιθανότητα η παρατηρηθείσα υψηλή θέση ταξινόμησης του στοιχείου στις λίστες να είναι τυχαία. Επιλέγεται μια λίστα με υπέρ- και υπό ρυθμισμένα γονίδια σύμφωνα με την εκτίμηση του ποσοστού των λανθασμένων προβλέψεων (percentage of false predictions, pfp), το οποίο είναι επίσης γνωστό ως ποσοστό λανθασμένης εύρεσης (FDR). Η εφαρμογή μπορεί να αναλύσει δεδομένα προερχόμενα από είτε από Affymetrix GeneChip είτε από Spotted cDNA μετά από κανονικοποίηση. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η ικανότητα συνδυασμού ομάδων δεδομένων με διαφορετικές προελεύσεις (μετα-ανάλυση) για να αυξήσει την ισχύ της αναγνώρισης. Πρακτικά η ικανότητα αυτή καθιστά ικανό τον συνδυασμό δεδομένων τα οποία προέρχονται από διαφορετικά εργαστήρια ή από διαφορετικά περιβάλλοντα (καθώς τα πειράματα έχουν διεξαχθεί σε διαφορετικές συνθήκες).

Το πρόγραμμα εκτελείται στο περιβάλλον της R όπως φαίνεται και στην εικόνα 6, στο οποίο εισάγουμε τα κωδικοποιημένα δεδομένα που έχουμε ήδη αποθηκευμένα στο Excel και έπειτα εκτελούμε την ανάλυση.



```
R version 2.9.0 (2009-04-17)
Copyright (C) 2009 The R Foundation for Statistical Computing
ISBN 3-900051-07-0

R is free software and comes with ABSOLUTELY NO WARRANTY.
You are welcome to redistribute it under certain conditions.
Type 'license()' or 'licence()' for distribution details.

R is a collaborative project with many contributors.
Type 'contributors()' for more information and
'citation()' on how to cite R or R packages in publications.

Type 'demo()' for some demos, 'help()' for on-line help, or
'help.start()' for an HTML browser interface to help.
Type 'q()' to quit R.

[Previously saved workspace restored]

> library(RankProd)
> |
```

Εικόνα 6. Απεικόνιση της πλατφόρμας ελεύθερου λογισμικού R έχοντας το πακέτο του Bioconductor RankProd ενεργό.

2.3 METRADISC

Πρόκειται για την μέθοδο μετα-ανάλυσης που προτάθηκε στο Zintzaras, E. and J.P. Ioannidis [89]. Αποτελεί μια μέθοδο για τον συνδυασμό πληροφοριών ομάδων δεδομένων που είναι προσανατολισμένες στην ανακάλυψη (discovery-oriented), καθώς και για τον έλεγχο της ετερογένειας για κάθε βιολογική μεταβλητή που αποτελεί αντικείμενο ενδιαφέροντος (μεταβλητές-ενδιαφέροντος). Η μέθοδος βασίζεται στον μη-παραμετρικό έλεγχο αντιμετάθεσης Monte Carlo. Οι υπό εξέταση μεταβλητές ταξινομούνται σε κάθε μελέτη σύμφωνα με το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας. Το METRADISC ελέγχει για κάθε μεταβλητή-ενδιαφέροντος την μέση τιμή των τάξεων που έχει λάβει στην λίστα κατάταξης κάθε μελέτης, καθώς και την ετερογένεια μεταξύ των μελετών. Αφού γίνει έλεγχος στις μελέτες για ισοπαλίες και διαφορές όσον αφορά τις μεταβλητές που εξετάστηκαν, γίνεται τυχαία αντιμετάθεση των τάξεων για κάθε μελέτη και υπολογίζονται τιμές για τις εξής δύο νέες μεταβλητές: τη μέση τιμή τάξεων και την ετερογένεια. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για να δημιουργηθούν μηδενικές κατανομές για τη μέση τιμή τάξεων και την ετερογένεια.

Ο υπολογισμός των δύο μεταβλητών, της μέσης τιμής τάξεων (\mathcal{R}^*) και της ετερογένειας (Q^*) για κάθε μεταβλητή μέσα στις μελέτες, βασίζεται στις κανονικοποιημένες τάξεις. Η μέση τιμή των τάξεων \mathcal{R}^* ορίζεται ως:

$$\mathcal{R}^* = \frac{\sum_{i=1}^s \mathcal{R}_i}{s}$$

Όπου \mathcal{R}_i η τάξη της μεταβλητής που είναι υπό εξέταση για την μελέτη i ($i = 1$ έως s μελέτες). Απεικόνιση του προγράμματος κατά την διαδικασία υπολογισμού του \mathcal{R}^* φαίνεται στην εικόνα 7.

Η τιμή της μεταβλητής Q^* υπολογίζεται ως το άθροισμα των τετραγώνων των αποκλίσεων των τάξεων της μεταβλητής που είναι υπό εξέταση για κάθε μελέτη, από τον μέσο των τάξεων αυτής της μεταβλητής. Αποτελεί μια γενίκευση του Q του *Cochran* [118]:

$$Q^* = \sum_{i=1}^s (\mathcal{R}_i - \mathcal{R}^*)^2.$$

Απεικόνιση του προγράμματος κατά την διαδικασία υπολογισμού του \mathcal{R}^* φαίνεται στην εικόνα 8.

Η στατιστική σημαντικότητα των δύο αυτών μεταβλητών για κάθε βιολογική μεταβλητή εξακριβώνεται εμπειρικά έναντι των κατανομών των μέσων τιμών των τάξεων και της ετερογένειας, υπό την μηδενική υπόθεση ότι οι τάξεις καθορίζονται με τυχαίο τρόπο.

```
METRADISC: Software for Ranked Discovery Datasets including microarrays data
by Zintzaras & Ioannidis

The input file is the "ranks_classed.txt":
1st 7th columns correspond to the 7 studies,
8th column is the information class,
each row corresponds to a marker

METRADISC R, for each marker calculates the R metric and the P value

The program currently operates only for the attached dataset (ranks_classed)
till its publication

Enter the number runs
-
```

Εικόνα 7. Αναπαράσταση του προγράμματος METRADISC εν λειτουργία για τον υπολογισμό του R^ .*

```
METRADISC: Software for Ranked Discovery Datasets including microarrays data
by Zintzaras & Ioannidis

The input file is the "ranks_classed.txt":
1st 7th columns correspond to the 7 studies,
8th column is the information class,
each row corresponds to a marker

METRADISC Q, for each marker calculates the Q metric and the P value

The program currently operates only for the attached dataset (ranks_classed)
till its publication

Enter the number runs
-
```

Εικόνα 8. Αναπαράσταση του προγράμματος METRADISC εν λειτουργία για τον υπολογισμό του Q^ .*

3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

3.1 Στατιστικά στοιχεία που προκύπτουν από την ανάλυση των ερευνών που ανακτήθηκαν μέσω βιβλιογραφικής αναζήτησης

Έγινε εκτενής βιβλιογραφική αναζήτηση στο διαδίκτυο για την ανάκτηση μελετών που ασχολήθηκαν με την εφαρμογή της μεθοδολογίας της μετα-ανάλυσης σε δεδομένα μικροσυστοιχιών. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες επερωτήσεις στις δημόσιες βάσεις δεδομένων όπου έγινε η αναζήτηση για την ανάκληση εκείνων των μελετών που πλησίαζαν περισσότερο τα κριτήρια της αναζήτησης που τέθηκε. Οι κυριότερες επερωτήσεις που τέθηκαν ήταν οι εξής: “microarrays AND metanalysis”, “microarrays AND metanalysis”, “microarrays AND meta-analysis”, “metanalysis AND ‘gene expression’”, “meta-analysis AND (microarrays OR “gene expression”)

Από τις επερωτήσεις που έγιναν ανακλήθηκαν συνολικά 509 μελέτες που αφορούσαν το αντικείμενο. Παρατηρήθηκε ύστερα από έρευνα ότι από τις μελέτες αυτές οι 79 αποτελούσαν είτε λανθασμένες ευρέσεις είτε αποτελούσαν ανασκοπήσεις παλαιότερων ερευνών, για τον λόγο αυτό αποκλείστηκαν από την έρευνα. Από τις έρευνες που απέμειναν ένα ποσοστό της τάξεως του 83,02 % αποκλείστηκε επίσης αφού δεν πληρούσε τα κριτήρια της αναζήτησης για τους εξής λόγους:

- 1) αφορούσε πειράματα μικροσυστοιχιών που ερευνούσαν εξολοκλήρου γενετικό υλικό οργανισμών διαφορετικών του ανθρώπου,
- 2) μέσα στα δείγματα του γενετικού υλικού που ήταν υπό εξέταση βρισκόταν και δείγματα γενετικού υλικού άλλο οργανισμού,
- 3) αφορούσε μετα-αναλύσεις μικροσυστοιχιών στις οποίες ήταν υπό έρευνα η συσχέτιση ενός μόνο γονιδίου με μία ασθένεια,
- 4) αποτελούσαν έρευνες που παρουσίαζαν είτε τη δημιουργία είτε την επέκταση μιας βάσης δεδομένων που εμπειρείχε ομάδες δεδομένων από πειράματα μικροσυστοιχιών, τα οποία είναι δημόσια διαθέσιμα για τους ενδιαφερόμενους ερευνητές,
- 5) ήταν δημοσιεύσεις οι οποίες παρουσίαζαν κάποια νέα μεθοδολογία μετα-ανάλυσης με δεδομένα μικροσυστοιχιών ή κάποιο νέο λογισμικό που αφορούσε την αυτόματη εκτέλεση κάποιας νέας ή ήδη υπάρχουσας μεθοδολογίας.

Από τις 73 εναπομείνουσες έρευνες μόνο το 28,77 % τηρούσε πλήρως τα κριτήρια της αναζήτησής μας, αποτελούσαν δηλαδή μετα-αναλύσεις μελετών ασθενών-μαρτύρων που χρησιμοποιούσαν μικροσυστοιχίες. Παρακάτω, στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα στατιστικά αυτά στοιχεία που αφορούν την επιλογή των κατάλληλων ερευνών. Είναι φανερό λοιπόν πως το πλήθος των μετα-αναλύσεων που μελετούν μικροσυστοιχίες είναι μικρό, αν και παρατηρείται αύξηση τα τελευταία χρόνια.

Πίνακας 3.

Στατιστικά στοιχεία μελετών που ανακτήθηκαν με βιβλιογραφική έρευνα.

Μετά-αναλύσεις μελετών με ασθενείς-μάρτυρες.	21 (5,95 %)
Μετά-αναλύσεις μελετών χωρίς ασθενείς-μάρτυρες.	52 (14,73 %)
Δεν προκρίθηκαν από τα κριτήρια επιλογής.	201 (56,94 %)
Λανθασμένες ανακαλύψεις.	79 (22,38 %)
Συνολικό πλήθος μελετών.	353 (100 %)

Πίνακας 3. Στατιστικά στοιχεία της βιβλιογραφικής αναζήτησης που έγινε για την επιλογή των κατάλληλων δημοσιεύσεων. Στις παρενθέσεις φαίνονται τα αντίστοιχα ποσοστά επί του συνόλου των μελετών που ανακτήθηκαν από όλες τις επερωτήσεις στις δημόσιες βάσεις δεδομένων.

Από τις μετα-αναλύσεις που ανακτήθηκαν μόνο οι 21 [89, 91, 96-102, 107-117] τηρούσαν τα κριτήρια της αναζήτησης (τα στοιχεία των μετα-αναλύσεων παρουσιάζονται στο παράρτημα 1). Αποτελούν μετα-αναλύσεις ερευνών με δεδομένα από μικροσυστοιχίες. Σε μία από αυτές τις έρευνες παρουσιάστηκαν δύο μετα-αναλύσεις [113]. Συνολικά στις 21 αυτές δημοσιεύσεις εμπεριέχονται 99 μελέτες που συμμετέχουν στις μετα-αναλύσεις. Παρατηρήθηκε ύστερα από σύγκριση με δεδομένα μιας έρευνας που περιείχε 55 μετα-αναλύσεις μελετών γενετικής συσχέτισης [128], ότι σε μετα-αναλύσεις που αφορούν δεδομένα μικροσυστοιχιών το πλήθος των μελετών υπό εξέταση είναι κατα πολύ μικρότερο. Αφού οι μετα-αναλύσεις που αφορούσαν μικροσυστοιχίες εμπεριείχαν κατά μέσο όρο 4,7 μελέτες ενώ στις μετα-αναλύσεις γενετικής συσχέτισης ο μέσος όρος ανέρχεται στις 11.

Τα παραπάνω συνοψίζονται στους πίνακες 4-5 καθώς και στην εικόνα 9 όπου παρουσιάζεται το διάγραμμα συχνοτήτων των μελετών που συμμετείχαν στις μετα-αναλύσεις.

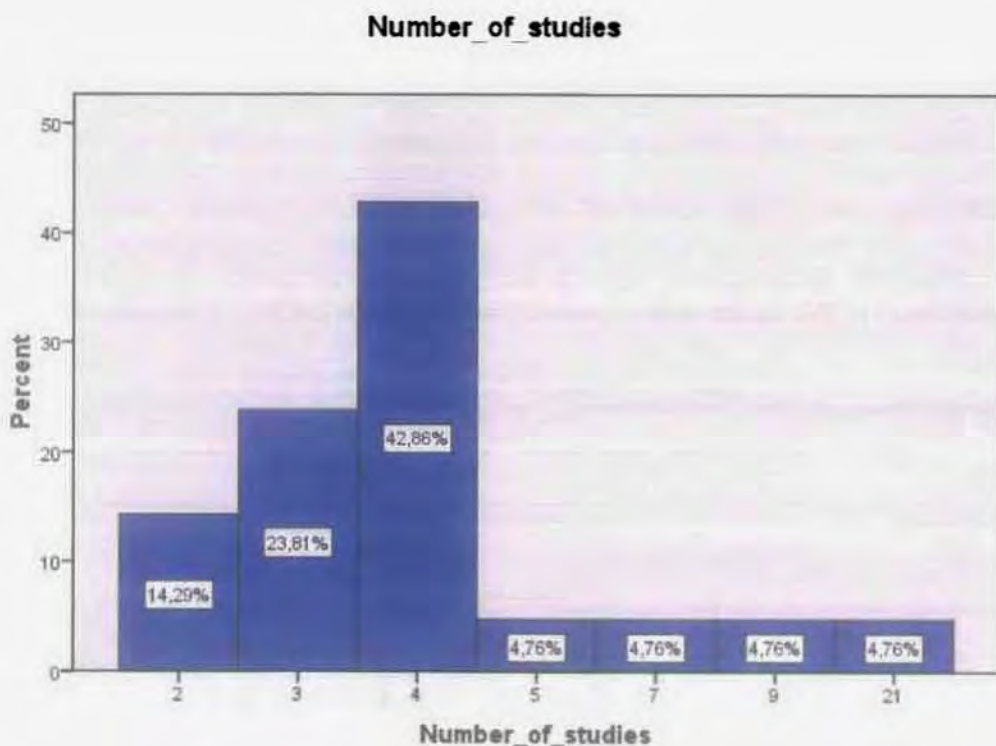
Statistics

Number of studies		
N	Valid	21
	Missing	1
Mean		4,71
Median		4,00
Std. Deviation		4,064
Variance		16,514
Range		19
Minimum		2
Maximum		21
Sum		99

Πίνακας 4. Παρουσιάζονται οι τιμές των μεταβλητών: μέση τιμή, διάμεσος, τοπική απόκλιση, διασπορά, εύρος, ελάχιστο, μέγιστο καθώς και το άθροισμα των μελετών που συμμετείχαν στις μετα-αναλύσεις.

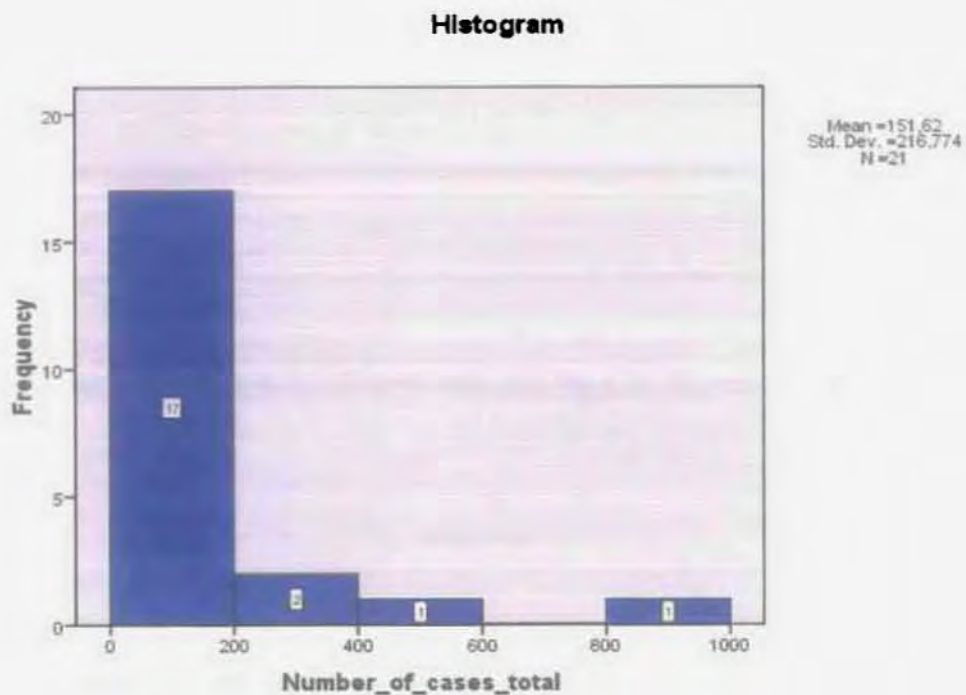
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	2	3	13,6	14,3	14,3
	3	5	22,7	23,8	38,1
	4	9	40,9	42,9	81,0
	5	1	4,5	4,8	85,7
	7	1	4,5	4,8	90,5
	9	1	4,5	4,8	95,2
	21	1	4,5	4,8	100,0
	Total	21	95,5	100,0	
Missing	System	1	4,5		
Total		22	100,0		

Πίνακας 5. Πίνακας συχνοτήτων των μελετών που συμμετείχαν τις μετα-αναλύσεις.

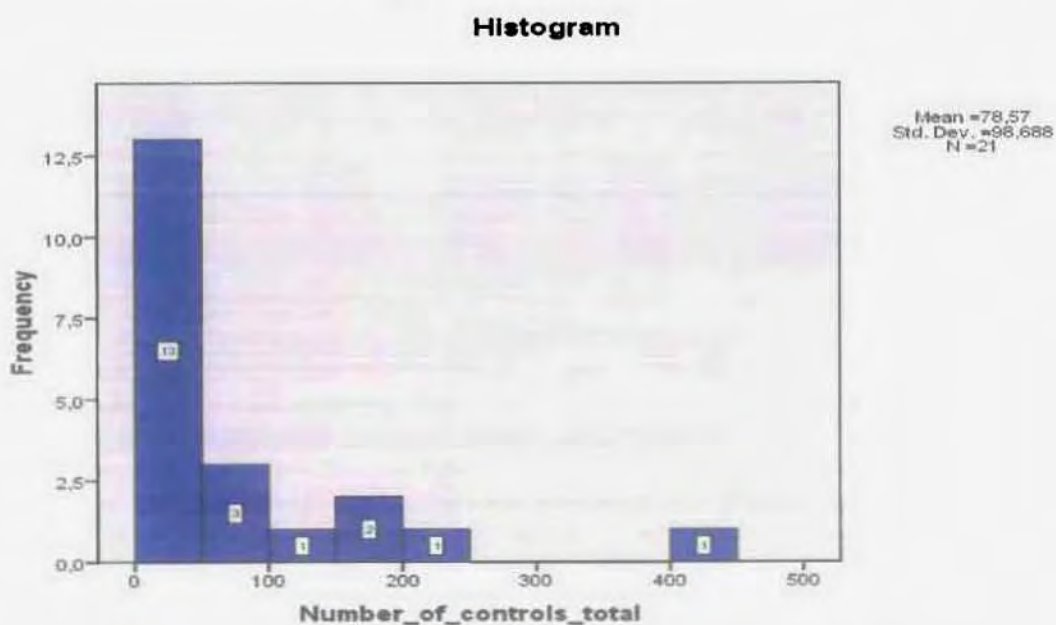


Εικόνα 9. Διάγραμμα συχνοτήτων που παρουσιάζει τα ποσοστά των μετα-αναλύσεων σύμφωνα με το πλήθος των μελετών που περιείχαν.

Συνολικά στις 99 αυτές μελέτες υπήρξαν 3184 δείγματα ασθενών (εικόνα 10), με μέσο όρο 152 δείγματα ανά μετα-ανάλυση και 1650 δείγματα των αντίστοιχων μαρτύρων (εικόνα 11), με μέσο όρο 79 δειγμάτων ανά μετα-ανάλυση.



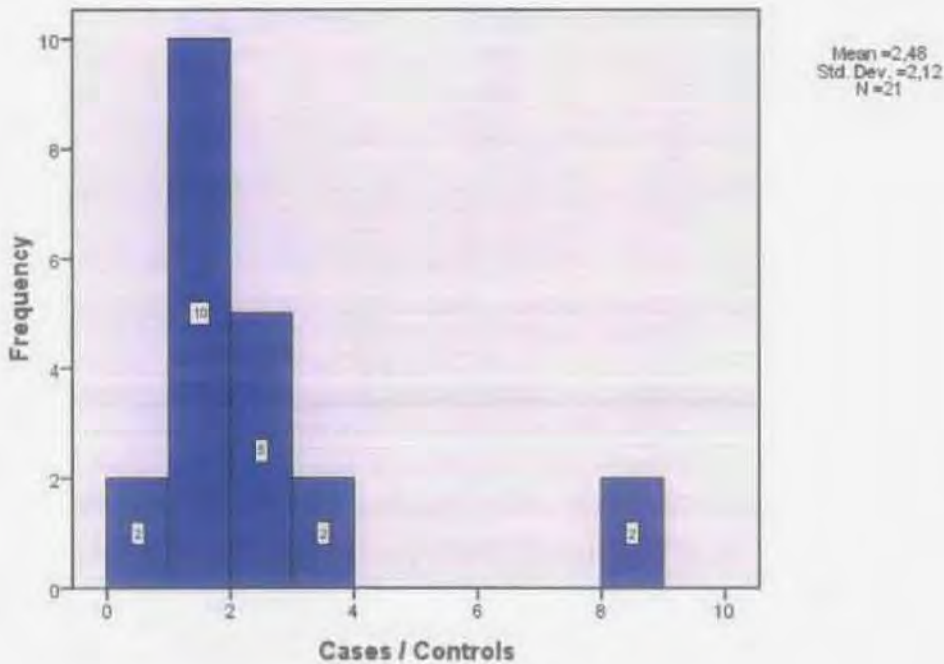
Εικόνα 10. Ιστόγραμμα συχνοτήτων που παρουσιάζει το πλήθος των δειγμάτων, που λήφθηκαν από ασθενείς, που εμφανίζονται σε κάθε μετα-ανάλυση.



Εικόνα 11. Ιστόγραμμα συχνοτήτων που παρουσιάζει το πλήθος των δειγμάτων, που λήφθηκαν από μάρτυρες, που εμφανίζονται σε κάθε μετα-ανάλυση.

Για κάθε μια από τις 21 δημοσιεύσεις καταγράφηκε ο μικρότερος αριθμός ασθενών αλλά και μαρτύρων που εμφανίστηκε ανάμεσα στις μελέτες που συμμετείχαν, και εξάχθηκε ο μέσος όρος για κάθε ομάδα, έτσι τα ελάχιστα δείγματα ασθενών παρουσίασαν μέσο όρο 15 και τα ελάχιστα δείγματα των μαρτύρων 7. Επίσης καταγράφηκαν αντίστοιχα και οι μεγαλύτεροι αριθμοί δειγμάτων για τους ασθενείς και τους μάρτυρες οι οποίοι εμφανίστηκαν στις μετα-αναλύσεις και εξάχθηκαν οι μέσοι όροι αυτών, οι οποίοι ήταν 53 για τους ασθενείς και 30 για τους μάρτυρες. Παρατηρούμε λοιπόν πως οι μέσοι όροι των ελάχιστων και των μέγιστων αριθμών των δειγμάτων που λήφθηκαν από ασθενείς και μάρτυρες, για κάθε μετα-ανάλυση, είναι αρκετά χαμηλοί, όπως επίσης και ότι υπάρχει μεγάλη διαφορά στο πλήθος των ασθενών σε σχέση με των μαρτύρων όπως φαίνεται και στην εικόνα 12, όπου παρουσιάζεται το ιστόγραμμα συχνοτήτων των λόγων του πλήθους δειγμάτων ασθενών/μαρτύρων για κάθε μετανάλυση.

Histogram

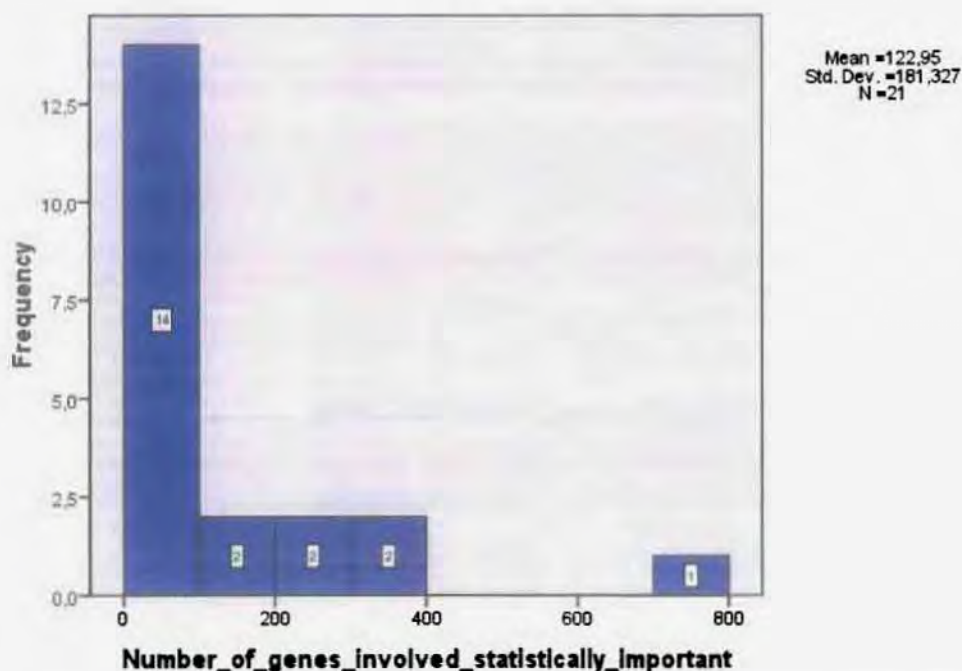


Εικόνα 12. Ιστόγραμμα συχνοτήτων που παρουσιάζει τις συχνότητες των λόγων του πλήθους δειγμάτων ασθενών/μαρτύρων για κάθε μετα-ανάλυση.

Ένα μεγάλο πλήθος γονιδίων ερευνήθηκαν στις 21 μετα-αναλύσεις, και κατεπέκταση στις 99 μελέτες που περιελάμβαναν, τα οποία και ελέγχθηκαν για την τυχόν διαφορετική έκφρασή τους στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την έκφρασή τους στα δείγματα των μαρτύρων. Με την κάθε μετα-ανάλυση να εξετάζει κατά μέσο όρο 10776 γονίδια. Για κάθε έρευνα μόνο ένα μέρος των γονιδίων αποτελούσε τα στατιστικά σημαντικά γονίδια. Τα γονίδια αυτά διαφέραν ως προς

την έκφρασή τους στους ασθενείς σε σχέση με τους μάρτυρες. Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι είτε υπερ-εκφράζονταν στα δείγματα των ασθενών ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στα δείγματα των μαρτύρων, είτε υπό-εκφράζονταν στα δείγματα που λήφθηκαν από τους ασθενείς κάτι το οποίο δεν συνέβαινε στα δείγματα που λήφθηκαν από τους μάρτυρες. Ο έλεγχος της σημαντικότητας για κάθε γονίδιο που περιλαμβάνονταν στην μετα-ανάλυση γινόταν για κάθε μελέτη που συμμετείχε σε αυτή. Στο τέλος με τον συνδυασμό των μετρήσεων στατιστικής σημαντικότητας που λάμβανε το κάθε γονίδιο από την κάθε μελέτη ξεχωριστά προέκυπτε η τελική του θέση στην κατάταξη των γονιδίων, η οποία περιείχε τα γονίδια που είτε υπε-εκφράζονταν είτε υπό-εκφράζονταν σε μια από τις δύο ομάδες (ασθενείς-μάρτυρες). Στις 21 μετα-αναλύσεις που αφορούσαν μελέτες με δεδομένα μικροσυστοιχιών εμφανίστηκαν συνολικά 2582 στατιστικώς σημαντικά γονίδια, με μέσο όρο εμφάνισης 123 γονίδια ανά μετά-ανάλυση (εικόνα 13). Το πλήθος των γονιδίων που εξέταζε η κάθε μελέτη μέσα στις μετα-αναλύσεις αυτές, των οποίων η διαφορετική τους έκφραση μεταξύ των ομάδων ασθενών και μαρτύρων, κρίθηκε στατιστικώς σημαντική κυμαινόταν από το ελάχιστο 5 έως το μέγιστο των 774 γονιδίων.

Histogram



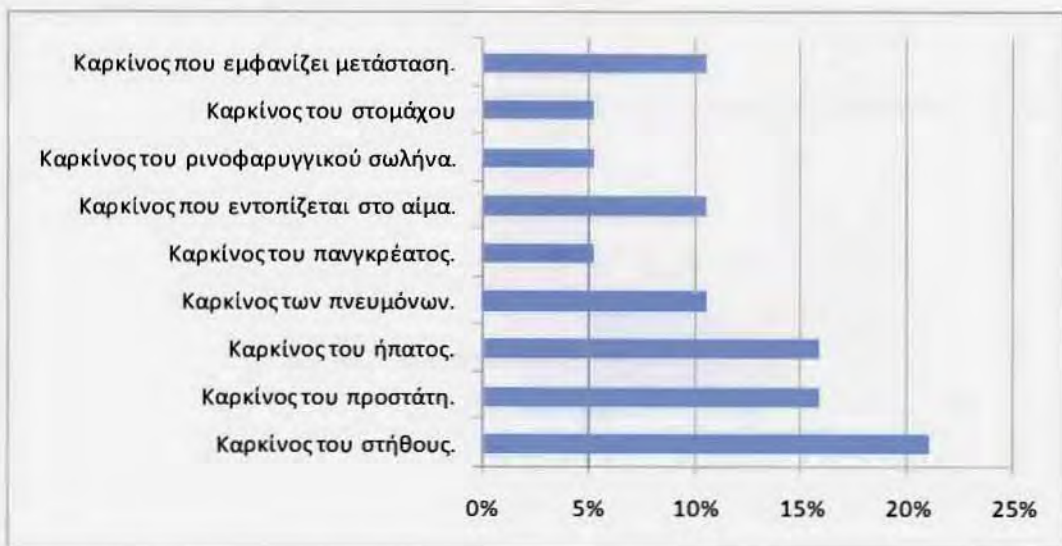
Εικόνα 13. Ιστόγραμμα συχνοτήτων που παρουσιάζει τις συχνότητες του πλήθους των γονιδίων που παρουσίασαν διαφορετική έκφραση μεταξύ των ομάδων των ασθενών και των μαρτύρων, σε κάθε μετά-ανάλυση και η διαφορετικότητα του επιπέδου έκφρασής τους κρίθηκε στατιστικώς σημαντική.

Εάν επιλέξουμε ως σημείο αναφοράς την ασθένεια την οποία μελετούσε η κάθε μετά-ανάλυση, παρατηρούμε ότι ένα ποσοστό της τάξεως του 90,48% ασχολήθηκε με την ασθένεια του καρκίνου γενικά, για διάφορους τύπους της ενώ

μόνο ένα 9,52 % ασχολήθηκε με κάποια διαφορετική ασθένεια. Παρατηρείται ένα υψηλό επίπεδο εφαρμογής των μικροσυστοιχιών σε μελέτες που ερευνούν τον καρκίνο, όπως φαίνεται και από την συνεχή αύξηση των καταθέσεων ομάδων δεδομένων από πειράματα μικροσυστοιχιών στις δημόσιες βάσεις δεδομένων που αφορούν αποκλειστικά μελέτες που διερευνούν τον καρκίνο.

Υπάρχουν τρεις ευρέως γνωστές βάσεις δεδομένων τέτοιου τύπου, μια είναι η Oncomine [90] η οποία αφορά αποκλειστικά δεδομένα μικροσυστοιχιών από πειράματα που αφορούν τον καρκίνο. Στην βάση υποστηρίζονται δεδομένα μελετών που ερευνούν: την ευαισθησία των φαρμάκων, την ιστολογία καρκίνου, διάφορους τύπους καρκίνου, διαφορές ασθενών-μαρτύρων, την ανταπόκριση των ασθενών σε μια θεραπεία, την μετάσταση εν αντίθεση με τον αρχικό όγκο. Εμπεριέχονται διαφορετικοί τύποι καρκίνου αναλόγως με την περιοχή εμφάνισής τους. Έτσι στη βάση υπάρχουν μικροσυστοιχίες για καρκίνο: της ουροδόχου κύστης, του εγκεφάλου, του στήθους, του τραχήλου της μήτρας, του γαστρεντερικού συστήματος, του νεφρού, λευχемίας, του ήπατος, των πνευμόνων, μελανώματος, μυελώματος, των ωοθηκών, του παγκρέατος, του προστάτη και σαρκώματος. Οι καταθέσεις που δέχεται η βάση δεδομένων αυξάνονται συνεχώς, καθώς όλο και περισσότεροι επιστήμονες επιλέγουν τις μικροσυστοιχίες στα πειράματά τους κατά του καρκίνου. Άλλη μια βάση δεδομένων είναι η Βάση μικροσυστοιχιών του Stanford [120]. Η οποία δεν εξειδικεύεται αποκλειστικά σε μελέτες που ερευνούν τον καρκίνο αλλά περιέχει δεδομένα μικροσυστοιχιών από διάφορους οργανισμούς και για διάφορες ασθένειες. Παρομοίως και η GEO [53] περιέχει δεδομένα από πειράματα με μικροσυστοιχίες που αφορούν την έρευνα διάφορων ασθενειών αλλά και δείγματα διάφορων οργανισμών.

Στις 21 μετα-αναλύσεις που αναφέρονται, οι 19 ασχολήθηκαν με κάποια μορφή της ασθένειας του καρκίνου (εικόνα 14).

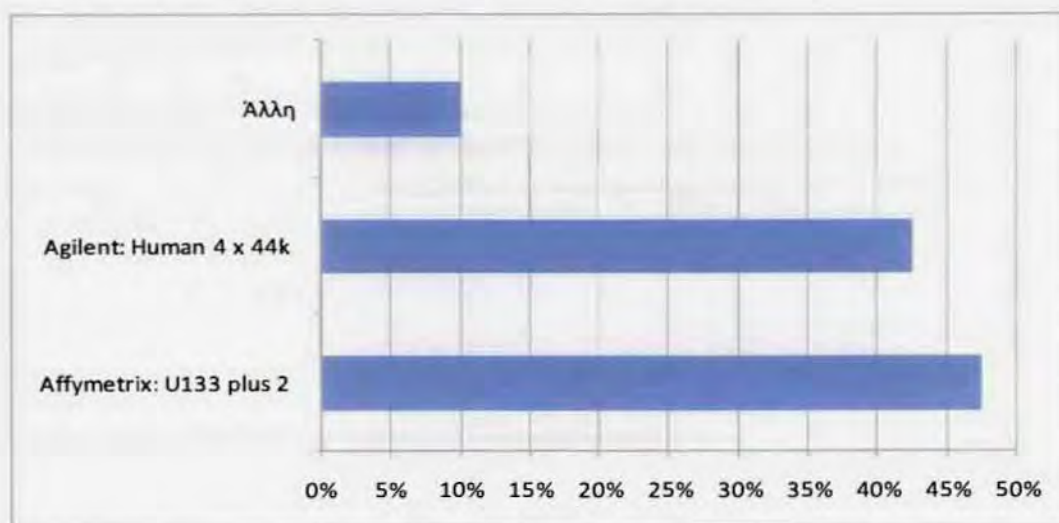


Εικόνα 14. Διάγραμμα συχνοτήτων που παρουσιάζει τα ποσοστά των μελετών που ερεύνησαν γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου.

Συγκεκριμένα με τον καρκίνο του στήθους ασχολήθηκε το 21,05 %, με τον καρκίνο του προστάτη το 15,79 %, με τον καρκίνο του ήπατος το 15,79 % επίσης, με τον καρκίνο των πνευμόνων το 10,53 %, με τον καρκίνο του παγκρέατος το 5,26 %, με διάφορες μορφές καρκίνου που εμφανίζονται στο αίμα το 10,53 %, με τον καρκίνο

του στομάχου το 5,26 %, με τον καρκίνο του ρινοφαρυγγικού σωλήνα το 5,26 % και τέλος ένα ποσοστό της τάξεως του 10,53 % ασχολήθηκε με διάφορες μορφές καρκίνου που εμφανίζουν μετάσταση.

Όσον αφορά το είδος της πλατφόρμας μικροσυστοιχιών που χρησιμοποιήθηκε στην κάθε μελέτη, δύο πλατφόρμες είναι αυτές που φαίνεται ότι κατέχουν τα ηνία. Η Affymetrix: U133 plus 2 η οποία χρησιμοποιήθηκε στο 47,47 % των συνολικά 99 μελετών που συμμετείχαν στις μετα-αναλύσεις, και η Agilent: Human 4 x 44k της οποίας έγινε χρήση στο 42,43 % των μελετών (εικόνα 15).



Εικόνα 15. Διάγραμμα συχνότητας που παρουσιάζει σε ποιο ποσοστό των μελετών χρησιμοποιήθηκε η κάθε πλατφόρμα μικροσυστοιχιών.

Εάν παρατηρήσουμε τα δημογραφικά στοιχεία των μετα-αναλύσεων, διακρίνουμε μια αυξημένη ενασχόληση με την μετα-ανάλυση μελετών που ασχολήθηκαν με μικροσυστοιχίες στην Βρετανία. Αυτό καθώς το ποσοστό των μελετών που δημοσιεύθηκαν από την Βρετανία φθάνει το 61,91 % με δεύτερες να ακολουθούν οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (ΗΠΑ) με 28,57 % ενώ το ποσοστό του 4,76 % έλαβαν η Γερμανία και οι Κάτω Χώρες. Ερευνώντας τις χρονολογίες των δημοσιεύσεων παρατηρήθηκε ότι εμφανίστηκε ραγδαία αύξηση στις δημοσιεύσεις μετα-αναλύσεων που αφορούσαν μελέτες με δεδομένα μικροσυστοιχιών κατά το 2006 αφού το ποσοστό τέτοιου είδους μελετών το 2004 ήταν 14,29 % ενώ το 2006 ανέβηκε στο 23,81 %. Παρατηρήθηκε επίσης μια σταθερή αύξηση της τάξεως του 7,1 % ανά δύο χρόνια στο πλήθος των δημοσιεύσεων με θέμα ενασχόλησης την μετα-ανάλυση ερευνών με δεδομένα από πειράματα μικροσυστοιχιών που αφορούν ομάδες ασθενών-μαρτύρων.

3.2 Εφαρμογή δεδομένων στο RankProd και ερμηνεία αποτελεσμάτων

Για την παρουσίαση της εφαρμογής λογισμικού RankProd που αποτελεί πακέτο του Bioconductor επιλέχθηκε ένα σετ δεδομένων από μικροσυστοιχίες [119].

Το σετ περιέχει δεδομένα για 500 γονίδια και 10 δείγματα, , προέρχονται από τη σειρά πειραμάτων Affy ATH1 που έγινε για να διαπιστωθεί η ανταπόκριση σε μπρασινοστεροειδή του οργανισμού *Arabidopsis*, η έρευνα διεξάχθηκε σε δύο διαφορετικά εργαστήρια, τα δείγματα διακρίνονται σε 6 από το πρώτο εργαστήριο και 4 από το δεύτερο.

Τα δεδομένα που περιέχονται αποτελούνται από: ένα πίνακα 500×10 όπου περιέχονται τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων στα 10 δείγματα, οι γραμμές αντιστοιχούν στα γονίδια και οι στήλες στα δείγματα mRNA που εξάχθηκαν, μία μεταβλητή που περιέχει στη μορφή πίνακα-γραμμής τις αντίστοιχες ομάδες των δειγμάτων, 5 δείγματα που τους χορηγήθηκε θεραπεία με μπρασινοστεροειδή που αποτελούν την ομάδα των ασθενών (ομάδα 1, κωδικός 1) και 5 δείγματα στα οποία δεν χορηγήθηκε η θεραπεία τα οποία αποτελούν την ομάδα των μαρτύρων (ομάδα 2, κωδικός 0), μία μεταβλητή που περιέχει στη μορφή πίνακα-γραμμής την προέλευση των δειγμάτων, 6 δείγματα από το πρώτο εργαστήριο (κωδικός 1) και 4 δείγματα από το δεύτερο εργαστήριο (κωδικός 2), καθώς και ένα πίνακα που περιέχει τα ονόματα των 500 γονιδίων.

3.2.1 Ανάλυση των δεδομένων με το RankProd

3.2.1.1 Εισαγωγή δεδομένων και ανάλυση

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα βήματα που χρειάζεται να γίνουν ώστε να επιτευχθεί η ανάλυση της διαφορετικής έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των δύο ομάδων με το λογισμικό που παρουσιάζεται.

Αρχικά ενεργοποιούμε την εφαρμογή RankProd δίνοντας την εντολή `library(RankProd)` στην κονσόλα του R. Έπειτα καλούμε τα δεδομένα με την εντολή `data(arab)`. Έπειτα με την εντολή `arab.origin` ορίζουμε την προέλευση των δειγμάτων ενώ με την `arab.cl` την ομάδα στην οποία ανήκει το κάθε δείγμα (ασθενείς ή μάρτυρες). Για να γίνει η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων με τη μέθοδο της ταξινόμησης γινομένων γράφουμε:

```
RP.adv.out<-RPadvance(arab,arab.cl,arab.origin, num.perm=100, logged=TRUE,  
na.rm=FALSE, gene.names=arab.gnames, plot=TRUE,  
rand=123)
```

όπου,

- `RP.adv.out`: ορίζουμε το όνομα της μεταβλητής στην οποία θα αποθηκευτεί το αποτέλεσμα της ανάλυσης
- `RPadvance`: η συνάρτηση του RankProd η οποία εκτελεί την ανάλυση
- `arab`: το όνομα του πίνακα που περιέχει τα δεδομένα για κάθε γονίδιο σε κάθε δείγμα
- `arab.cl`: το όνομα της μεταβλητής που περιέχει τους κωδικούς των δειγμάτων αναλόγως σε ποια ομάδα ανήκουν (τιμή 1 για τους ασθενείς και 0 για τους

μάρτυρες)

- arab.origin: το όνομα της μεταβλητής που περιέχει τους κωδικούς των δειγμάτων αναλόγως την προέλευση τους (τιμή 1 για το πρώτο εργαστήριο και 0 για το δεύτερο)
- num.perm=100: ορίζει τον ελάχιστο αριθμό επαναλήψεων
- logged=TRUE: εφόσον τα δεδομένα είναι κανονικοποιημένα και σε λογαριθμική κλίμακα η τιμή της μεταβλητής logged είναι TRUE, σε διαφορετική περίπτωση είναι FALSE
- na.rm=FALSE: με την τιμή FALSE δηλώνουμε ότι οι τιμές που λείπουν δεν λαμβάνονται υπόψη κατά τον υπολογισμό των τάξεων. Σε διαφορετική περίπτωση, όπου η τιμή οριστεί TRUE οι τιμές που λείπουν αντικαθιστούνται με τη μέση τιμή των τιμών που έχει λάβει το συγκεκριμένο γονίδιο στα υπόλοιπα δείγματα
- gene.names=arab.gnames: αντιστοιχεί τα ονόματα των γονιδίων που υπάρχουν στο σετ δεδομένων με τα ποσοστά λανθασμένης πρόβλεψης που υπολογίζονται (percentage of false prediction (pfp))
- plot=TRUE: εφόσον η τιμή της μεταβλητής είναι TRUE, παράγει γράφημα στο οποίο γίνεται σύγκριση των ποσοστών λανθασμένης εύρεσης με την τάξη του κάθε γονιδίου
- rand=123: εάν η μεταβλητή έχει καθορισμένη τιμή τότε η γεννήτρια τυχαίων αριθμών ενεργοποιείται.

3.2.1.2 Εξαγωγή αποτελέσματος και ερμηνεία

Το αποτέλεσμα αποτελεί μια εκτίμηση του ποσοστού των λανθασμένων προβλέψεων (pfp) των διαφορετικώς εκφρασμένων γονιδίων ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η αναγνώριση της διαφορετικής έκφρασης αποτελείται από δύο μέρη, την αναγνώριση των άνω-ρυθμισμένων και των κάτω-ρυθμισμένων γονιδίων στην ομάδα 2 σε σχέση με την ομάδα, αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αποτελείται από τα εξής:

- pfp: εκτίμηση του ποσοστού της λανθασμένης πρόβλεψης για κάθε γονίδιο ανάμεσα στις δύο ομάδες
- pval: εκτίμηση του pvalue για κάθε γονίδιο των περιπτώσεων αυτό να είναι είτε άνω- είτε κάτω- ρυθμισμένο
- RPs: οι αρχικές τάξεις των γονιδίων σε κάθε ομάδα
- RPrank: οι τάξεις των γονιδίων όπως προκύπτουν από την ανάλυση, σε

αύξουσα σειρά

- **Origank**: οι τάξεις όπως προκύπτουν μετά από κάθε σύγκριση, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό των γινομένων για την ταξινόμηση
- **AveFC**: υπολογισμός των μέσων αλλαγών πτύχωσης μεταξύ των δύο ομάδων, ομάδα 1 (μάρτυρες)/ομάδα 2(ασθενείς) και μεταξύ των δύο προελεύσεων των δειγμάτων (εργαστήριο 1, εργαστήριο 2)

Το ποσοστό λανθασμένης πρόβλεψης (pfr), θεωρητικά ισοδυναμεί με το λόγο λανθασμένης εύρεσης (FDR), και είναι πιθανό η τιμή του να είναι μεγαλύτερη του 1. Η συνάρτηση ερευνά την ύπαρξη άνω- και κάτω-ρυθμισμένων γονιδίων σε δύο διαφορετικά στάδια, γι' αυτό το λόγο υπολογίζονται δυο pfr για την κατάταξη κάθε γονιδίου στα άνω- ή κάτω ρυθμισμένα γονίδια. Η συνάρτηση RPadvance χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου τα δείγματα που ελέγχονται έχουν διαφορετικές προελεύσεις (διαφορετικά εργαστήρια, διαφορετικές συνθήκες πειράματος).

Τα αποτελέσματα όπως παράχθηκαν από την συνάρτηση RPadvance παρουσιάζονται παρακάτω στους πίνακες 6-10:

	class1 < class2	class1 > class 2
244901_at	1.1315068	1.046186
244902_at	1.1514074	1.046474
244903_at	1.2023585	1.028143
244904_at	1.1455596	1.089375
244905_at	1.0909831	1.029432
244906_at	0.8980702	1.058403

Πίνακας 6. Οι τιμές των pfrs για 6 γονίδια μεταξύ των δύο ομάδων.

	class1 < class2	class1 > class 2
244901_at	230.7605	177.5393
244902_at	221.8292	247.0897
244903_at	145.5476	182.6056
244904_at	224.8413	150.9007
244905_at	261.0395	191.0797
244906_at	105.1817	349.2341

Πίνακας 7. Οι τιμές των RPs για 6 γονίδια μεταξύ των δύο ομάδων.

	log/unlog(class1/class2)
244901_at	0.060713984
244902_at	-0.005148036
244903_at	-0.008684345
244904_at	0.128771916
244905_at	0.030076779
244906_at	-0.217625131

Πίνακας 8. Οι τιμές των μέσων αλλαγών πτύχωσης (AveFC) μεταξύ των δύο ομάδων, ομάδα 1/ομάδα 2 για 6 γονίδια.

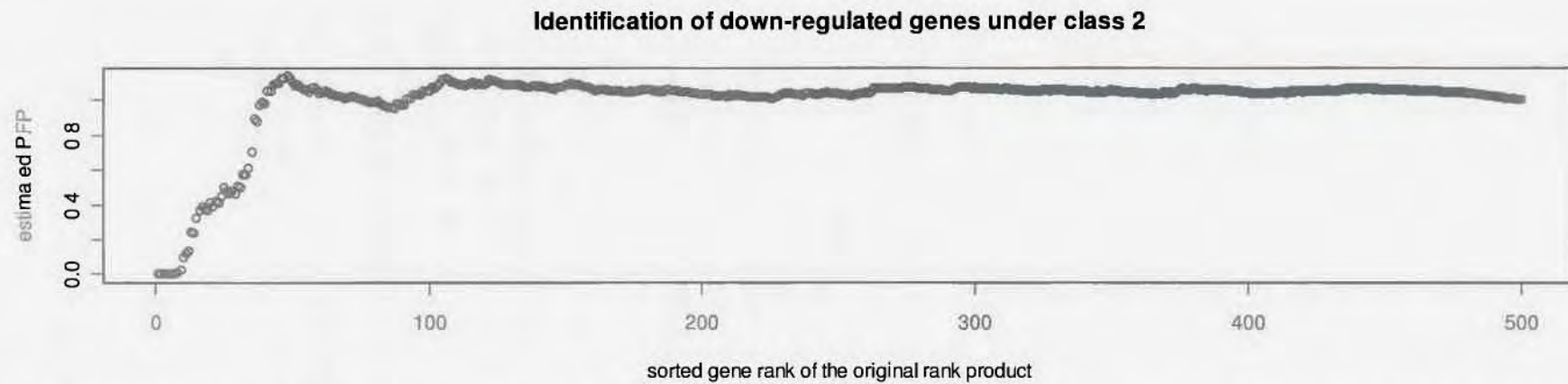
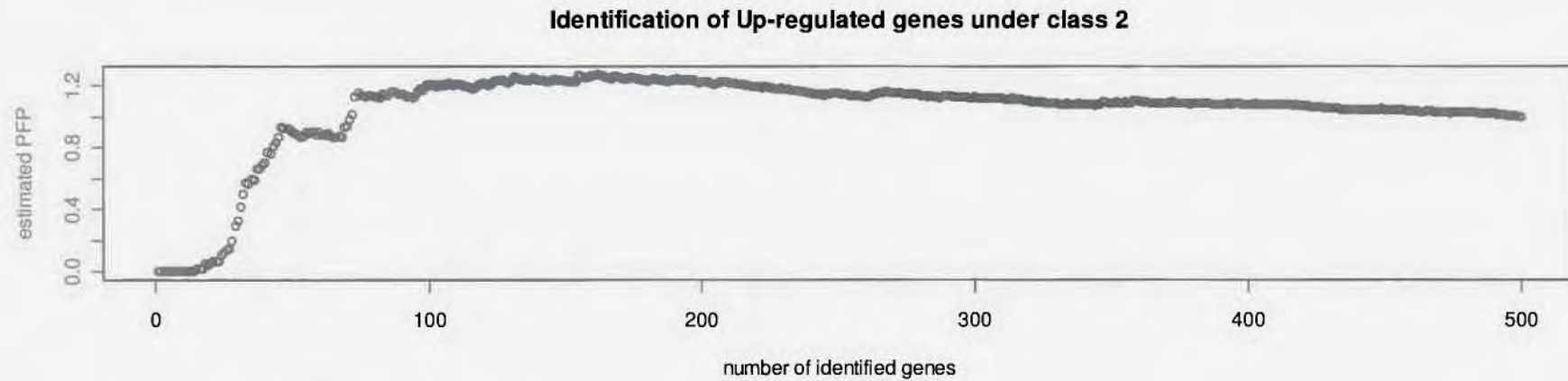
gene.index	RP/Rsum	FC:(class1/class2)	pfp	P.value
245244_at	344	2.7294	0.4968	0.0000
245336_at	436	3.2074	0.4860	0.0000
245176_at	276	5.6927	0.5630	0.0000
245304_at	404	8.8101	0.6286	0.0025
245119_at	219	9.8802	0.6609	0.0020
245262_at	362	11.4271	0.6292	0.0017
245334_at	434	12.1428	0.6085	0.0014
245329_at	429	13.4650	0.5018	0.0012
245196_at	296	13.4654	0.6775	0.0011
245265_at	365	14.4831	0.5769	0.0010
245112_at	212	19.0554	0.7120	0.0036
245141_at	241	20.3836	0.7203	0.0033
245193_at	293	21.4141	0.6884	0.0038
245254_at	354	22.4680	0.7845	0.0050
245383_at	483	28.4194	0.7652	0.0200
245041_at	141	30.0467	0.7600	0.0219
245052_at	152	30.2526	0.7524	0.0218
245234_at	334	35.1914	0.8034	0.0478
245186_at	286	35.2997	0.8000	0.0458

Πίνακας 9. Τα γονίδια που βρέθηκαν να είναι άνω-ρυθμισμένα στην ομάδα των ασθενών.

gene.index	RP/Rsum	FC:(class1/class2)	pfp	P.value
245362_at	462	1.1478	2.5072	0.0000
245136_at	236	5.1312	1.5983	0.0000
245296_at	396	6.3553	1.6545	0.0000
245276_at	376	7.9660	1.5816	0.0000
245277_at	377	8.9784	1.4797	0.0000
245229_at	329	13.5493	1.3906	0.0017
245075_at	175	13.7878	1.3910	0.0014
245319_at	419	22.0153	1.4210	0.0112
245307_at	407	27.0970	1.4001	0.0244

Πίνακας 10. Τα γονίδια που βρέθηκαν ότι είναι κάτω-ρυθμισμένα στην ομάδα των ασθενών.

Στην παρακάτω εικόνα (εικόνα 16) παρουσιάζονται γραφήματα στα οποία γίνεται σύγκριση των ποσοστών λανθασμένης εύρεσης με την τάξη του κάθε γονιδίου, για τα γονίδια που βρέθηκαν άνω- και κάτω-ρυθμισμένα στην ομάδα των ασθενών.



Εικόνα 16. Γραφήματα στα οποία γίνεται σύγκριση των ποσοστών λανθασμένης εύρεσης (pfp) με την τάξη του κάθε γονιδίου, για τα γονίδια που βρέθηκαν άνω- και κάτω-ρυθμισμένα (up-regulated, down-regulated) στην ομάδα των ασθενών.

Τα αποτελέσματα όλων των γονιδίων καθώς και η λίστα με τις τάξεις των γονιδίων όπως προκύπτουν από την ανάλυση των δεδομένων από το RankProd παρουσιάζονται στο παράρτημα 2.

3.3 Εφαρμογή δεδομένων στο METRADIC και παρουσίαση των αποτελεσμάτων

Για την παρουσίαση του προγράμματος METRADIC για την μετα-ανάλυση ερευνών που έχουν δεδομένα μικροσυστοιχιών χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από 7 μελέτες [121-127], τα οποία βρέθηκαν στην δημόσια βάση δεδομένων ONCOMINE [90]. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα στοιχεία των μελετών καθώς και πληροφορίες για τα δεδομένα που παρείχαν (πίνακας 11). Τα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν ως είσοδο στο πρόγραμμα METRADISC όπου υπολογίστηκαν οι τιμές των δύο μεταβλητών, της μέσης τιμής τάξεων (\mathcal{R}^*) και της ετερογένειας (\mathcal{Q}^*) για κάθε μεταβλητή μέσα στις μελέτες, ο υπολογισμός αυτών βασίζεται στις κανονικοποιημένες τάξεις των γονιδίων.

Πίνακας 11.

	Μελέτη	Ασθενείς	Μάρτυρες	Πλήθος γονιδίων
1	Dhanasekaran	59	22	6414
2	Lapointe	62	41	9756
3	Luo	16	9	5026
4	Ramaswamy	190	90	8958
5	Singh	52	50	6824
6	Welsh	25	9	7107
7	Yu	64	23	7763

Πίνακας 11. Μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν στη μετα-ανάλυση και πληροφορίες για τα δεδομένα που παρείχαν.

3.3.1 Εισαγωγή δεδομένων στο METRADISC και παρουσίαση αποτελεσμάτων

Το πρόγραμμα δέχεται ως είσοδο ένα πίνακα ο οποίος περιέχει τις αρχικές τάξεις του κάθε γονιδίου για κάθε μελέτη που λαμβάνει μέρος στην μετα-ανάλυση, στην περίπτωση που εξετάζουμε για τις 7 μελέτες που προαναφέρθηκαν. Τα δεδομένα πρέπει να είναι κανονικοποιημένα και σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν πολλαπλές εμφανίσεις ενός γονιδίου σε μια μελέτη, χρησιμοποιείται μόνο μια τιμή αυτού επιλέγοντας την τιμή εκείνη για την οποία λαμβάνει την μικρότερη τιμή p -value.

Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 12) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που ανακτήθηκαν από την ανάλυση των δεδομένων με το METRADISC των 10 γονιδίων με τις υψηλότερες τάξεις καθώς και οι τιμές των (R^*) και (Q^*) που έλαβε το κάθε γονίδιο.

gene id	gene	Adjusted rank study1	Adjusted rank study2	Adjusted rank study3	Adjusted rank study4	Adjusted rank study5	Adjusted rank study6	Adjusted rank study7	right-sided P-value for R*	left-sided P-value for R*	right-sided P-value for Q	left-sided P-value for Q
1	A13CDNA73	7211,3	11128,8	-99	371,6	4494,7	2164,8	738,3	0,93523513	0,06476491	0,36480879	0,63519121
2	A15E1.2	-99	8366,4	10483,5	-99	-99	6553	9719,6	0,16059577	0,83940423	0,92946154	0,07053846
3	A182_FIP	12451,5	9284,4	-99	-99	3654,4	-99	13140,4	0,07613919	0,92386081	0,34433559	0,65566441
4	A2_PDE	8445,7	9618,5	7088,5	5944,5	1941,4	10893	7952	0,3408752	0,65912494	0,86397407	0,13602593
5	A2BP1	-99	3830	-99	-99	-99	-99	12186,1	0,33663425	0,66337129	0,148049	0,85195743
6	A2M	12150,9	3512,6	-99	-99	341,8	-99	263,8	0,91473742	0,0852626	0,05679266	0,94320772
7	A3.8_1	-99	-99	7400,9	4552,5	-99	8016,3	3695,2	0,66622926	0,33377092	0,87880045	0,12119955
8	A37135	-99	-99	-99	-99	-99	-99	10971,8	0,19330145	0,80893207	1	1
9	A384D8_2	-99	3532,1	-99	-99	-99	-99	-99	0,74011709	0,26050387	1	1
10	A38961	12150,9	11876,2	10208,9	8706,5	3468	4418,8	12681,8	0,06268606	0,9373142	0,55931616	0,44068384

Πίνακας 12. Τα αποτελέσματα των 10 γονιδίων που κατέλαβαν τις υψηλότερες τάξεις μετά την ανάλυση των δεδομένων από το METRADISC.

3.3 Συζήτηση

Η μετα-ανάλυση αποτελεί μια εύρεως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για την αύξηση της δύναμης της στατιστικής ανάλυσης σε αποτελέσματα πειραμάτα με βιολογικά δεδομένα. Συνεχώς παρουσιάζονται καινούριες μέθοδοι εφαρμογής οι οποίοι βελτιώνουν κατά πολύ την στατιστική ισχύ των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από διάφορες έρευνες. Αυτό αφού μπορούν και συνδυάζουν τα αποτελέσματα μελετών που ασχολήθηκαν με το ίδιο ερώτημα, εξάγοντας αποτελέσματα που δεν επηρεάζονται από τυχόν λάθη τα οποία θα σε κάθε μελέτη ξεχωριστά θα μπορούσαν να μειώσουν κατά πολύ την στατιστική ισχύ των αποτελεσμάτων τους.

Οι μικροσυστοιχίες αντιστοιχούν σε μια σημαντική μεθοδολογική πρόοδο αποδεικνύοντας ότι η εύρεση νέων τεχνολογιών παρέχει ισχυρά εργαλεία στον επιστημονικό κόσμο. Η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών χρησιμοποιείται για την κατανόηση των θεμελιωδών πτυχών της ανάπτυξης και της εξέλιξης καθώς επίσης και για την έρευνα των διαφόρων γενετικών αιτιών πολλών ανθρώπινων ασθενειών. Με τη μέθοδο αυτή οι επιστήμονες είναι πλέον ικανοί να μελετήσουν χιλιάδες γονίδια σε ένα πείραμα, ερευνώντας το επίπεδο της διαφορετικής έκφρασης αυτών μέσω δειγμάτων mRNA που λαμβάνουν είτε από ιστολογικά δείγματα είτε από δημόσιες βάσεις δεδομένων. Δεν ήταν περίεργο που οι δύο μεθοδολογίες αυτές, οι οποίες αύξησαν η καθε μία με διαφορετικό τρόπο την υπολογιστική ισχύ των ερευνών, άρχισαν να χρησιμοποιούνται μαζί. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια ραγδαία αύξηση στην ύπαρξη μετα-αναλύσεων που αφορούν πειράματα μικροσυστοιχιών.

Εμφανίζονται συνεχώς νέες μεθοδολογίες μετα-ανάλυσης που εξειδικεύονται στα δεδομένα μικροσυστοιχιών, όπως το METRADISC που παρουσιάστηκε στην παρούσα εργασία, ενώ υπάρχουσες πλατφόρμες λογισμικού που ασχολούνται με τη μετα-ανάλυση έχουν αρχίσει να δημιουργούν πακέτα εφαρμογών με την ίδια εξειδίκευση, όπως η εφαρμογή RankProd που παρουσιάστηκε, άλλες πλατφόρμες που δημιουργούν παρόμοιες εφαρμογές είναι η Matlab και το STATA. Έχει παρατηρηθεί και η συνεχής αύξηση ύπαρξης τέτοιου είδους εφαρμογών σε ιστοσελίδες, όπου μπορούν οι χρήστες να διεξάγουν απευθείας μετα-ανάλυση ενώ είναι συνδεδεμένοι στο διαδίκτυο μέσω αντίστοιχων εφαρμογών ιστοσελίδας, μια τέτοια εφαρμογή υπάρχει στην ιστοσελίδα της δημόσιας βάσης δεδομένων ONCOMINE όπου μπορεί κανείς να κάνει επιλογή των δεδομένων που χρειάζεται και να κάνει απευθείας μετα-ανάλυση στην ιστοσελίδα εξάγοντας τα απαραίτητα στατιστικά δεδομένα καθώς και διάφορες οπτικοποιήσεις αυτών, όπως γραφήματα και χάρτες έκφρασης των γονιδίων.

Στην ίδια κατεύθυνση θα πορευτεί σε λίγο καιρό και η εφαρμογή RanProd καθώς οι δημιουργοί του πακέτου πρόκειται να δημιουργήσουν μια έκδοση της εφαρμογής η οποία θα λειτουργεί σαν εφαρμογή ιστοσελίδας, δίνοντας την δυνατότητα σε χρήστες που δεν είναι εξοικιωμένοι με την χρήση της πλατφόρμας R να χρησιμοποιήσουν την εφαρμογή για την ανάλυση των δεδομένων τους, η

εφαρμογή αυτή θα είναι διαθέσιμη στην εξής διεύθυνση διαδικτύου <http://cactus.salk.edu/RankProd>.

Με την πάροδο του χρόνου αναμένεται η ανακάλυψη καινούριων μεθοδολογιών για την αύξηση υπολογιστικής ικανότητας των πειραμάτων, και οι μικροσυστοιχίες θα κατέχουν μεγάλο μερίδιο των μεθοδολογιών αυτών καθώς οι κατασκευαστές των μικροσυστοιχιών ανεβάζουν συνεχώς τον πήχη, αυξάνοντας συνέχεια την χωρητικότητα των τσιπ που παράγουν, έτσι με την πάροδο του χρόνου οι επιστήμονες θα μπορούν να εξετάζουν μεγαλύτερο πλήθος γονιδίων σε κάθε πείραμα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

	PMID	Author	Year	Country	Number of studies	Number of cases (total)	Number of controls (total)	Cases/ Controls	Number of cases (minimum)	Number of cases (maximum)	Number of controls (minimum)	number of controls (maximum)	Number of genes involved (total)	Number of genes involved (statistically important)	Minimum number of genes involved	Maximum number of genes involved	Disease
1	16397236	Aggarwal, A.	2006	USA	4,00	251,00	92,00	2,73	22,00	104,00	3,00	59,00	2252,00	344,00	135,00	746,00	Gastric Cancer
2	16129847	Agnelli, L.	2005	USA	2,00	124,00	35,00	3,54	50,00	74,00	4,00	31,00	9,00	6,00	1,00	3,00	Multiple Myeloma
3	18605998	Chen, X.	2008	UK	4,00	42,00	5,00	8,40	5,00	21,00	0,00	5,00	2540,00	23,00	116,00	1182,00	Nasopharyngeal Carcinoma
4	17900369	Choi, H.	2007	UK	3,00	24,00	119,00	0,20	6,00	9,00	23,00	69,00	6911,00	52,00	835,00	3436,00	Metastatic Cancer
5	18616827	Borozan, I.	2008	UK	3,00	58,00	38,00	1,53	5,00	40,00	5,00	20,00	451,00	210,00	14,00	159,00	Hepatitis C
6	15135059	Choi, J. K.	2004	Netherlands	9,00	80,00	53,00	1,51	12,00	29,00	5,00	23,00	540,00	215,00	62,00	188,00	Hepatocellular carcinoma (HCC)
7	15231529	Wang, J.	2004	UK	3,00	49,00	32,00	1,53	6,00	33,00	6,00	20,00	2170,00	774,00	66,00	389,00	B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)
8	15598354	Shen, R.	2004	UK	4,00	149,00	156,00	0,96	34,00	45,00	23,00	53,00	300,00	90,00	10,00	140,00	Breast Cancer
9	16624241	Severgnini, M.	2006	USA	2,00	4,00	4,00	1,00	2,00	2,00	2,00	2,00	147,00	9,00	42,00	105,00	Breast Cancer
10	17019712	Schneider, J.	2006	USA	4,00	187,00	156,00	1,20	23,00	70,00	23,00	46,00	29,00	10,00	5,00	9,00	Breast Cancer
11	16872493	Saviozzi, S.	2006	UK	5,00	65,00	17,00	3,82	6,00	21,00	0,00	15,00	12,00	5,00	15,00	15,00	Non-small Cell Lung Cancer
12	12154050	Rhodes, D. R.	2002	USA	4,00	85,00	41,00	2,07	11,00	34,00	4,00	19,00	21736,00	153,00	2780,00	8352,00	Prostate Cancer
13	18767902	Ramasamy, A.	2008	USA	21,00	973,00	419,00	2,32	8,00	139,00	7,00	75,00	28365,00	168,00	5096,00	22150,00	Multi-Cancer
14	16705015	Park, T.	2006	UK	4,00	80,00	53,00	1,51	12,00	29,00	5,00	23,00	8227,00	21,00	3,00	114,00	Hepatocellular Carcinoma
15	19118496	Ma, S.	2009	UK	4,00	35,00	22,00	1,59	8,00	10,00	3,00	8,00	46457,00	15,00	5521,00	29621,00	Pancreatic Cancer

16	1911849 6	Ma, S.	2009	UK	4,00	76,00	49,00	1,55	10,00	29,00	5,00	23,00	20320,00	34,00	3122,00	9984,00	Liver Cancer
17	1830276 4	Kong, X.	2008	UK	2,00	26,00	10,00	2,60	10,00	16,00	4,00	6,00	2216,00	309,00	26,00	2190,00	Cronic Allograft Nephropathy (CAN)
18	1911603 3	Gur- Dedeoglu, B.	2008	UK	3,00	57,00	32,00	1,78	7,00	40,00	7,00	15,00	545,00	9,00	106,00	241,00	Breast Cancer
19	1746302 3	Fishel, I.	2007	UK	3,00	266,00	32,00	8,31	41,00	139,00	5,00	17,00	4579,00	50,00	411,00	547,00	Lung Cancer
20	1288405 7	Ghosh, D.	2003	Germany	4,00	85,00	41,00	2,07	11,00	34,00	4,00	19,00	26646,00	25,00	3350,00	9984,00	Prostate Cancer
21	1798894 9	Zintzaras, E.	2008	UK	7,00	468,00	244,00	1,92	16,00	190,00	9,00	90,00	51848,00	60,00	5026,00	9756,00	Prostate Cancer

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

\$pfp

	class1 < class2	class1 > class 2
244901_at	1.131506849	1.046185567
244902_at	1.151407407	1.046473988
244903_at	1.202358491	1.028142857
244904_at	1.145559567	1.089375000
244905_at	1.090983146	1.029432314
244906_at	0.898070175	1.058402626
244907_at	1.122491803	1.091307190
244908_at	1.081416185	1.029920949
244909_at	1.153616236	1.016909091
244910_s_at	1.036334056	1.050645161
244911_at	1.188378378	1.060835509
244912_at	1.170042735	1.014857143
244913_at	1.140133333	1.048070175
244914_at	1.096657061	1.018766520
244915_s_at	1.092832861	1.035151515
244916_at	1.093518519	1.040881226
244917_at	1.209363636	1.051824645
244918_at	1.093682796	1.037038627
244919_at	1.097391304	1.052011494
244920_s_at	1.252121212	1.050824742
244921_s_at	0.934565217	1.035302198
244922_s_at	1.159534884	1.064885321
244923_s_at	1.225230769	1.052360248
244924_at	1.224832536	1.033205128
244925_at	1.148484848	1.023526570
244926_s_at	0.915306122	1.066862302
244927_at	1.234693878	1.075439189
244928_s_at	1.239682540	1.050928962
244929_at	1.151560000	1.057818182
244930_at	0.325333333	1.049851064
244931_at	1.084142480	1.019495413
244932_at	1.186026201	1.036736402
244933_at	1.237874016	1.044034582
244934_at	1.079351621	1.077905405
244935_at	1.210279070	1.042231183
244936_at	1.230250000	1.069117647
244937_at	1.154264706	1.095192308
244938_at	1.150415094	0.957325581
244939_at	1.236789474	0.573750000
244940_at	1.219563107	1.047213115
244941_at	0.942428571	1.051081081
244942_at	1.075803357	1.084955752
244943_at	0.926250000	1.056168831
244944_s_at	1.183913043	0.972444444
244945_at	0.878888889	1.047770701
244946_at	1.088079268	1.074429530
244947_at	1.134177215	1.037047146

244948_at	1.127832168	1.085933333
244949_at	1.272839506	1.072266667
244950_at	1.133846154	1.052748268
244951_s_at	0.901600000	1.041845387
244952_at	1.122757475	1.067034221
244953_s_at	1.093846154	1.066902985
244954_s_at	1.091920904	1.032250000
244955_at	1.200400000	1.064295455
244956_s_at	1.122730263	1.043937824
244957_at	1.232319588	1.040000000
244958_at	1.262256098	1.052698413
244959_s_at	1.162298851	1.001052632
244960_at	1.117978723	1.054697674
244961_at	1.126628352	1.056467532
244962_at	1.234611399	1.041950000
244963_at	1.149454545	1.046467391
244964_at	1.221162791	1.057393617
244965_at	1.234228188	1.050113314
244966_at	1.233846154	1.025467290
244967_at	1.236719577	1.050934579
244968_at	1.241092896	1.015714286
244969_at	0.868235294	1.059936508
244970_at	1.078221574	0.981463415
244971_at	1.179913420	1.049672544
244972_at	1.205601852	1.034328358
244973_at	1.127634409	1.051344828
244974_at	1.267484663	1.066289474
244975_at	1.260238095	1.060509554
244976_at	1.182652174	1.044695864
244977_at	1.239884393	1.059510490
244978_at	1.146639676	1.012027027
244979_at	1.113354430	0.957058824
244980_at	1.220568720	1.049820359
244981_at	1.203714286	1.047257143
244982_at	1.149634146	1.091315789
244983_at	1.110252366	1.129361702
244984_at	1.165889831	1.054674556
244985_at	1.198348624	1.006630435
244986_at	1.086121212	1.085149254
244987_s_at	1.083307494	1.052329545
244988_s_at	1.113525641	1.041330645
244989_s_at	1.083647059	0.892500000
244990_s_at	1.192807018	0.464827586
244991_s_at	1.181206897	1.075944056
244992_s_at	1.136031128	1.041739130
244993_s_at	1.177280702	1.070148699
244994_at	1.201764706	1.011911111
244995_at	1.255939394	1.035474138
244996_at	1.218522167	1.030742574
244997_at	1.242328767	1.058209877
244998_at	1.222663317	1.042902299

244999_at	1.237635135	1.081568627
245000_at	1.235517241	1.063115183
245001_at	1.136156863	1.062652520
245002_at	1.235760000	1.016849315
245003_at	1.203076923	1.026413502
245004_at	1.220666667	1.041961538
245005_at	1.269125000	1.051947368
245006_at	1.131756757	1.045014085
245007_at	1.091100917	1.019631336
245008_at	1.155230126	0.705428571
245009_at	1.152014652	1.058440367
245010_at	1.194748858	0.964404762
245011_at	1.228263889	1.086030534
245012_at	1.233494624	1.052228916
245013_at	1.081315789	1.065296053
245014_at	1.092514286	1.057363636
245015_at	0.897241379	1.055900000
245016_at	1.223961039	1.062699387
245017_at	1.228737374	1.035024631
245018_at	1.135292096	1.101206897
245019_at	1.132897527	1.043948718
245020_at	1.087880435	1.053928571
245021_at	1.227500000	1.057457627
245022_at	1.153648649	1.031872510
245023_at	1.229627660	1.044418605
245024_at	1.229650350	1.056149068
245025_at	1.126712329	1.117213115
245026_at	1.079826087	1.030338983
245027_at	1.238857143	1.060132275
245028_at	1.132065217	1.063446712
245029_at	0.151481481	1.041333333
245030_at	1.148284672	1.057200000
245031_at	0.867555556	1.045868644
245032_at	1.125317726	1.036125000
245033_at	1.193883495	1.057831858
245034_at	0.832045455	1.059590793
245035_at	1.247660819	1.053105882
245036_at	1.092082192	1.070833333
245037_at	1.226776316	1.050378251
245038_at	0.871363636	1.013424658
245039_at	0.666216216	1.051736111
245040_at	1.147191011	1.039613527
245041_at	0.021875000	1.018289206
245042_at	1.036580645	1.025223881
245043_at	1.127946128	1.077745455
245044_at	1.150902256	1.059537275
245045_at	1.212757009	1.059216867
245046_at	1.033113006	1.039833333
245047_at	1.229375000	1.099826087
245048_at	1.252823529	1.053665893
245049_at	0.883870968	1.064464692

245050_at	1.243488372	1.075054152
245051_at	1.031295117	0.386470588
245052_at	0.021764706	1.032789256
245053_at	1.119061489	1.020192308
245054_at	1.243920455	1.035191257
245055_at	1.077572115	1.007419355
245056_at	1.245755396	1.065338346
245057_at	1.087055703	1.032307692
245058_at	1.121400651	1.013183857
245059_at	0.668157895	1.052430108
245060_at	1.195132743	1.044561404
245061_at	1.086017964	1.044887640
245062_at	1.078410758	1.093636364
245063_at	1.256603774	1.089242424
245064_at	1.074844869	1.019090909
245065_at	1.140195312	1.061321244
245066_at	1.086360947	1.071912752
245067_at	1.091923077	1.035160000
245068_at	1.085521628	1.017747748
245069_at	1.059440559	1.048187135
245070_at	1.083353474	1.039877551
245071_at	1.150483871	1.031825397
245072_s_at	1.136028369	1.058761329
245073_at	1.107484277	1.040983607
245074_at	1.094741379	1.033151751
245075_at	1.008064516	0.001428571
245076_at	1.031461378	0.135833333
245077_at	1.089659686	1.033734440
245078_at	0.503125000	1.064719101
245079_at	1.026425620	0.503666667
245080_at	1.091988796	1.068827586
245081_at	1.118757962	1.108709677
245082_at	0.105416667	1.063914989
245083_at	1.200184332	1.061096774
245084_at	1.126500000	1.060132450
245085_at	1.065990566	1.073138686
245086_at	1.079334975	1.092564103
245087_at	1.246047904	1.047903614
245088_at	1.029048626	1.095681818
245089_at	1.133893130	1.078248175
245090_at	1.021758691	0.324666667
245091_at	1.069123223	1.073987342
245092_at	1.083793970	1.062887701
245093_at	1.050294118	0.990500000
245094_at	1.015995935	0.116363636
245095_at	1.170382979	1.039489796
245096_at	1.102011173	1.011858407
245097_at	1.264451613	1.041581769
245098_at	1.032887029	0.449166667
245099_at	1.080510204	1.025972222
245100_at	1.049817352	1.107222222

245101_at	1.085743073	1.029458128
245102_at	1.147171315	1.045614973
245103_at	1.144578313	1.066666667
245104_at	1.126266667	1.055059880
245105_at	1.244745763	1.062204473
245106_at	1.256508876	1.037845304
245107_at	1.131543860	1.065146580
245108_at	1.079289216	1.016197183
245109_at	1.025637860	0.421818182
245110_at	1.206435644	1.064199475
245111_at	1.227700535	1.063643411
245112_at	0.003636364	1.010101010
245113_at	1.227860697	1.034164384
245114_at	0.888196721	1.056659436
245115_at	1.048722467	1.091954887
245116_at	1.116031746	1.025260664
245117_at	1.089791667	0.971538462
245118_at	1.094179567	1.040736434
245119_at	0.002000000	1.024426230
245120_at	1.058000000	1.073455882
245121_at	1.084972973	1.072949640
245122_at	1.089786667	1.039492386
245123_at	1.051488889	1.101800000
245124_at	1.097375691	1.037689076
245125_at	1.121038961	1.064775641
245126_at	1.081162228	1.097142857
245127_at	1.117419355	1.083237410
245128_at	1.080535714	1.068708487
245129_at	1.259541985	1.056689977
245130_at	1.179484536	1.058932292
245131_s_at	1.124785479	1.052172619
245132_at	1.128067797	1.058639241
245133_at	1.088989362	1.062397260
245134_s_at	1.048227273	1.028854167
245135_at	1.084226804	1.056666667
245136_at	1.004016064	0.000000000
245137_at	1.056542923	0.973684211
245138_at	1.249177215	1.053240506
245139_at	1.053118040	0.876756757
245140_at	1.232067039	1.047160804
245141_at	0.003333333	1.012145749
245142_at	1.092576687	1.030493827
245143_at	0.066818182	1.030680412
245144_at	1.124982578	1.053425926
245145_at	1.213725490	1.043459459
245146_at	1.157840909	1.059621381
245147_at	1.123410596	1.087058824
245148_at	1.142747253	1.054871795
245149_at	1.076842105	1.086964286
245150_at	1.049237668	1.072075472
245151_at	1.080783133	1.122653061

245152_at	1.141224490	1.063922830
245153_at	1.214829268	1.053982808
245154_at	1.217000000	1.052786885
245155_at	1.042445415	0.998800000
245156_at	1.238820225	1.037878788
245157_at	1.231878173	1.039303483
245158_at	1.204403670	1.043786408
245159_at	1.207477477	1.049976415
245160_at	1.118414634	1.050617577
245161_at	1.226388889	1.050052356
245162_at	1.016111111	1.054948097
245163_at	0.936521739	1.055478261
245164_at	1.082228739	1.032148760
245165_at	1.082955224	1.101743119
245166_at	1.103676880	1.124150943
245167_s_at	0.201428571	1.050383795
245168_at	1.087804878	1.062070175
245169_at	1.083000000	1.075785714
245170_at	0.903818182	1.051901408
245171_at	1.251594203	1.036274510
245172_at	1.253949045	1.052759644
245173_at	1.204016393	1.037054455
245174_at	1.208677686	1.032663043
245175_at	1.140393701	1.057357357
245176_at	0.000000000	1.004016064
245177_at	1.078578313	1.112845528
245178_at	1.038456522	1.016617647
245179_at	1.162471910	1.057841945
245180_at	1.054837963	1.077481481
245181_at	0.296551724	1.060646154
245182_at	0.896428571	1.065904977
245183_at	1.051489842	0.982250000
245184_at	1.142043011	1.052167183
245185_at	1.265279503	1.075152542
245186_at	0.045789474	1.043256785
245187_s_at	1.088867925	1.052040816
245188_at	1.046513158	0.408000000
245189_at	1.088136483	1.025450980
245190_at	1.037510823	1.025909091
245191_at	1.139078947	1.048404762
245192_at	1.132935154	1.042235772
245193_at	0.003846154	1.028580247
245194_at	1.044223195	1.028736842
245195_at	1.126354167	1.063066667
245196_at	0.001111111	1.016219512
245197_at	1.167448980	1.052312500
245198_at	1.129500000	1.041388889
245199_at	0.052500000	1.037033195
245200_at	1.227200000	1.037349398
245201_at	1.049191011	0.983522727
245202_at	1.046689342	0.478846154

245203_at	1.059649533	1.100320000
245204_at	1.225217391	1.059721254
245205_at	1.201779661	1.045392954
245206_at	1.034081197	1.033505155
245207_at	1.137508651	1.070428571
245208_at	1.047389381	0.978314607
245209_at	1.147738095	1.046618076
245210_at	1.081432225	1.020613208
245211_at	0.888823529	1.048607595
245212_at	1.217102804	1.064522968
245213_at	1.146049383	1.043682927
245214_at	1.143269962	1.080776699
245215_at	1.079536585	1.077042254
245216_at	1.085544041	1.024411765
245217_at	1.032297872	1.091860465
245218_s_at	1.185221239	1.067045455
245219_at	1.089300912	1.044312977
245220_at	1.050405405	1.029361702
245221_s_at	1.081777778	1.091531532
245222_at	1.235620438	1.051892523
245223_at	1.084086294	1.078652482
245224_at	1.260512821	1.049254808
245225_at	1.134418605	1.066641509
245226_at	1.155943775	1.065354610
245227_s_at	1.080150150	1.069705882
245228_at	1.237676056	1.045014006
245229_at	1.010101010	0.001666667
245230_at	0.768780488	1.054492441
245231_at	1.077694175	0.972168675
245232_at	1.136000000	1.060133333
245233_at	1.126103896	1.056908517
245234_at	0.047777778	1.050685225
245235_at	1.066855792	1.049717514
245236_at	0.890317460	1.059889868
245237_at	1.089914530	1.072758621
245238_at	1.053418014	1.087290323
245239_at	1.081941032	1.076178344
245240_at	1.205535714	1.065714286
245241_at	1.100591900	1.055974843
245242_at	1.027598344	0.499354839
245243_at	0.871538462	1.056470588
245244_at	0.000000000	1.002004008
245245_at	1.083032581	1.116542056
245246_at	1.197264574	1.055701220
245247_at	1.024494845	0.371666667
245248_at	0.984788732	1.057804878
245249_at	1.040675381	0.461481481
245250_at	1.088815789	1.057022472
245251_at	1.145000000	1.055431472
245252_at	1.106269592	1.100000000
245253_at	1.205757576	1.062744063

245254_at	0.005000000	1.049465812
245255_at	1.046791209	1.029531250
245256_at	1.079562044	0.413043478
245257_at	0.064347826	1.044937238
245258_at	0.586666667	1.037335907
245259_at	1.034736842	0.388571429
245260_at	1.147593361	1.050645161
245261_at	1.145206612	1.091523179
245262_at	0.001666667	1.006036217
245263_at	1.243731343	1.047386091
245264_at	0.685897436	1.051824034
245265_at	0.001000000	1.048668076
245266_at	0.571818182	1.047410526
245267_at	1.115015974	1.025116279
245268_at	1.145778689	1.068295455
245269_at	0.881923077	1.051889952
245270_at	0.925531915	1.061562500
245271_at	1.218018868	1.068862876
245272_at	1.134655172	1.042063492
245273_at	1.214471545	1.057287356
245274_at	0.126000000	1.039168399
245275_at	1.124765101	0.990512821
245276_at	1.006036217	0.000000000
245277_at	1.012085020	0.000000000
245278_at	1.050389016	1.088846154
245279_at	1.229477124	1.061211340
245280_at	0.869056604	1.058755459
245281_at	1.014056795	0.095000000
245282_at	1.215117371	1.056055980
245283_at	1.083805970	1.090551181
245284_at	1.103093750	1.069271523
245285_s_at	1.035867238	1.006086957
245286_at	1.137366548	1.051863905
245287_at	1.092245431	1.055164835
245288_at	1.224158416	1.069933555
245289_at	1.237569061	1.038215159
245290_at	1.036223176	1.057962963
245291_at	1.088207071	1.042678571
245292_at	1.185213675	1.062328767
245293_at	0.423225806	1.046100629
245294_at	1.082647815	1.027322835
245295_at	1.175000000	1.077862319
245296_at	1.002004008	0.000000000
245297_at	1.241780105	1.047429379
245298_at	1.142896825	1.043175487
245299_at	1.188444444	1.065345745
245300_at	1.119183007	0.990000000
245301_at	1.237083333	1.050580808
245302_at	1.075203488	1.038947368
245303_at	1.133697183	1.071632653
245304_at	0.002500000	1.022413088

245305_at	0.759523810	1.035012285
245306_at	1.170901288	1.053333333
245307_at	1.023463115	0.024444444
245308_at	1.063356808	1.091083333
245309_at	1.094600551	0.953103448
245310_at	1.239459459	1.068932384
245311_at	1.092607450	1.080705128
245312_at	1.163645833	1.063273543
245313_at	1.139964286	1.057986111
245314_at	0.878437500	1.063363844
245315_at	1.073785714	1.047687861
245316_at	1.034525862	1.096611570
245317_at	1.091310160	1.059834254
245318_at	0.879104478	1.057039474
245319_at	1.017983707	0.011250000
245320_at	1.045739514	1.095423729
245321_at	1.142727273	1.041859838
245322_at	1.237941176	1.065490196
245323_at	1.029791667	1.052682927
245324_at	1.252951807	1.037878788
245325_at	1.030889831	0.573030303
245326_at	1.033193277	1.137083333
245327_at	1.224038462	1.071258503
245328_at	1.024845996	0.238571429
245329_at	0.001250000	1.014198783
245330_at	1.019795918	0.242307692
245331_at	1.158235294	1.053730408
245332_at	1.079082126	1.068050314
245333_at	1.084913151	1.020922330
245334_at	0.001428571	1.008064516
245335_at	1.132355212	1.066163934
245336_at	0.000000000	1.000000000
245337_at	1.141411765	1.035555556
245338_at	1.084454277	0.991111111
245339_at	0.566470588	1.045840336
245340_at	1.234402174	1.042009685
245341_at	0.703000000	1.052801724
245342_at	1.081175000	1.046250000
245343_at	1.027489451	0.475357143
245344_at	1.086216931	1.052647059
245345_at	1.152083333	1.030000000
245346_at	0.064285714	1.026488706
245347_at	1.192098214	1.052686567
245348_at	1.064964706	1.070701754
245349_at	1.238666667	1.061126761
245350_at	1.093672922	1.059817073
245351_at	1.248103448	1.052647059
245352_at	1.030810811	0.370000000
245353_at	1.029253112	0.370000000
245354_at	1.115016077	1.063656958
245355_at	1.100110803	1.029342723

245356_at	1.088233766	1.065056180
245357_at	1.089918033	1.021759259
245358_at	1.049246120	1.072871287
245359_at	1.102805556	1.032595745
245360_at	1.082277228	1.045752688
245361_at	1.180352423	1.068580858
245362_at	1.000000000	0.000000000
245363_at	1.213529412	1.057423469
245364_at	0.882033898	1.058087912
245365_at	1.035637149	0.610588235
245366_at	1.198318182	1.060490798
245367_at	1.193393665	1.015067873
245368_at	1.250400000	1.045116279
245369_at	1.227748344	1.066109215
245370_at	1.162658228	1.072289562
245371_at	1.125555556	1.061461538
245372_at	1.093522727	1.026403509
245373_s_at	1.051635945	1.090000000
245374_at	1.090556962	1.061437500
245375_at	0.902000000	1.055634218
245376_at	1.071472684	0.997012987
245377_at	1.143992806	1.084347826
245378_at	1.080356083	1.023121951
245379_at	1.212037037	1.050119332
245380_at	0.809302326	1.065319635
245381_at	1.237517730	1.069103943
245382_at	1.048792711	1.118380952
245383_at	0.020000000	1.020346939
245384_at	1.049128440	0.983670886
245385_at	1.245274725	1.087461538
245386_at	1.049174107	1.128260870
245387_at	1.061896956	1.049696970
245388_at	1.243609023	1.058940092
245389_at	1.238299320	1.052642045
245390_at	1.146775362	1.049449275
245391_at	1.051080460	1.087751938
245392_at	0.597714286	1.042346369
245393_at	1.131496599	1.058659218
245394_at	1.093774648	1.033476562
245395_at	1.048970917	1.057272727
245396_at	1.154869888	1.068111111
245397_at	1.031907757	0.496400000
245398_at	1.090163488	1.098092105
245399_at	0.143846154	1.034886128
245400_at	1.158582090	1.033651226

\$pval

	class1 < class2	class1 > class 2
244901_at	0.66080	0.40592
244902_at	0.62176	0.72416
244903_at	0.25490	0.43182
244904_at	0.63464	0.27888
244905_at	0.77678	0.47148
244906_at	0.10238	0.96738
244907_at	0.68472	0.33394
244908_at	0.74834	0.52114
244909_at	0.62526	0.44744
244910_s_at	0.95550	0.13028
244911_at	0.52764	0.81260
244912_at	0.54758	0.14208
244913_at	0.17102	0.71688
244914_at	0.76108	0.46252
244915_s_at	0.77154	0.40992
244916_at	0.70860	0.54334
244917_at	0.26606	0.88774
244918_at	0.81370	0.48326
244919_at	0.70672	0.36610
244920_s_at	0.33056	0.61158
244921_s_at	0.08598	0.75370
244922_s_at	0.19944	0.92858
244923_s_at	0.31856	0.67772
244924_at	0.51198	0.48354
244925_at	0.60640	0.42374
244926_s_at	0.08970	0.94524
244927_at	0.48400	0.63666
244928_s_at	0.31240	0.38464
244929_at	0.57578	0.34908
244930_at	0.01952	0.98686
244931_at	0.82178	0.44450
244932_at	0.54320	0.49556
244933_at	0.31442	0.72456
244934_at	0.86564	0.31906
244935_at	0.52042	0.77542
244936_at	0.49210	0.58160
244937_at	0.62792	0.22780
244938_at	0.60972	0.16466
244939_at	0.46998	0.03672
244940_at	0.50246	0.12776
244941_at	0.13194	0.38890
244942_at	0.89722	0.24520
244943_at	0.08892	0.97590
244944_s_at	0.27230	0.17504
244945_at	0.09492	0.98700
244946_at	0.71378	0.32018
244947_at	0.17920	0.83586
244948_at	0.64512	0.32578
244949_at	0.41240	0.64336
244950_at	0.17688	0.91168

244951_s_at	0.09016	0.83556
244952_at	0.67590	0.56126
244953_s_at	0.71100	0.57186
244954_s_at	0.77308	0.41290
244955_at	0.24008	0.93658
244956_s_at	0.68262	0.40296
244957_at	0.47814	0.75088
244958_at	0.41402	0.39792
244959_s_at	0.20224	0.15216
244960_at	0.21018	0.90704
244961_at	0.58810	0.81348
244962_at	0.47656	0.83356
244963_at	0.63220	0.38510
244964_at	0.31506	0.39758
244965_at	0.36780	0.74138
244966_at	0.48120	0.43890
244967_at	0.46748	0.67470
244968_at	0.45424	0.45504
244969_at	0.11808	0.66776
244970_at	0.73966	0.16096
244971_at	0.54512	0.83344
244972_at	0.52082	0.41580
244973_at	0.20974	0.60978
244974_at	0.41320	0.81038
244975_at	0.42344	0.66600
244976_at	0.54402	0.85874
244977_at	0.42900	0.60604
244978_at	0.56644	0.14978
244979_at	0.70364	0.16270
244980_at	0.51508	0.35064
244981_at	0.25278	0.36654
244982_at	0.56562	0.24882
244983_at	0.70390	0.10616
244984_at	0.55030	0.35648
244985_at	0.52248	0.18522
244986_at	0.71684	0.29082
244987_s_at	0.83848	0.37042
244988_s_at	0.69484	0.51650
244989_s_at	0.73688	0.06426
244990_s_at	0.27196	0.02696
244991_s_at	0.27404	0.30772
244992_s_at	0.58392	0.47920
244993_s_at	0.53684	0.57574
244994_at	0.24516	0.45536
244995_at	0.41446	0.48046
244996_at	0.49472	0.41642
244997_at	0.36276	0.34286
244998_at	0.48662	0.72586
244999_at	0.36634	0.11032
245000_at	0.35830	0.81222
245001_at	0.57944	0.80124

245002_at	0.30894	0.44538
245003_at	0.25024	0.48652
245004_at	0.51268	0.54182
245005_at	0.40612	0.39974
245006_at	0.67000	0.74196
245007_at	0.71358	0.44252
245008_at	0.55220	0.04938
245009_at	0.62900	0.69222
245010_at	0.52330	0.16202
245011_at	0.35374	0.28454
245012_at	0.45886	0.34934
245013_at	0.73962	0.64770
245014_at	0.76476	0.69786
245015_at	0.10408	0.21118
245016_at	0.37698	0.34644
245017_at	0.48658	0.84044
245018_at	0.66074	0.25548
245019_at	0.64122	0.40714
245020_at	0.80068	0.35412
245021_at	0.30442	0.12478
245022_at	0.17074	0.51800
245023_at	0.46234	0.35928
245024_at	0.35168	0.34008
245025_at	0.16450	0.27260
245026_at	0.74508	0.48632
245027_at	0.34688	0.80146
245028_at	0.20830	0.93796
245029_at	0.00818	0.99968
245030_at	0.62926	0.74004
245031_at	0.07808	0.98730
245032_at	0.67294	0.49734
245033_at	0.24594	0.95628
245034_at	0.07322	0.82860
245035_at	0.42670	0.89514
245036_at	0.79722	0.30840
245037_at	0.37294	0.88862
245038_at	0.11502	0.14796
245039_at	0.04930	0.90870
245040_at	0.20420	0.86080
245041_at	0.00070	0.99996
245042_at	0.96402	0.13738
245043_at	0.67000	0.59276
245044_at	0.61228	0.82432
245045_at	0.51906	0.70332
245046_at	0.96906	0.12478
245047_at	0.31472	0.25296
245048_at	0.42596	0.90826
245049_at	0.10960	0.93460
245050_at	0.42776	0.59558
245051_at	0.97148	0.01314
245052_at	0.00074	0.99974

245053_at	0.69158	0.42440
245054_at	0.43786	0.75776
245055_at	0.89654	0.18738
245056_at	0.34632	0.56676
245057_at	0.81964	0.13420
245058_at	0.68854	0.45188
245059_at	0.05078	0.97876
245060_at	0.27010	0.83356
245061_at	0.72546	0.74396
245062_at	0.88214	0.24060
245063_at	0.39960	0.28756
245064_at	0.90072	0.42598
245065_at	0.58378	0.81934
245066_at	0.73438	0.63886
245067_at	0.79492	0.51758
245068_at	0.85322	0.45188
245069_at	0.90900	0.35848
245070_at	0.71718	0.50954
245071_at	0.57064	0.52004
245072_s_at	0.64072	0.70090
245073_at	0.70436	0.50800
245074_at	0.76194	0.53104
245075_at	1.00000	0.00002
245076_at	0.98814	0.00326
245077_at	0.83250	0.49826
245078_at	0.03220	0.94760
245079_at	0.99358	0.03022
245080_at	0.77968	0.30996
245081_at	0.70258	0.27496
245082_at	0.00506	0.95114
245083_at	0.52088	0.65788
245084_at	0.18024	0.96048
245085_at	0.90396	0.29404
245086_at	0.87642	0.25566
245087_at	0.41618	0.86976
245088_at	0.97348	0.09642
245089_at	0.59416	0.59088
245090_at	0.99928	0.00974
245091_at	0.90234	0.33938
245092_at	0.86270	0.39752
245093_at	0.92846	0.15848
245094_at	0.99974	0.00256
245095_at	0.55008	0.40748
245096_at	0.78904	0.45736
245097_at	0.39198	0.77702
245098_at	0.98744	0.02156
245099_at	0.84712	0.14774
245100_at	0.91964	0.23916
245101_at	0.86208	0.41796
245102_at	0.57588	0.78212
245103_at	0.19000	0.94720

245104_at	0.67576	0.70478
245105_at	0.44064	0.66494
245106_at	0.42470	0.75140
245107_at	0.64498	0.65400
245108_at	0.88070	0.14430
245109_at	0.99692	0.01856
245110_at	0.24370	0.81092
245111_at	0.45916	0.82326
245112_at	0.00008	1.00000
245113_at	0.49360	0.75494
245114_at	0.10836	0.97424
245115_at	0.95224	0.29046
245116_at	0.70310	0.43266
245117_at	0.83696	0.17682
245118_at	0.70684	0.53702
245119_at	0.00002	0.99984
245120_at	0.90988	0.29198
245121_at	0.80288	0.59656
245122_at	0.81734	0.40956
245123_at	0.94634	0.11018
245124_at	0.79450	0.49394
245125_at	0.69056	0.66442
245126_at	0.89304	0.27648
245127_at	0.69280	0.30114
245128_at	0.72612	0.57924
245129_at	0.33000	0.90664
245130_at	0.22882	0.81326
245131_s_at	0.68162	0.70706
245132_at	0.66556	0.66906
245133_at	0.81892	0.31022
245134_s_at	0.92244	0.19754
245135_at	0.84136	0.38040
245136_at	1.00000	0.00000
245137_at	0.91074	0.07400
245138_at	0.39474	0.83206
245139_at	0.94570	0.06488
245140_at	0.44108	0.83354
245141_at	0.00008	1.00000
245142_at	0.71236	0.50082
245143_at	0.00294	0.99976
245144_at	0.64574	0.68262
245145_at	0.49520	0.77216
245146_at	0.20378	0.95154
245147_at	0.67854	0.25872
245148_at	0.20798	0.74052
245149_at	0.90024	0.24348
245150_at	0.93592	0.11364
245151_at	0.71764	0.11002
245152_at	0.55920	0.66176
245153_at	0.49808	0.73568
245154_at	0.29208	0.89908

245155_at	0.95488	0.14982
245156_at	0.44102	0.75350
245157_at	0.48536	0.83560
245158_at	0.26256	0.86008
245159_at	0.26806	0.89038
245160_at	0.18342	0.88462
245161_at	0.44150	0.40112
245162_at	0.14632	0.60976
245163_at	0.12924	0.97104
245164_at	0.73808	0.49956
245165_at	0.72558	0.24018
245166_at	0.79244	0.23832
245167_s_at	0.01128	0.98526
245168_at	0.80280	0.60538
245169_at	0.84474	0.30122
245170_at	0.09942	0.89622
245171_at	0.34544	0.84560
245172_at	0.39374	0.70956
245173_at	0.29378	0.83794
245174_at	0.29250	0.76004
245175_at	0.57932	0.70420
245176_at	0.00000	1.00000
245177_at	0.89522	0.27376
245178_at	0.95538	0.13826
245179_at	0.62076	0.69606
245180_at	0.91138	0.29092
245181_at	0.01720	0.68942
245182_at	0.10040	0.94226
245183_at	0.93162	0.07858
245184_at	0.63726	0.67970
245185_at	0.40742	0.63434
245186_at	0.00174	0.99944
245187_s_at	0.80794	0.20620
245188_at	0.95442	0.01632
245189_at	0.82916	0.52298
245190_at	0.95866	0.13542
245191_at	0.17314	0.88066
245192_at	0.66390	0.51278
245193_at	0.00010	0.99978
245194_at	0.95442	0.19546
245195_at	0.64878	0.79730
245196_at	0.00002	0.99996
245197_at	0.22882	0.67348
245198_at	0.58734	0.74980
245199_at	0.00210	0.99970
245200_at	0.36816	0.51660
245201_at	0.93378	0.17310
245202_at	0.92318	0.02490
245203_at	0.90706	0.27508
245204_at	0.50724	0.60828
245205_at	0.28362	0.77150

245206_at	0.96790	0.20050
245207_at	0.65748	0.59944
245208_at	0.94684	0.17414
245209_at	0.19282	0.71798
245210_at	0.84568	0.43274
245211_at	0.09066	0.99408
245212_at	0.26046	0.60252
245213_at	0.55698	0.85582
245214_at	0.60136	0.22264
245215_at	0.88522	0.30588
245216_at	0.83804	0.41796
245217_at	0.97036	0.09390
245218_s_at	0.53572	0.65730
245219_at	0.71676	0.54722
245220_at	0.93276	0.19352
245221_s_at	0.87624	0.24232
245222_at	0.33856	0.90042
245223_at	0.85426	0.30418
245224_at	0.39328	0.87298
245225_at	0.58536	0.56532
245226_at	0.57566	0.60086
245227_s_at	0.71938	0.21822
245228_at	0.35150	0.74614
245229_at	1.00000	0.00002
245230_at	0.06304	0.97646
245231_at	0.88802	0.16138
245232_at	0.21584	0.95412
245233_at	0.17342	0.67008
245234_at	0.00172	0.98134
245235_at	0.90256	0.37160
245236_at	0.11218	0.96238
245237_at	0.76512	0.12444
245238_at	0.91226	0.33706
245239_at	0.88070	0.33792
245240_at	0.27004	0.58188
245241_at	0.70658	0.67160
245242_at	0.99266	0.03096
245243_at	0.11330	0.96984
245244_at	0.00000	1.00000
245245_at	0.86426	0.23894
245246_at	0.53398	0.69254
245247_at	0.99376	0.01338
245248_at	0.13984	0.95414
245249_at	0.95534	0.02492
245250_at	0.82750	0.37630
245251_at	0.20610	0.83168
245252_at	0.70580	0.09900
245253_at	0.23874	0.80556
245254_at	0.00014	0.98230
245255_at	0.95258	0.13178
245256_at	0.88740	0.01900

245257_at	0.00296	0.99896
245258_at	0.04224	0.53734
245259_at	0.98300	0.01632
245260_at	0.55314	0.71654
245261_at	0.55428	0.32964
245262_at	0.00002	1.00000
245263_at	0.33332	0.87352
245264_at	0.05350	0.98030
245265_at	0.00002	0.99204
245266_at	0.03774	0.99504
245267_at	0.69800	0.44080
245268_at	0.55914	0.56406
245269_at	0.09172	0.87938
245270_at	0.08700	0.95116
245271_at	0.51644	0.63918
245272_at	0.65810	0.13130
245273_at	0.29876	0.91984
245274_at	0.00630	0.99968
245275_at	0.67036	0.15452
245276_at	1.00000	0.00000
245277_at	0.99994	0.00000
245278_at	0.91804	0.11324
245279_at	0.37622	0.82350
245280_at	0.09212	0.96982
245281_at	0.99986	0.00190
245282_at	0.51764	0.83006
245283_at	0.87138	0.27700
245284_at	0.70598	0.64584
245285_s_at	0.96750	0.13884
245286_at	0.63920	0.71106
245287_at	0.83666	0.38408
245288_at	0.49456	0.64410
245289_at	0.44800	0.84926
245290_at	0.96576	0.11426
245291_at	0.86186	0.11678
245292_at	0.27734	0.62040
245293_at	0.02624	0.99798
245294_at	0.84230	0.52188
245295_at	0.54520	0.59498
245296_at	1.00000	0.00000
245297_at	0.47436	0.74158
245298_at	0.57602	0.74900
245299_at	0.53480	0.80114
245300_at	0.68494	0.07722
245301_at	0.47504	0.83206
245302_at	0.73974	0.51324
245303_at	0.64394	0.31506
245304_at	0.00002	0.99992
245305_at	0.06380	0.84250
245306_at	0.54564	0.08848
245307_at	0.99890	0.00044

245308_at	0.90598	0.26186
245309_at	0.79468	0.16584
245310_at	0.45860	0.60074
245311_at	0.76264	0.33718
245312_at	0.22342	0.94844
245313_at	0.63838	0.60940
245314_at	0.11244	0.92938
245315_at	0.90198	0.36250
245316_at	0.96004	0.26538
245317_at	0.81630	0.38366
245318_at	0.11780	0.96402
245319_at	0.99966	0.00018
245320_at	0.94744	0.25852
245321_at	0.57822	0.77306
245322_at	0.33672	0.65208
245323_at	0.98860	0.08632
245324_at	0.41598	0.47950
245325_at	0.97316	0.03782
245326_at	0.98360	0.10916
245327_at	0.50920	0.62990
245328_at	0.99820	0.00668
245329_at	0.00002	1.00000
245330_at	0.99940	0.00630
245331_at	0.55132	0.67228
245332_at	0.89348	0.33964
245333_at	0.87444	0.42062
245334_at	0.00002	1.00000
245335_at	0.58656	0.65036
245336_at	0.00000	1.00000
245337_at	0.19404	0.83880
245338_at	0.73526	0.16056
245339_at	0.03852	0.99564
245340_at	0.45426	0.86070
245341_at	0.05624	0.97700
245342_at	0.86494	0.40176
245343_at	0.97406	0.02662
245344_at	0.82118	0.35790
245345_at	0.55300	0.40994
245346_at	0.00270	0.99980
245347_at	0.53406	0.70530
245348_at	0.90522	0.12206
245349_at	0.33444	0.60272
245350_at	0.81588	0.34762
245351_at	0.43434	0.71580
245352_at	0.99164	0.01406
245353_at	0.99220	0.01184
245354_at	0.69354	0.65734
245355_at	0.79428	0.43850
245356_at	0.83794	0.56874
245357_at	0.79782	0.44140
245358_at	0.94642	0.21672

245359_at	0.79402	0.48532
245360_at	0.87448	0.38902
245361_at	0.53588	0.64756
245362_at	1.00000	0.00000
245363_at	0.28882	0.82902
245364_at	0.10408	0.96286
245365_at	0.95900	0.04152
245366_at	0.52726	0.69144
245367_at	0.52748	0.44866
245368_at	0.43764	0.71904
245369_at	0.37078	0.62474
245370_at	0.55110	0.63694
245371_at	0.18234	0.82794
245372_at	0.76984	0.46804
245373_s_at	0.91282	0.33572
245374_at	0.86154	0.33966
245375_at	0.10824	0.71572
245376_at	0.90218	0.15354
245377_at	0.63606	0.29928
245378_at	0.72816	0.41948
245379_at	0.26180	0.88000
245380_at	0.06960	0.93322
245381_at	0.34898	0.59656
245382_at	0.92084	0.23486
245383_at	0.00060	0.99994
245384_at	0.91484	0.15542
245385_at	0.45328	0.28274
245386_at	0.94006	0.10380
245387_at	0.90686	0.20784
245388_at	0.33080	0.91916
245389_at	0.36406	0.74106
245390_at	0.63302	0.72412
245391_at	0.91444	0.28064
245392_at	0.04184	0.74632
245393_at	0.66532	0.37900
245394_at	0.77658	0.52914
245395_at	0.93778	0.11630
245396_at	0.62132	0.57678
245397_at	0.98444	0.02482
245398_at	0.80018	0.33382
245399_at	0.00748	0.99970
245400_at	0.62100	0.75870

\$RPrank

	class1 < class2	class1 > class 2
244901_at	292	194
244902_at	270	346
244903_at	106	210
244904_at	277	128
244905_at	356	229
244906_at	57	457
244907_at	305	153
244908_at	346	253
244909_at	271	220
244910_s_at	461	62
244911_at	222	383
244912_at	234	70
244913_at	75	342
244914_at	347	227
244915_s_at	353	198
244916_at	324	261
244917_at	110	422
244918_at	372	233
244919_at	322	174
244920_s_at	132	291
244921_s_at	46	364
244922_s_at	86	436
244923_s_at	130	322
244924_at	209	234
244925_at	264	207
244926_s_at	49	443
244927_at	196	296
244928_s_at	126	183
244929_at	250	165
244930_at	30	470
244931_at	379	218
244932_at	229	239
244933_at	127	347
244934_at	401	148
244935_at	215	372
244936_at	200	272
244937_at	272	104
244938_at	265	86
244939_at	190	32
244940_at	206	61
244941_at	70	185
244942_at	417	113
244943_at	48	462
244944_s_at	115	90
244945_at	54	471
244946_at	328	149
244947_at	79	403
244948_at	286	150
244949_at	162	300
244950_at	78	433

244951_s_at	50	401
244952_at	301	263
244953_s_at	325	268
244954_s_at	354	200
244955_at	100	440
244956_s_at	304	193
244957_at	194	361
244958_at	164	189
244959_s_at	87	76
244960_at	94	430
244961_at	261	385
244962_at	193	400
244963_at	275	184
244964_at	129	188
244965_at	149	353
244966_at	195	214
244967_at	189	321
244968_at	183	224
244969_at	68	315
244970_at	343	82
244971_at	231	397
244972_at	216	201
244973_at	93	290
244974_at	163	380
244975_at	168	314
244976_at	230	411
244977_at	173	286
244978_at	247	74
244979_at	316	85
244980_at	211	167
244981_at	105	175
244982_at	246	114
244983_at	317	47
244984_at	236	169
244985_at	218	92
244986_at	330	134
244987_s_at	387	176
244988_s_at	312	248
244989_s_at	340	36
244990_s_at	114	29
244991_s_at	116	143
244992_s_at	257	230
244993_s_at	228	269
244994_at	102	225
244995_at	165	232
244996_at	203	202
244997_at	146	162
244998_at	199	348
244999_at	148	51
245000_at	145	382
245001_at	255	377

245002_at	125	219
245003_at	104	237
245004_at	210	260
245005_at	160	190
245006_at	296	355
245007_at	327	217
245008_at	239	35
245009_at	273	327
245010_at	219	84
245011_at	144	131
245012_at	186	166
245013_at	342	304
245014_at	350	330
245015_at	58	100
245016_at	154	163
245017_at	198	406
245018_at	291	116
245019_at	283	195
245020_at	368	168
245021_at	124	59
245022_at	74	251
245023_at	188	172
245024_at	143	161
245025_at	73	122
245026_at	345	236
245027_at	140	378
245028_at	92	441
245029_at	27	480
245030_at	274	350
245031_at	45	472
245032_at	299	240
245033_at	103	452
245034_at	44	391
245035_at	171	425
245036_at	365	144
245037_at	152	423
245038_at	66	73
245039_at	37	432
245040_at	89	414
245041_at	16	491
245042_at	465	67
245043_at	297	275
245044_at	266	389
245045_at	214	332
245046_at	469	60
245047_at	128	115
245048_at	170	431
245049_at	62	439
245050_at	172	277
245051_at	471	17
245052 at	17	484

245053_at	309	208
245054_at	176	366
245055_at	416	93
245056_at	139	266
245057_at	377	65
245058_at	307	223
245059_at	38	465
245060_at	113	399
245061_at	334	356
245062_at	409	110
245063_at	159	132
245064_at	419	209
245065_at	256	386
245066_at	338	298
245067_at	364	250
245068_at	393	222
245069_at	429	171
245070_at	331	245
245071_at	248	252
245072_s_at	282	331
245073_at	318	244
245074_at	348	257
245075_at	496	7
245076_at	479	12
245077_at	382	241
245078_at	32	445
245079_at	484	30
245080_at	357	145
245081_at	314	124
245082_at	24	447
245083_at	217	310
245084_at	80	453
245085_at	424	137
245086_at	406	117
245087_at	167	415
245088_at	473	44
245089_at	262	274
245090_at	489	15
245091_at	422	158
245092_at	398	187
245093_at	442	80
245094_at	492	11
245095_at	235	196
245096_at	358	226
245097_at	155	373
245098_at	478	24
245099_at	392	72
245100_at	438	108
245101_at	397	203
245102_at	251	374
245103_at	83	444

245104_at	300	334
245105_at	177	313
245106_at	169	362
245107_at	285	307
245108_at	408	71
245109_at	486	22
245110_at	101	381
245111_at	187	387
245112_at	11	495
245113_at	201	365
245114_at	61	461
245115_at	454	133
245116_at	315	211
245117_at	384	91
245118_at	323	258
245119_at	5	488
245120_at	430	136
245121_at	370	278
245122_at	375	197
245123_at	450	50
245124_at	362	238
245125_at	308	312
245126_at	413	126
245127_at	310	139
245128_at	336	271
245129_at	131	429
245130_at	97	384
245131_s_at	303	336
245132_at	295	316
245133_at	376	146
245134_s_at	440	96
245135_at	388	180
245136_at	498	2
245137_at	431	38
245138_at	158	395
245139_at	449	37
245140_at	179	398
245141_at	12	494
245142_at	326	243
245143_at	22	485
245144_at	287	324
245145_at	204	370
245146_at	88	449
245147_at	302	119
245148_at	91	351
245149_at	418	112
245150_at	446	53
245151_at	332	49
245152_at	245	311
245153_at	205	349
245154_at	120	427

245155_at	458	75
245156_at	178	363
245157_at	197	402
245158_at	109	412
245159_at	111	424
245160_at	82	421
245161_at	180	191
245162_at	72	289
245163_at	69	460
245164_at	341	242
245165_at	335	109
245166_at	359	106
245167_s_at	28	469
245168_at	369	285
245169_at	390	140
245170_at	55	426
245171_at	138	408
245172_at	157	337
245173_at	122	404
245174_at	121	368
245175_at	254	333
245176_at	3	498
245177_at	415	123
245178_at	460	68
245179_at	267	329
245180_at	432	135
245181_at	29	325
245182_at	56	442
245183_at	443	40
245184_at	279	323
245185_at	161	295
245186_at	19	479
245187_s_at	371	98
245188_at	456	20
245189_at	381	255
245190_at	462	66
245191_at	76	420
245192_at	293	246
245193_at	13	486
245194_at	457	95
245195_at	288	375
245196_at	9	492
245197_at	98	320
245198_at	260	360
245199_at	20	482
245200_at	150	249
245201_at	445	88
245202_at	441	26
245203_at	428	125
245204_at	207	287
245205 at	118	369

245206_at	468	97
245207_at	289	280
245208_at	452	89
245209_at	84	343
245210_at	391	212
245211_at	51	474
245212_at	107	283
245213_at	243	410
245214_at	263	103
245215_at	410	142
245216_at	386	204
245217_at	470	43
245218_s_at	226	308
245219_at	329	262
245220_at	444	94
245221_s_at	405	111
245222_at	137	428
245223_at	394	141
245224_at	156	416
245225_at	258	265
245226_at	249	282
245227_s_at	333	102
245228_at	142	357
245229_at	495	6
245230_at	41	463
245231_at	412	83
245232_at	95	450
245233_at	77	317
245234_at	18	467
245235_at	423	177
245236_at	63	454
245237_at	351	58
245238_at	433	155
245239_at	407	157
245240_at	112	273
245241_at	321	318
245242_at	483	31
245243_at	65	459
245244_at	1	499
245245_at	399	107
245246_at	223	328
245247_at	485	18
245248_at	71	451
245249_at	459	27
245250_at	380	178
245251_at	90	394
245252_at	319	45
245253_at	99	379
245254_at	14	468
245255_at	455	64
245256_at	411	23

245257_at	23	478
245258_at	36	259
245259_at	475	21
245260_at	241	341
245261_at	242	151
245262_at	6	497
245263_at	134	417
245264_at	39	466
245265_at	10	473
245266_at	33	475
245267_at	313	215
245268_at	244	264
245269_at	52	418
245270_at	47	448
245271_at	212	299
245272_at	290	63
245273_at	123	435
245274_at	25	481
245275_at	298	78
245276_at	497	4
245277_at	494	5
245278_at	437	52
245279_at	153	388
245280_at	53	458
245281_at	493	10
245282_at	213	393
245283_at	402	127
245284_at	320	302
245285_s_at	467	69
245286_at	281	338
245287_at	383	182
245288_at	202	301
245289_at	181	409
245290_at	466	54
245291_at	396	56
245292_at	117	292
245293_at	31	477
245294_at	389	254
245295_at	232	276
245296_at	499	3
245297_at	191	354
245298_at	252	359
245299_at	225	376
245300_at	306	39
245301_at	192	396
245302_at	344	247
245303_at	284	147
245304_at	4	489
245305_at	42	407
245306_at	233	42
245307_at	488	9

245308_at	426	120
245309_at	363	87
245310_at	185	281
245311_at	349	156
245312_at	96	446
245313_at	280	288
245314_at	64	437
245315_at	420	173
245316_at	464	121
245317_at	374	181
245318_at	67	456
245319_at	491	8
245320_at	453	118
245321_at	253	371
245322_at	136	306
245323_at	480	41
245324_at	166	231
245325_at	472	33
245326_at	476	48
245327_at	208	294
245328_at	487	14
245329_at	8	493
245330_at	490	13
245331_at	238	319
245332_at	414	159
245333_at	403	206
245334_at	7	496
245335_at	259	305
245336_at	2	500
245337_at	85	405
245338_at	339	81
245339_at	34	476
245340_at	184	413
245341_at	40	464
245342_at	400	192
245343_at	474	28
245344_at	378	170
245345_at	240	199
245346_at	21	487
245347_at	224	335
245348_at	425	57
245349_at	135	284
245350_at	373	164
245351_at	174	340
245352_at	481	19
245353_at	482	16
245354_at	311	309
245355_at	361	213
245356_at	385	267
245357_at	366	216
245358_at	451	101

245359_at	360	235
245360_at	404	186
245361_at	227	303
245362_at	500	1
245363_at	119	392
245364_at	59	455
245365_at	463	34
245366_at	220	326
245367_at	221	221
245368_at	175	344
245369_at	151	293
245370_at	237	297
245371_at	81	390
245372_at	352	228
245373_s_at	434	154
245374_at	395	160
245375_at	60	339
245376_at	421	77
245377_at	278	138
245378_at	337	205
245379_at	108	419
245380_at	43	438
245381_at	141	279
245382_at	439	105
245383_at	15	490
245384_at	436	79
245385_at	182	130
245386_at	448	46
245387_at	427	99
245388_at	133	434
245389_at	147	352
245390_at	276	345
245391_at	435	129
245392_at	35	358
245393_at	294	179
245394_at	355	256
245395_at	447	55
245396_at	269	270
245397_at	477	25
245398_at	367	152
245399_at	26	483
245400_at	268	367

\$Orirank

\$Orirank\$`class1 < class2`

	[,1]	[,2]	[,3]	[,4]	[,5]	[,6]	[,7]	[,8]	[,9]	[,10]
[,11]	[,12]	[,13]								
[1,]	382	354	358	59	52	56	384	383	377	402
419	236	287								
[2,]	209	358	137	195	345	126	240	376	169	275
330	135	194								
[3,]	22	8	47	344	127	435	393	234	457	149
68	457	430								
[4,]	105	77	423	110	70	418	210	154	456	431
252	472	451								
[5,]	145	292	106	292	435	264	335	442	323	150
233	280	371								
[6,]	164	100	295	106	55	201	182	91	286	101
202	16	22								
[7,]	148	428	425	41	252	230	153	422	411	102
234	385	471								
[8,]	190	278	105	389	455	318	201	279	113	268
314	295	355								
[9,]	341	479	473	73	320	269	88	299	242	224
281	118	144								
[10,]	244	393	189	445	487	416	360	453	322	212
318	325	416								
[11,]	333	342	276	185	171	121	196	200	123	265
331	112	160								
[12,]	96	16	65	464	222	439	438	243	429	424
60	492	459								
[13,]	33	197	66	71	359	148	59	269	86	28
351	181	492								
[14,]	464	271	317	398	152	210	435	287	320	229
147	235	131								
[15,]	260	437	258	128	313	105	211	387	194	200
328	406	466								
[16,]	366	368	456	171	154	295	250	284	383	165
290	96	170								
[17,]	29	102	97	76	248	278	65	178	195	335
370	171	229								
[18,]	422	255	415	305	119	286	323	157	308	267
361	194	334								
[19,]	402	269	373	212	86	174	229	105	180	242
463	327	487								
[20,]	69	78	33	120	110	50	406	424	310	337
143	450	380								
[21,]	14	18	38	72	72	184	235	249	388	50
43	452	462								
[22,]	194	158	76	95	64	41	275	238	125	350
116	326	64								
[23,]	64	65	48	129	106	83	365	374	327	310
80	463	359								
[24,]	28	53	32	243	350	251	386	448	405	293

277	357	360									
[25,]	214	239	104	207	215	100	362	389	260	477	
63	482	205									
[26,]	49	54	283	25	16	123	122	108	399	93	
90	257	266									
[27,]	201	317	95	244	356	127	163	252	73	109	
439	114	463									
[28,]	48	37	21	199	103	65	450	433	369	316	
150	471	474									
[29,]	227	72	34	453	298	146	477	423	325	340	
75	443	211									
[30,]	53	32	216	28	13	99	46	19	142	362	
81	252	35									
[31,]	380	447	357	214	340	182	289	391	267	228	
360	110	233									
[32,]	139	257	394	151	275	390	314	417	462	106	
36	348	61									
[33,]	161	406	347	103	357	268	166	402	335	18	
42	89	116									
[34,]	197	352	427	272	420	445	177	328	382	263	
105	415	273									
[35,]	178	377	326	50	153	116	154	349	274	207	
240	219	267									
[36,]	324	466	331	89	272	82	245	420	235	49	
56	266	322									
[37,]	171	350	369	167	347	333	367	459	460	178	
8	491	148									
[38,]	266	205	158	383	352	302	481	474	478	35	
15	469	286									
[39,]	75	51	389	400	346	492	476	466	496	351	
5	494	43									
[40,]	80	42	185	428	335	480	447	410	491	117	
12	487	247									
[41,]	318	313	449	34	28	80	23	18	41	158	
486	253	495									
[42,]	355	141	400	381	148	411	453	357	471	311	
244	306	232									
[43,]	42	106	228	24	41	111	41	60	168	199	
170	285	240									
[44,]	274	28	29	489	257	292	495	415	421	368	
16	448	10									
[45,]	71	76	41	93	85	59	125	121	67	163	
271	125	239									
[46,]	51	340	343	247	485	477	81	372	362	232	
228	244	226									
[47,]	241	276	144	37	45	33	102	88	49	271	
420	214	425									
[48,]	387	490	365	282	480	253	119	399	80	129	
173	129	167									
[49,]	315	446	446	60	142	137	57	113	87	156	
305	239	394									

[50,]	253	84	247	136	31	117	169	43	140	57
183	186	442								
[51,]	124	49	102	44	15	49	121	40	98	470
356	414	171								
[52,]	456	337	436	271	105	206	260	129	217	213
135	343	231								
[53,]	202	263	100	353	411	244	336	385	233	347
346	133	115								
[54,]	365	209	325	450	385	430	322	193	279	321
101	328	73								
[55,]	222	251	239	160	147	157	78	59	63	75
206	130	347								
[56,]	150	374	390	284	464	452	86	246	240	84
97	345	383								
[57,]	176	272	152	275	377	263	80	102	56	345
401	153	243								
[58,]	89	103	457	191	190	481	131	137	451	44
395	43	427								
[59,]	26	13	9	471	421	289	475	455	394	363
13	495	124								
[60,]	339	334	192	116	95	51	306	318	159	52
121	47	95								
[61,]	208	248	348	162	165	277	161	185	272	159
165	258	277								
[62,]	94	117	128	218	274	310	223	276	303	166
87	344	188								
[63,]	264	390	73	197	327	48	467	484	393	208
225	190	198								
[64,]	181	404	27	196	418	25	469	495	282	104
197	66	110								
[65,]	361	265	68	263	146	43	426	392	154	61
95	179	324								
[66,]	307	403	360	178	280	203	369	436	403	21
415	9	213								
[67,]	411	435	115	230	287	46	310	364	70	111
125	228	258								
[68,]	97	364	75	288	479	267	351	477	344	45
58	136	168								
[69,]	299	468	98	107	344	36	355	469	158	32
33	41	17								
[70,]	121	116	147	435	453	458	414	426	448	236
30	476	310								
[71,]	143	151	254	181	173	307	184	187	300	189
131	333	255								
[72,]	90	173	371	236	373	463	183	295	423	121
18	474	151								
[73,]	354	469	465	97	263	259	123	297	273	7
24	57	108								
[74,]	179	169	237	267	232	324	100	63	112	80
243	216	437								
[75,]	258	459	432	52	210	144	112	338	246	63

73	215	293									
[76,]	204	287	223	163	209	171	146	208	147	257	
284	192	237									
[77,]	82	359	391	168	456	446	44	211	221	264	
132	155	54									
[78,]	412	470	124	216	370	45	492	496	439	86	
146	86	152									
[79,]	295	426	72	268	419	64	488	497	440	226	
185	210	155									
[80,]	74	246	36	280	462	161	462	486	431	221	
130	209	97									
[81,]	317	462	70	132	333	27	474	493	367	36	
46	87	84									
[82,]	81	232	173	187	399	332	437	483	485	62	
25	436	269									
[83,]	87	133	323	439	474	490	396	450	489	70	
44	351	264									
[84,]	245	477	161	177	467	101	345	481	285	51	
54	238	251									
[85,]	399	489	196	176	449	57	446	491	364	46	
28	331	146									
[86,]	383	397	327	317	363	255	444	467	434	41	
40	267	196									
[87,]	327	336	409	380	404	424	297	320	360	103	
85	307	245									
[88,]	152	347	182	238	437	291	264	434	332	116	
66	369	271									
[89,]	57	413	489	88	468	494	104	446	495	260	
179	293	202									
[90,]	91	491	469	40	482	420	176	485	482	31	
500	3	57									
[91,]	212	482	482	36	362	320	22	194	156	136	
490	10	212									
[92,]	123	64	180	392	305	444	385	319	438	100	
53	378	236									
[93,]	285	422	433	190	349	329	198	348	338	33	
51	126	183									
[94,]	375	295	382	125	65	110	220	146	205	17	
488	11	481									
[95,]	200	190	349	242	214	368	421	431	474	19	
20	247	93									
[96,]	308	445	468	80	195	290	266	416	445	24	
39	196	224									
[97,]	47	137	103	202	393	351	413	472	473	20	
19	439	302									
[98,]	92	172	315	142	229	375	151	263	381	142	
50	416	193									
[99,]	153	471	478	115	458	465	130	444	458	26	
3	479	109									
[100,]	72	74	80	153	125	179	239	244	287	357	
93	444	222									

[101,]	240	305	270	104	120	112	231	292	249	231
273	217	285								
[102,]	119	240	386	122	241	376	157	311	401	12
6	480	435								
[103,]	24	33	126	252	261	459	270	313	466	23
26	422	404								
[104,]	268	355	125	126	172	55	431	468	366	66
118	241	381								
[105,]	60	464	450	56	470	440	28	356	301	140
114	180	134								
[106,]	146	118	208	253	203	326	256	241	347	279
288	228	255								
[107,]	165	204	367	273	324	427	348	400	452	78
65	290	250								
[108,]	159	294	421	330	450	474	405	464	490	29
2	496	342								
[109,]	101	140	157	209	271	321	316	371	404	204
140	316	201								
[110,]	45	34	55	411	375	438	456	441	475	401
41	478	203								
[111,]	40	23	89	303	179	432	422	370	480	410
23	485	113								
[112,]	282	450	57	119	315	21	470	490	349	138
307	84	219								
[113,]	140	216	133	249	365	276	286	382	324	270
274	228	255								
[114,]	257	290	277	217	230	222	254	298	271	281
289	228	255								
[115,]	13	20	50	376	434	475	77	77	210	475
4	500	173								
[116,]	23	46	87	205	295	421	315	393	461	440
31	483	121								
[117,]	112	142	113	179	194	192	277	345	318	169
120	321	221								
[118,]	219	389	431	200	380	396	321	437	450	59
17	464	162								
[119,]	263	345	330	201	278	241	418	458	446	39
34	341	265								
[120,]	305	402	396	143	220	196	412	460	449	171
127	311	216								
[121,]	443	487	78	239	440	26	489	498	356	25
129	26	100								
[122,]	249	401	23	117	242	10	480	492	229	55
102	71	137								
[123,]	377	386	487	245	258	462	135	133	398	14
83	61	358								
[124,]	215	274	351	233	281	349	214	260	329	4
9	466	494								
[125,]	111	162	288	140	178	319	318	379	442	3
1	489	493								
[126,]	195	156	346	294	224	410	339	314	428	119

82	388	339									
[127,]	254	207	159	348	312	266	128	80	64	38	
124	202	439									
[128,]	103	122	112	175	188	205	246	300	298	209	
61	95	20									
[129,]	58	31	45	47	26	44	136	51	90	92	
86	36	25									
[130,]	284	349	321	169	204	172	127	165	122	344	
302	292	238									
[131,]	151	139	110	75	62	66	53	38	38	283	
169	221	111									
[132,]	270	467	265	194	436	169	247	449	243	152	
157	144	141									
[133,]	243	296	175	152	161	91	138	152	76	191	
164	104	76									
[134,]	85	298	142	20	48	31	34	103	48	71	
191	413	483									
[135,]	129	198	198	113	174	183	199	296	291	164	
286	94	166									
[136,]	434	309	165	413	301	164	403	309	165	124	
442	147	473									
[137,]	135	80	96	254	133	213	165	87	128	277	
296	279	320									
[138,]	435	476	17	463	490	23	454	482	29	5	
104	15	346									
[139,]	180	167	101	127	89	70	32	22	20	22	
324	93	479									
[140,]	137	260	134	156	282	170	71	126	61	30	
354	49	448									
[141,]	39	92	51	19	25	17	14	17	11	27	
88	30	59									
[142,]	279	348	266	455	476	442	292	365	275	445	
270	430	283									
[143,]	293	180	139	393	299	275	392	316	288	382	
144	269	48									
[144,]	238	225	291	248	218	279	175	153	193	240	
247	193	200									
[145,]	368	275	119	259	140	71	344	280	130	429	
261	268	70									
[146,]	392	433	406	343	423	348	333	404	350	404	
476	117	350									
[147,]	38	12	28	416	213	383	442	347	435	411	
22	493	304									
[148,]	138	104	120	234	175	247	242	203	257	144	
154	207	223									
[149,]	107	338	122	29	104	38	144	378	177	42	
27	320	145									
[150,]	286	361	453	206	277	391	139	184	306	13	
55	103	385									
[151,]	457	484	380	448	488	366	433	476	374	128	
484	90	488									

[152,]	7	9	7	16	36	19	61	224	92	40
110	18	37								
[153,]	351	385	402	158	166	178	105	109	97	432
432	384	400								
[154,]	169	107	69	285	162	129	291	199	137	385
107	453	244								
[155,]	455	147	235	465	163	282	479	355	417	255
389	205	387								
[156,]	84	85	459	78	73	449	51	41	372	246
327	315	396								
[157,]	321	454	485	203	394	451	84	191	321	147
464	116	476								
[158,]	132	109	417	172	114	431	300	278	470	214
151	372	326								
[159,]	50	48	46	87	61	78	162	122	132	273
391	24	40								
[160,]	346	258	372	111	60	115	159	85	155	108
428	33	218								
[161,]	237	215	241	266	237	274	236	221	239	282
292	228	255								
[162,]	431	335	398	399	328	359	349	272	313	454
436	115	77								
[163,]	490	284	319	364	47	60	493	390	407	181
126	58	32								
[164,]	221	375	313	241	400	313	249	394	326	343
323	274	268								
[165,]	127	124	199	224	217	328	193	192	284	285
229	265	210								
[166,]	247	145	127	336	197	215	340	230	232	372
306	359	297								

[167,]	294	414	324	198	342	197	168	304	160	274
407	185	382								
[168,]	364	289	206	437	415	339	301	233	153	253
259	283	318								
[169,]	425	343	280	391	341	252	330	266	175	289
399	251	398								
[170,]	460	203	226	404	121	154	404	160	173	254
203	367	337								
[171,]	203	55	329	227	49	337	267	64	376	427
269	442	357								
[172,]	242	277	166	293	325	221	191	206	120	334
422	109	241								
[173,]	401	146	334	452	235	414	269	62	202	173
200	289	329								
[174,]	133	250	278	221	379	377	228	362	368	176
394	102	338								
[175,]	498	492	497	493	475	493	478	430	487	479
495	401	489								
[176,]	378	496	493	231	493	478	363	488	492	467
322	407	133								
[177,]	188	280	387	148	200	317	213	305	379	332
280	387	356								
[178,]	68	69	63	130	109	124	26	21	24	349
35	461	62								
[179,]	379	222	375	483	459	482	430	366	433	443
466	297	412								
[180,]	350	411	442	313	401	402	328	403	412	134
262	51	87								
[181,]	395	457	481	141	245	346	133	232	330	107
456	46	393								
[182,]	61	212	12	12	20	5	25	61	9	113
70	438	415								
[183,]	458	357	344	299	139	133	370	251	218	69
89	124	175								
[184,]	79	99	92	77	92	106	206	245	259	65
91	187	315								
[185,]	357	291	364	349	297	350	371	343	385	453
204	399	88								
[186,]	196	206	454	192	181	434	342	368	479	227
227	379	389								
[187,]	100	186	263	173	291	357	98	164	230	220
100	278	98								
[188,]	376	356	441	357	372	417	428	432	464	187
427	156	441								
[189,]	396	412	388	159	170	135	334	375	333	118
276	56	125								
[190,]	452	392	455	434	397	436	423	388	430	486
491	425	469								
[191,]	230	279	322	301	353	370	224	256	293	239
431	318	470								

[192,]	290	247	300	356	329	353	195	147	166	425
433	342	372								
[193,]	291	256	312	443	439	443	327	310	340	276
477	92	444								
[194,]	492	475	471	477	447	419	441	405	390	462
388	481	491								
[195,]	114	425	91	84	417	77	140	425	109	327
460	232	453								
[196,]	289	90	193	451	256	400	375	163	314	358
368	224	235								
[197,]	278	306	249	157	135	122	103	86	68	153
413	148	436								
[198,]	483	439	439	454	403	372	484	473	476	423
400	198	147								
[199,]	484	211	309	466	155	254	465	274	339	476
410	233	67								
[200,]	288	229	118	462	452	355	409	386	289	266
343	317	401								
[201,]	334	396	374	279	366	304	202	275	215	400
423	159	199								
[202,]	110	114	176	246	247	344	194	198	292	179
162	340	336								
[203,]	62	38	44	302	176	257	186	89	126	120
176	172	294								
[204,]	259	328	272	258	326	262	279	353	296	180
119	191	107								
[205,]	120	266	211	99	223	185	67	139	96	223
454	237	472								
[206,]	175	66	54	417	267	249	380	228	201	114
69	354	263								
[207,]	183	382	338	70	202	159	142	323	254	395
329	300	179								
[208,]	182	184	475	347	361	489	141	124	443	314
309	421	443								
[209,]	459	418	467	326	260	365	466	462	483	405
467	368	468								
[210,]	115	27	40	307	67	138	337	93	176	436
291	353	122								
[211,]	177	370	186	193	395	195	92	215	74	190
133	288	186								
[212,]	25	10	15	23	9	12	33	13	15	88
45	23	8								
[213,]	345	410	342	215	307	200	113	161	85	308
171	161	69								
[214,]	86	59	53	90	56	63	179	112	104	361
189	255	79								
[215,]	372	329	308	387	389	338	313	294	253	428
357	373	276								
[216,]	272	101	403	312	100	409	326	136	416	450
363	242	91								
[217,]	265	108	292	276	83	283	389	225	409	493

339	484	411									
[218,]	163	166	184	297	303	327	317	332	351	393	
79	447	132									
[219,]	5	3	2	3	2	3	4	4	3	198	
113	182	81									
[220,]	297	259	305	395	388	397	397	381	408	397	
355	175	114									
[221,]	347	323	287	350	339	284	304	288	231	201	
279	145	215									
[222,]	217	136	261	287	160	322	293	197	334	474	
387	423	280									
[223,]	256	128	213	458	384	433	429	361	419	480	
254	467	299									
[224,]	251	254	340	338	348	399	178	158	227	437	
348	286	119									
[225,]	168	307	242	184	308	250	268	397	354	125	
112	304	281									
[226,]	108	318	303	240	451	426	238	429	418	211	
297	332	409									
[227,]	429	463	422	189	273	160	79	106	53	412	
380	419	410									
[228,]	405	267	219	290	123	114	366	239	200	378	
404	197	252									
[229,]	136	170	149	138	143	163	99	104	100	175	
194	350	377									
[230,]	463	299	289	315	96	98	324	127	110	81	
111	40	41									
[231,]	371	270	268	335	225	240	234	141	133	322	
315	176	185									
[232,]	389	155	169	354	112	153	387	189	213	241	
250	299	323									
[233,]	167	438	253	298	478	381	190	427	263	303	
408	97	190									
[234,]	430	324	307	457	406	369	439	409	392	313	
128	334	118									
[235,]	432	400	438	291	244	280	215	181	203	197	
177	410	408									
[236,]	499	497	495	499	499	497	499	499	497	498	
493	465	340									
[237,]	343	143	145	410	206	256	494	475	488	383	
207	455	399									
[238,]	128	61	93	235	99	204	263	151	256	394	
392	168	154									
[239,]	471	458	408	368	371	228	461	463	420	386	
472	62	208									
[240,]	189	174	174	91	71	84	320	312	319	185	
303	160	316									
[241,]	18	25	52	9	6	13	13	10	21	60	
64	29	21									
[242,]	236	126	150	421	337	373	295	173	222	449	
218	397	102									

[243,]	156	87	58	86	43	37	82	36	27	48
21	19	4								
[244,]	206	149	172	269	182	239	288	226	269	441
248	366	101								
[245,]	298	395	363	133	207	165	158	257	196	203
333	59	96								
[246,]	157	88	108	124	57	86	149	69	106	243
310	199	303								
[247,]	441	40	221	472	50	325	482	149	432	315
239	335	288								
[248,]	160	441	77	170	448	74	24	98	13	230
264	271	325								
[249,]	367	176	232	429	270	343	415	281	345	297
471	134	450								
[250,]	438	434	377	459	466	413	307	326	209	460
213	408	85								
[251,]	491	481	452	433	390	224	356	285	131	161
479	14	197								
[252,]	235	194	293	135	81	151	167	128	190	389
455	222	391								
[253,]	362	281	83	386	343	118	237	170	46	168
156	310	309								
[254,]	239	223	245	112	90	108	118	95	105	82
186	250	421								
[255,]	446	408	419	419	407	389	411	398	391	324
376	121	161								
[256,]	408	144	197	351	87	143	425	219	290	174
175	91	74								
[257,]	231	312	194	139	167	97	200	255	143	333
136	364	136								
[258,]	207	121	378	264	138	401	63	32	115	74
117	178	312								
[259,]	63	125	250	79	144	308	55	75	181	132
285	220	402								
[260,]	73	131	361	27	38	156	48	57	237	302
342	234	308								
[261,]	170	448	85	431	494	356	116	380	52	67
96	150	260								
[262,]	453	314	405	64	24	40	96	27	42	170
462	69	431								
[263,]	67	138	233	45	91	191	37	48	91	160
241	167	291								
[264,]	404	351	243	374	351	227	373	358	247	301
304	81	60								
[265,]	337	171	195	467	382	395	427	335	357	444
49	437	33								
[266,]	437	187	447	397	128	404	452	324	465	195
350	67	139								
[267,]	250	202	109	30	22	15	305	265	151	8
62	7	29								
[268,]	312	300	236	324	314	258	262	262	199	248

161	377	321									
[269,]	419	346	298	436	410	341	204	134	81	406	
211	440	333									
[270,]	36	195	310	17	51	93	20	78	138	123	
253	324	440									
[271,]	118	164	202	66	88	134	192	247	299	137	
417	72	363									
[272,]	301	420	302	229	386	212	126	235	95	145	
384	22	56									
[273,]	56	93	99	226	323	354	62	72	93	377	
222	363	165									
[274,]	70	96	94	145	158	198	187	227	255	482	
386	138	34									
[275,]	314	231	246	296	201	226	276	212	220	359	
411	60	66									
[276,]	2	2	5	5	5	6	2	2	5	37	
11	54	5									
[277,]	336	391	203	223	300	107	400	443	317	388	
452	245	395									
[278,]	478	424	448	379	288	297	424	373	386	131	
267	287	432									
[279,]	311	238	413	309	231	393	172	111	248	172	
251	113	157									
[280,]	262	268	352	373	391	425	257	273	342	456	
418	246	149									
[281,]	34	52	140	15	11	34	27	28	84	426	
497	34	428									
[282,]	35	24	49	186	93	220	180	92	204	430	
199	139	28									
[283,]	413	123	129	484	358	371	472	363	380	485	
345	456	195									
[284,]	223	112	86	320	164	149	372	270	228	287	
258	370	368									
[285,]	205	456	299	65	336	103	85	325	94	53	
174	249	455									
[286,]	20	7	10	57	19	20	120	35	34	98	
265	25	47									
[287,]	474	302	214	446	239	168	486	452	415	244	
137	240	103									
[288,]	495	449	445	495	481	469	464	315	268	379	
92	427	117									
[289,]	388	325	200	367	322	188	357	329	198	320	
195	336	209									
[290,]	349	451	407	149	289	177	346	447	397	455	
426	404	370									
[291,]	78	285	64	204	443	180	42	145	30	83	
295	68	289									
[292,]	447	419	462	144	94	175	226	188	270	216	
319	140	242									
[293,]	15	26	6	21	18	8	91	97	23	9	
275	4	14									

[294,]	319	293	460	329	309	455	259	240	422	305
414	270	424								
[295,]	199	201	210	228	219	237	203	202	197	326
272	282	225								
[296,]	11	19	11	7	7	7	7	6	4	96
209	12	15								
[297,]	277	436	84	250	425	72	90	195	25	89
448	20	292								
[298,]	326	235	181	300	192	155	273	201	141	353
122	394	123								
[299,]	30	43	39	22	17	29	30	26	32	146
238	21	26								
[300,]	480	326	444	316	78	190	150	37	69	68
352	75	417								
[301,]	186	165	269	371	360	423	280	268	359	484
459	418	367								
[302,]	465	105	463	491	330	491	473	229	484	435
145	434	128								
[303,]	267	444	354	237	431	312	137	322	167	376
383	393	418								
[304,]	27	220	163	101	442	398	69	359	307	193
300	254	361								
[305,]	233	376	426	82	177	238	45	66	88	94
385	55	343								
[306,]	331	423	274	306	422	246	390	454	358	364
353	355	348								
[307,]	210	175	148	331	293	287	227	177	163	458
184	435	138								
[308,]	330	440	362	161	283	162	352	439	375	448
336	449	392								
[309,]	255	461	333	55	234	75	18	42	18	233
373	203	373								
[310,]	187	129	187	295	196	299	376	341	395	354
334	400	397								
[311,]	126	160	146	81	97	119	97	100	102	73
115	63	80								
[312,]	93	253	18	165	369	32	109	267	22	396
374	432	438								
[313,]	225	230	255	210	199	231	145	143	144	238
232	256	249								
[314,]	370	221	434	481	461	487	72	29	82	318
172	349	192								
[315,]	420	234	201	447	334	288	434	346	309	420
294	294	104								
[316,]	444	388	411	289	186	207	377	342	336	188
139	319	230								
[317,]	445	398	488	325	265	457	361	331	467	259
378	201	362								
[318,]	191	157	177	114	75	102	343	330	352	407
441	141	217								
[319,]	149	154	123	256	253	245	271	302	277	442

457	184	298									
[320,]	211	380	204	278	432	273	432	478	441	217	
316	312	403									
[321,]	398	483	464	121	374	236	152	384	278	306	
365	223	328									
[322,]	193	339	286	94	189	142	164	301	226	143	
67	183	63									
[323,]	468	417	420	418	381	342	222	135	116	219	
287	263	335									
[324,]	232	282	285	58	69	73	171	196	185	237	
210	298	274									
[325,]	134	415	141	154	441	176	75	321	71	323	
393	259	369									
[326,]	155	188	262	382	429	448	107	118	161	141	
349	98	311									
[327,]	228	71	82	487	430	441	399	216	265	348	
72	470	354									
[328,]	109	94	131	322	304	385	232	204	297	360	
364	32	24									
[329,]	488	416	494	494	483	496	497	489	499	494	
451	468	405									
[330,]	17	39	19	150	238	128	147	236	119	325	
103	127	27									
[331,]	131	153	392	378	424	485	284	337	453	122	
308	338	467									
[332,]	43	115	60	100	240	140	110	248	134	280	
187	225	140									
[333,]	102	89	238	67	58	187	31	23	58	384	
447	398	464									
[334,]	8	95	24	13	102	30	5	11	7	54	
379	53	419									
[335,]	304	304	345	388	405	415	299	303	331	235	
138	375	279									
[336,]	122	83	179	62	39	104	111	55	157	56	
208	132	420									
[337,]	472	315	248	438	243	194	491	457	437	452	
235	122	23									
[338,]	325	384	384	219	284	265	217	277	252	451	
405	382	314									
[339,]	348	399	440	321	398	406	219	293	316	115	
163	303	374									
[340,]	130	120	458	31	27	261	64	49	341	194	
424	277	465									
[341,]	296	193	227	274	149	202	248	162	189	370	
257	403	317									
[342,]	485	485	483	334	412	374	312	377	353	465	
453	330	313									
[343,]	229	111	240	109	40	109	114	44	99	43	
214	64	344									
[344,]	3	4	3	1	1	1	1	1	1	6	
48	5	9									

[345,]	424	283	336	390	249	303	410	317	348	90
445	100	475								
[346,]	273	365	393	146	211	229	83	114	111	338
421	105	227								
[347,]	486	353	383	490	465	456	487	456	454	356
438	163	341								
[348,]	147	81	81	118	54	69	155	73	83	371
366	128	105								
[349,]	454	311	359	479	428	437	483	461	472	419
480	48	169								
[350,]	451	443	230	319	319	89	391	401	170	250
226	301	295								
[351,]	369	130	132	361	111	147	374	159	183	258
293	13	12								
[352,]	391	224	190	480	457	428	490	471	469	72
47	189	90								
[353,]	329	432	116	61	118	22	143	253	40	135
325	152	384								
[354,]	4	6	8	8	14	14	8	16	16	105
38	458	330								
[355,]	461	409	264	440	408	243	457	445	343	416
245	356	129								
[356,]	489	47	212	498	279	471	498	354	481	422
263	361	143								
[357,]	10	36	25	10	23	18	19	53	43	225
190	119	82								
[358,]	342	17	22	369	21	24	394	31	31	478
492	39	75								
[359,]	466	478	430	476	491	450	460	479	444	206
142	339	259								
[360,]	384	363	341	277	255	219	281	283	238	162
152	74	50								
[361,]	98	45	35	432	321	281	455	407	387	461
181	417	86								
[362,]	19	11	13	18	8	9	12	7	8	15
7	38	6								
[363,]	173	110	220	182	84	217	252	169	311	284
52	374	53								
[364,]	99	63	74	123	66	90	185	116	135	373
205	28	7								
[365,]	6	21	20	6	12	11	11	54	50	2
473	2	11								
[366,]	52	57	59	96	79	113	197	190	212	76
78	31	19								
[367,]	418	452	273	377	444	232	124	174	45	300
212	323	220								
[368,]	125	252	332	137	262	331	70	130	182	110
317	396	484								
[369,]	46	41	67	147	80	199	40	25	44	391
159	451	331								
[370,]	246	152	79	134	59	39	173	74	47	366

371	42	31									
[371,]	356	159	318	426	259	403	296	120	258	307	
149	78	30									
[372,]	409	119	490	255	42	466	132	24	400	399	
443	412	461									
[373,]	283	301	267	180	157	145	225	223	187	47	
71	83	126									
[374,]	31	22	56	51	33	95	93	46	124	87	
29	76	13									
[375,]	104	442	257	211	484	394	94	411	206	34	
446	212	496									
[376,]	496	499	499	474	496	498	364	470	494	495	
496	477	498									
[377,]	494	486	496	497	497	499	496	494	498	497	
398	486	275									
[378,]	281	127	229	407	251	379	463	413	455	487	
468	314	150									
[379,]	292	178	71	385	276	136	265	156	66	375	
224	166	52									
[380,]	113	60	114	102	46	120	68	30	59	381	
237	262	99									
[381,]	470	473	474	460	471	468	395	419	424	492	
482	459	458									
[382,]	172	249	151	208	285	189	129	176	101	304	
369	158	272									
[383,]	302	319	191	461	469	405	205	209	107	328	
372	329	388									
[384,]	218	196	155	346	338	296	258	254	216	417	
282	272	94									
[385,]	475	381	401	370	198	214	436	367	363	331	
299	426	434									
[386,]	390	316	167	345	269	141	338	289	148	139	
216	146	234									
[387,]	476	383	399	396	236	248	368	220	211	291	
256	188	159									
[388,]	116	75	111	286	184	306	353	306	384	421	
108	392	51									
[389,]	185	182	251	164	122	211	160	144	207	299	
416	82	177									
[390,]	332	213	271	425	368	388	347	264	302	491	
444	462	349									
[391,]	310	135	385	468	367	472	401	258	436	471	
98	460	78									
[392,]	226	367	301	63	129	88	50	79	51	414	
487	80	352									
[393,]	66	73	37	183	168	92	73	52	36	79	
94	50	46									
[394,]	287	181	290	384	286	382	287	179	281	312	
217	371	307									
[395,]	106	322	370	53	205	271	49	155	188	352	
382	380	422									

[396,]	497	498	498	496	498	495	485	487	493	489
402	499	499								
[397,]	234	331	410	222	331	378	60	71	108	186
268	120	182								
[398,]	216	148	171	342	254	305	303	222	264	292
77	358	83								
[399,]	271	183	282	311	193	311	156	76	136	319
326	149	153								
[400,]	493	493	476	358	364	166	189	168	54	97
469	79	478								
[401,]	252	199	160	262	183	167	325	286	245	336
188	107	45								
[402,]	174	68	170	328	137	335	359	207	371	367
347	386	375								
[403,]	313	97	205	486	409	464	420	231	370	177
59	305	65								
[404,]	9	5	4	4	3	2	6	3	2	16
220	17	207								
[405,]	32	91	26	43	113	35	54	107	28	446
461	204	332								
[406,]	397	431	479	310	396	454	36	39	79	298
32	497	480								
[407,]	473	474	424	492	495	483	332	369	223	496
481	490	490								
[408,]	423	242	337	422	266	345	458	395	427	278
321	137	181								
[409,]	487	366	466	469	294	422	272	65	184	249
437	70	282								
[410,]	436	189	416	406	150	384	230	50	178	329
219	77	39								
[411,]	439	217	234	482	413	412	383	182	192	272
301	101	106								
[412,]	83	150	138	39	74	67	134	214	224	192
167	296	270								
[413,]	394	179	231	355	126	208	282	96	139	154
278	362	446								
[414,]	55	67	90	42	53	85	101	99	145	99
338	206	452								
[415,]	421	264	379	402	250	360	290	138	234	339
341	347	364								
[416,]	393	288	328	362	264	294	408	360	373	346
298	409	378								
[417,]	338	321	121	260	212	81	419	421	276	374
429	273	376								
[418,]	166	177	168	92	76	96	43	33	37	269
359	108	191								
[419,]	481	495	492	415	492	473	241	440	389	490
489	488	497								
[420,]	358	273	418	323	228	386	298	217	361	330
375	405	445								
[421,]	300	208	259	281	180	235	253	183	219	369

141	302	58									
[422,]	141	421	281	33	187	76	87	336	150	85	
425	99	460									
[423,]	363	261	350	412	354	408	402	350	406	463	
474	352	426									
[424,]	198	460	397	98	402	260	29	140	57	309	
470	52	300									
[425,]	416	427	353	340	387	270	294	340	214	499	
498	420	306									
[426,]	450	341	443	401	296	387	358	242	346	464	
403	428	351									
[427,]	442	430	395	213	191	132	148	131	75	91	
249	142	379									
[428,]	469	465	480	427	446	461	285	308	365	473	
494	383	486									
[429,]	37	30	42	48	32	62	15	9	14	1	
57	1	1									
[430,]	467	407	428	485	472	467	449	428	425	488	
377	475	365									
[431,]	213	113	135	261	115	181	378	290	337	438	
362	169	71									
[432,]	154	236	188	314	414	363	233	344	283	418	
344	429	390									
[433,]	449	373	339	366	268	216	331	237	186	286	
358	208	327									
[434,]	12	15	43	14	10	28	9	8	17	10	
14	8	3									
[435,]	95	192	164	74	156	150	209	351	328	290	
332	381	433									
[436,]	1	1	1	2	4	4	3	5	6	11	
10	6	2									
[437,]	41	79	183	83	145	334	38	47	129	415	
435	165	214									
[438,]	410	237	284	475	426	429	471	438	447	182	
215	44	38									
[439,]	77	58	62	49	35	53	117	68	89	64	
84	173	278									
[440,]	162	132	136	251	185	233	208	167	191	296	
390	88	158									
[441,]	360	308	156	174	107	58	108	56	35	95	
74	35	18									
[442,]	448	333	381	403	290	315	388	291	312	205	
182	211	178									
[443,]	406	472	429	456	489	460	445	480	468	317	
266	164	135									
[444,]	320	185	162	375	233	234	382	282	266	483	
397	391	120									
[445,]	142	191	256	444	473	479	66	70	103	210	
158	360	319									
[446,]	21	14	31	46	30	67	21	14	26	58	
76	111	156									

[447,]	224	219	217	232	216	223	106	81	77	434
260	424	262								
[448,]	414	371	222	470	463	362	350	339	171	447
483	73	261								
[449,]	415	82	143	339	44	94	261	34	65	288
236	446	457								
[450,]	309	98	215	409	169	340	407	210	355	466
430	308	163								
[451,]	184	86	107	304	132	218	212	84	127	459
201	441	187								
[452,]	433	394	477	442	438	484	417	414	477	215
153	473	485								
[453,]	427	327	470	478	460	488	443	418	486	167
221	445	477								
[454,]	248	210	117	372	355	242	274	250	146	355
178	376	180								
[455,]	428	369	335	408	392	323	354	327	261	157
192	106	127								
[456,]	280	227	296	352	316	352	302	259	304	222
311	177	305								
[457,]	340	378	311	414	454	392	218	261	162	262
148	261	130								
[458,]	385	360	218	424	433	301	398	406	280	433
396	264	172								
[459,]	426	244	209	449	332	285	319	148	114	294
255	309	290								
[460,]	323	332	355	283	292	293	181	175	172	403
337	433	414								
[461,]	335	226	244	265	141	173	251	166	164	341
478	37	206								
[462,]	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
499	498	500								
[463,]	158	330	356	38	108	131	52	115	118	126
313	213	429								
[464,]	353	344	178	166	131	61	95	67	33	148
99	65	36								
[465,]	316	228	316	488	486	486	451	435	459	392
166	402	142								
[466,]	374	163	376	359	134	358	308	119	305	252
196	85	49								
[467,]	322	44	154	423	63	300	468	213	426	413
168	322	55								
[468,]	306	70	130	405	116	272	381	125	244	398
134	276	44								
[469,]	303	480	435	54	310	125	39	172	55	151
180	243	301								
[470,]	192	62	88	341	117	209	341	150	225	387
450	200	353								
[471,]	117	297	224	35	98	79	47	110	72	127
434	131	456								
[472,]	462	379	297	360	227	139	416	352	251	184

223	151	176									
[473,]	403	387	414	365	378	367	221	205	208	234	
340	281	386									
[474,]	269	161	153	394	302	309	440	412	414	390	
198	395	174									
[475,]	76	372	451	11	34	68	16	58	121	155	
246	389	449									
[476,]	440	429	437	188	151	152	459	465	463	202	
283	284	366									
[477,]	220	453	486	155	416	470	76	271	402	183	
123	157	89									
[478,]	344	168	304	257	77	193	283	123	236	408	
475	275	447									
[479,]	54	56	279	131	101	407	115	94	378	130	
193	143	228									
[480,]	65	134	16	69	124	16	89	142	19	380	
381	248	246									
[481,]	88	262	207	68	226	186	35	82	60	409	
465	337	454									
[482,]	381	286	320	420	376	380	309	218	241	472	
458	231	184									
[483,]	16	35	30	26	37	42	10	12	10	133	
37	123	16									
[484,]	479	455	484	220	159	298	329	307	396	365	
409	170	248									
[485,]	261	310	461	270	311	453	17	15	39	468	
412	411	296									
[486,]	373	245	412	473	445	476	216	117	250	469	
367	431	284									
[487,]	407	243	275	430	318	330	448	396	410	457	
242	346	68									
[488,]	144	214	314	85	130	225	74	101	152	256	
155	291	164									
[489,]	417	362	306	108	68	52	188	132	78	112	
312	174	423									
[490,]	328	218	368	337	221	361	174	83	179	218	
231	195	204									
[491,]	386	303	225	308	208	158	379	334	262	439	
440	390	413									
[492,]	59	29	14	225	82	47	56	20	12	295	
335	454	482									
[493,]	352	405	404	105	136	130	244	333	295	245	
485	45	407									
[494,]	275	320	294	333	383	336	170	186	149	196	
406	154	406									
[495,]	482	488	472	318	427	316	311	408	315	261	
230	218	189									
[496,]	400	200	252	441	317	347	243	90	117	342	
109	365	92									
[497,]	477	494	491	327	477	447	255	451	413	251	
320	260	345									

```

[498,] 359 233 366 363 246 364 278 180 294 481
449 162 72
[499,] 44 50 61 32 29 54 58 45 62 77
160 27 42
[500,] 276 241 260 332 306 314 207 171 174 247
106 313 112

```

```
$Orirank$`class1` > class 2`
```

```

      [,1] [,2] [,3] [,4] [,5] [,6] [,7] [,8] [,9] [,10]
[,11] [,12] [,13]
[1,] 119 442 117 147 449 118 143 445 124 99
265 82 214
[2,] 292 306 261 143 156 125 364 375 332 226
366 171 307
[3,] 479 157 108 493 374 267 454 66 44 352
44 433 71
[4,] 396 391 291 424 431 347 78 83 45 70
29 249 50
[5,] 356 209 166 209 66 59 395 237 178 351
221 268 130
[6,] 337 395 319 401 446 410 206 300 215 400
485 299 479
[7,] 353 460 348 73 249 79 76 271 90 399
116 267 30
[8,] 311 112 300 223 46 222 396 183 388 233
206 187 146
[9,] 160 428 413 22 181 202 28 232 259 277
383 220 357
[10,] 257 56 141 108 14 48 312 85 179 289
176 183 85
[11,] 168 316 305 159 330 301 225 380 378 236
389 170 341
[12,] 405 37 63 485 279 258 436 62 72 77
9 441 42
[13,] 468 430 442 304 142 232 435 353 415 473
320 150 9
[14,] 37 103 66 230 349 214 184 291 181 272
266 354 370
[15,] 241 373 290 64 188 114 243 396 307 301
95 173 35
[16,] 135 330 251 133 347 217 45 206 118 336
405 211 331
[17,] 472 425 436 399 253 323 404 223 306 166
330 131 272
[18,] 79 196 178 246 382 344 86 215 193 234
307 140 167
[19,] 99 289 272 232 415 396 128 327 321 259
174 38 14
[20,] 432 381 95 423 391 77 468 451 191 164

```

51	358	121									
[21,]	487	429	266	483	429	252	463	317	113	451	
49	458	39									
[22,]	307	406	226	343	437	263	425	460	376	151	
175	385	437									
[23,]	437	372	136	436	395	127	453	418	174	191	
38	421	142									
[24,]	473	258	115	448	151	53	469	250	96	208	
144	224	141									
[25,]	287	294	139	262	286	112	397	401	241	24	
19	438	296									
[26,]	452	476	379	447	485	393	218	378	102	408	
244	411	235									
[27,]	300	257	338	184	145	249	406	374	428	392	
387	62	38									
[28,]	453	302	51	464	398	68	480	436	132	185	
30	351	27									
[29,]	274	48	24	429	203	78	467	355	176	161	
58	426	290									
[30,]	448	473	455	469	488	482	285	402	359	139	
249	420	466									
[31,]	121	287	212	54	161	110	144	319	234	273	
391	141	268									
[32,]	362	350	187	244	226	84	107	111	39	395	
153	465	440									
[33,]	340	398	335	95	144	99	154	233	166	483	
412	459	385									
[34,]	304	229	324	149	81	173	74	56	119	238	
86	396	228									
[35,]	323	451	347	124	348	152	175	385	227	294	
282	261	234									
[36,]	177	412	256	35	229	81	170	419	266	452	
235	445	179									
[37,]	330	334	134	151	154	42	132	168	41	323	
10	493	353									
[38,]	235	118	20	296	149	27	343	199	23	466	
32	486	215									
[39,]	426	101	25	450	155	35	112	9	5	150	
7	496	458									
[40,]	421	73	54	459	166	91	316	21	10	384	
14	489	254									
[41,]	183	467	478	188	473	483	52	421	460	343	
248	15	6									
[42,]	146	120	48	360	353	144	101	90	30	190	
195	257	269									
[43,]	459	477	460	395	460	441	273	390	333	302	
216	331	261									
[44,]	227	12	6	473	244	86	472	209	80	133	
53	485	491									
[45,]	430	408	376	425	416	380	460	442	434	338	
376	230	262									

[46,]	450	254	420	161	16	129	158	24	139	269
257	273	275								
[47,]	260	464	399	225	456	413	357	468	452	230
287	81	76								
[48,]	114	219	382	11	21	102	136	248	421	372
372	328	334								
[49,]	186	441	444	55	359	388	55	364	414	345
262	196	107								
[50,]	248	365	332	417	470	458	254	384	361	444
315	318	59								
[51,]	377	457	380	452	486	461	399	452	403	31
87	145	330								
[52,]	45	230	241	164	396	372	65	295	284	288
158	366	270								
[53,]	299	148	165	238	90	116	401	257	268	154
368	155	386								
[54,]	136	51	179	292	116	308	176	71	222	180
173	400	428								
[55,]	279	341	423	250	354	442	262	344	438	426
371	295	154								
[56,]	351	217	415	127	37	255	111	49	261	417
156	404	118								
[57,]	325	226	421	229	124	399	349	238	445	156
348	100	258								
[58,]	412	310	370	398	311	364	44	20	50	457
458	106	74								
[59,]	475	30	26	488	80	46	492	212	107	138
6	488	377								
[60,]	162	385	195	167	406	183	309	450	342	449
454	380	406								
[61,]	293	339	340	253	336	316	153	224	229	342
243	336	224								
[62,]	407	283	278	384	227	225	373	191	198	335
157	414	313								
[63,]	237	304	34	111	174	17	428	453	108	293
311	276	303								
[64,]	320	305	32	97	83	6	474	476	219	397
435	304	391								
[65,]	140	238	75	236	355	109	433	458	347	440
322	406	177								
[66,]	194	323	132	98	221	65	141	298	98	480
492	86	288								
[67,]	90	271	191	66	214	137	386	455	431	390
273	376	243								
[68,]	404	213	150	137	22	24	426	234	157	456
365	443	333								
[69,]	202	394	146	33	157	32	403	465	343	469
460	468	484								
[70,]	380	66	87	385	48	75	354	43	53	265
25	471	191								
[71,]	358	320	317	350	328	314	247	194	201	312

168	370	246									
[72,]	411	265	318	328	128	206	130	38	78	380	
27	483	350									
[73,]	147	404	378	32	238	204	36	242	228	494	
444	477	393									
[74,]	322	234	401	332	269	438	264	177	389	421	
285	258	64									
[75,]	243	449	389	42	291	163	69	357	255	438	
286	428	208									
[76,]	297	338	355	214	292	293	278	330	354	244	
309	217	264									
[77,]	419	333	457	142	45	290	110	55	280	237	
346	369	447									
[78,]	89	285	9	31	131	5	377	456	62	415	
415	355	349									
[79,]	206	233	13	75	82	4	429	437	61	275	
291	316	346									
[80,]	427	221	39	255	39	15	465	340	70	280	
292	371	404									
[81,]	184	369	27	39	168	8	431	474	134	465	
414	455	417									
[82,]	420	314	64	269	102	18	328	169	16	439	
65	476	232									
[83,]	414	62	105	368	27	51	178	11	12	431	
150	457	237									
[84,]	256	324	156	24	34	20	340	400	216	450	
263	447	250									
[85,]	102	325	55	12	52	10	305	444	137	455	
170	473	355									
[86,]	118	184	57	104	138	34	174	246	67	460	
234	461	305									
[87,]	174	121	204	165	97	181	92	77	141	398	
194	416	256									
[88,]	349	263	237	154	64	67	319	210	169	385	
132	435	230									
[89,]	444	413	397	88	33	55	12	7	6	241	
208	322	299									
[90,]	410	461	325	10	19	16	32	81	19	470	
498	1	444									
[91,]	289	465	479	19	139	307	19	181	345	365	
491	11	289									
[92,]	378	109	116	437	196	182	321	57	63	401	
123	448	265									
[93,]	216	311	303	79	152	153	68	172	163	468	
375	450	318									
[94,]	126	376	281	206	436	355	119	391	296	484	
490	13	20									
[95,]	301	259	80	311	287	70	152	133	27	482	
254	481	408									
[96,]	193	421	235	56	306	85	33	211	56	477	
305	462	277									

[97,]	454	299	88	364	108	29	398	150	28	481
62	482	199								
[98,]	409	359	350	329	272	238	186	126	120	359
85	451	308								
[99,]	348	386	371	30	43	57	23	36	43	475
22	498	392								
[100,]	429	348	262	427	376	257	421	322	214	144
57	408	279								
[101,]	261	397	270	196	381	209	231	389	252	270
284	228	216								
[102,]	382	379	344	261	260	190	115	125	100	489
21	495	66								
[103,]	477	249	231	468	240	188	375	42	35	478
79	475	97								
[104,]	233	375	70	146	329	33	376	446	135	435
260	383	120								
[105,]	441	445	473	37	31	145	51	61	200	361
321	387	367								
[106,]	355	248	245	383	298	260	293	175	154	222
273	213	246								
[107,]	336	228	153	297	177	101	134	74	49	423
211	436	251								
[108,]	342	171	96	207	51	37	80	27	11	472
5	499	159								
[109,]	400	292	185	361	230	130	344	180	97	297
185	361	300								
[110,]	456	90	45	467	126	60	446	63	26	100
23	460	298								
[111,]	461	198	79	478	322	131	412	69	21	91
16	478	388								
[112,]	219	382	31	51	186	11	444	480	152	363
417	194	282								
[113,]	361	252	215	285	136	119	368	225	177	231
273	227	246								
[114,]	244	284	247	211	271	203	224	279	230	220
273	212	246								
[115,]	488	125	424	481	67	424	451	26	291	26
1	497	328								
[116,]	478	296	186	455	206	108	414	80	40	61
18	470	380								
[117,]	389	322	224	359	307	156	388	309	183	332
180	381	280								
[118,]	282	301	180	112	121	64	70	105	51	442
37	484	339								
[119,]	238	300	83	156	223	43	171	260	55	462
160	467	236								
[120,]	196	358	89	99	281	41	105	305	52	330
190	374	285								
[121,]	58	262	12	14	61	3	423	475	145	476
475	372	401								
[122,]	252	384	21	100	259	9	478	491	272	446

430	399	364									
[123,]	124	256	366	115	243	368	14	39	103	487	
440	418	143									
[124,]	286	268	287	227	220	241	150	152	172	497	
35	492	7									
[125,]	390	361	183	339	323	122	213	182	59	498	
12	500	8									
[126,]	306	207	162	345	277	187	155	91	73	382	
113	419	162									
[127,]	247	153	373	294	189	421	342	235	437	463	
299	377	62									
[128,]	398	326	255	379	313	201	389	296	203	292	
406	440	481									
[129,]	443	454	365	470	475	450	456	457	411	409	
465	415	476									
[130,]	217	332	374	152	297	336	180	329	379	157	
209	199	263									
[131,]	350	426	448	362	439	463	391	435	463	218	
280	332	390									
[132,]	231	307	254	34	65	52	236	332	258	349	
357	344	360									
[133,]	258	349	363	205	340	349	326	410	425	310	
397	337	425									
[134,]	416	481	467	203	453	398	359	470	453	430	
88	310	18									
[135,]	372	388	302	303	327	205	303	318	210	337	
407	215	335									
[136,]	67	88	98	192	200	192	336	337	336	377	
354	59	28									
[137,]	366	247	336	421	368	414	405	288	373	224	
222	205	181									
[138,]	66	38	47	25	11	19	484	478	472	496	
486	397	155									
[139,]	321	374	469	334	412	479	400	431	481	479	
408	177	22									
[140,]	364	345	430	241	219	375	367	331	440	471	
452	147	53									
[141,]	462	482	487	409	476	484	450	484	490	474	
471	413	442									
[142,]	222	46	209	153	25	136	235	59	226	56	
71	231	218									
[143,]	208	108	109	321	202	185	362	226	213	119	
232	357	453									
[144,]	263	253	326	276	283	348	210	222	308	261	
308	254	301									
[145,]	133	242	157	226	361	221	382	430	371	72	
233	240	431									
[146,]	109	158	168	68	78	97	95	153	151	97	
384	25	151									
[147,]	463	85	59	489	288	154	473	118	66	90	
8	479	197									

[148,]	363	267	259	397	326	298	381	254	244	357
294	347	278								
[149,]	394	472	357	163	397	123	379	463	324	459
181	474	356								
[150,]	215	295	362	140	224	317	48	110	195	488
398	446	116								
[151,]	44	53	68	17	13	25	121	135	127	373
411	17	13								
[152,]	494	485	440	492	465	277	494	482	409	461
483	391	464								
[153,]	150	343	396	116	335	392	99	323	404	69
117	69	101								
[154,]	332	216	210	394	339	302	432	372	364	116
48	394	257								
[155,]	46	36	22	354	338	146	266	219	84	246
296	112	114								
[156,]	417	423	450	416	428	460	42	52	129	255
186	174	105								
[157,]	180	298	417	47	107	310	16	50	180	354
385	37	25								
[158,]	369	329	201	392	387	223	84	70	31	287
129	350	175								
[159,]	451	414	339	453	440	379	455	423	369	228
477	110	461								
[160,]	155	390	342	243	441	416	129	386	346	393
468	73	283								
[161,]	264	235	265	286	264	280	260	227	262	219
273	209	246								
[162,]	70	102	152	166	173	229	103	142	188	47
386	65	424								
[163,]	11	137	8	217	454	111	182	441	94	320
443	375	469								
[164,]	280	260	252	126	101	107	188	188	175	158
227	178	233								
[165,]	374	277	308	377	284	309	302	173	217	216
236	272	291								
[166,]	254	165	161	356	304	271	374	286	269	129
142	195	204								
[167,]	207	303	333	87	159	197	177	304	341	227
316	94	119								
[168,]	137	64	200	212	86	268	295	162	348	248
218	242	183								
[169,]	76	110	171	158	160	235	221	249	326	212
250	102	103								
[170,]	41	97	97	298	380	341	275	347	328	247
134	298	164								
[171,]	298	274	234	446	452	437	172	164	125	74
59	232	144								
[172,]	259	208	310	224	176	295	335	280	381	167
392	79	260								
[173,]	100	49	232	355	266	439	167	87	299	328

212	301	172									
[174,]	368	280	273	251	122	139	223	124	133	325	
399	107	163									
[175,]	3	8	23	9	26	71	4	8	14	22	
100	6	12									
[176,]	123	270	138	5	8	13	8	23	9	34	
94	179	368									
[177,]	313	353	288	221	301	196	114	184	122	169	
114	221	145									
[178,]	433	371	475	432	392	480	438	377	477	152	
40	466	439									
[179,]	122	18	71	279	42	135	126	19	68	58	
204	35	89									
[180,]	151	188	173	90	100	98	59	99	89	367	
450	239	414									
[181,]	106	360	368	44	256	269	20	155	171	394	
455	45	108									
[182,]	440	489	476	289	481	440	489	496	492	388	
63	431	86									
[183,]	43	202	131	144	362	250	157	368	283	432	
377	412	326									
[184,]	422	424	295	402	409	256	409	395	242	436	
314	410	186									
[185,]	144	152	130	210	204	158	137	151	116	48	
102	297	413									
[186,]	305	309	159	295	320	133	47	67	22	274	
122	274	112									
[187,]	401	328	403	315	210	337	238	144	271	281	
223	401	403									
[188,]	125	144	73	145	129	69	60	84	37	314	
345	74	60									
[189,]	105	342	167	89	331	126	113	366	168	383	
445	225	376									
[190,]	49	67	78	109	104	113	46	65	71	15	
76	10	32									
[191,]	271	200	277	222	148	245	179	131	208	262	
183	70	31									
[192,]	211	145	306	254	172	354	201	148	335	76	
159	68	129									
[193,]	210	58	174	245	62	191	189	58	161	225	
409	24	57									
[194,]	9	24	60	26	54	96	30	82	111	39	
20	113	10									
[195,]	387	417	361	76	84	76	410	424	392	174	
269	41	48									
[196,]	212	50	126	411	245	338	308	101	187	143	
277	133	266									
[197,]	223	344	398	195	366	415	252	379	433	348	
353	88	65									
[198,]	18	47	17	62	98	28	62	129	25	78	
303	101	354									

[199,]	17	35	36	290	346	227	192	247	162	25
268	91	434								
[200,]	213	39	92	272	49	115	383	146	212	235
184	158	100								
[201,]	167	222	299	105	135	226	127	197	286	101
342	78	302								
[202,]	391	255	307	387	254	303	325	157	209	322
161	339	165								
[203,]	439	199	315	463	325	412	457	244	375	381
329	325	207								
[204,]	242	243	222	173	175	148	229	239	205	321
310	382	394								
[205,]	381	402	434	235	278	362	290	316	405	278
264	47	29								
[206,]	326	84	121	435	234	273	447	252	300	387
147	432	238								
[207,]	318	431	359	119	299	178	163	342	247	106
201	172	322								
[208,]	319	154	360	317	140	377	26	12	58	187
80	192	58								
[209,]	42	175	35	83	241	39	34	136	18	96
133	34	33								
[210,]	386	194	164	474	434	408	461	363	325	65
148	210	379								
[211,]	324	308	409	131	106	286	315	306	427	311
213	368	315								
[212,]	476	478	468	491	492	488	486	489	486	413
478	456	493								
[213,]	156	286	388	91	194	340	159	301	416	193
340	330	432								
[214,]	415	411	322	442	445	389	448	438	397	140
246	312	422								
[215,]	129	114	188	172	112	207	193	163	248	73
128	144	225								
[216,]	229	189	175	400	401	365	98	92	85	51
259	138	410								
[217,]	236	225	112	393	418	276	209	218	92	8
17	162	90								
[218,]	338	204	184	335	198	169	317	174	150	108
54	422	369								
[219,]	496	498	497	498	499	497	499	498	498	303
319	388	420								
[220,]	204	106	104	242	113	120	196	104	93	104
326	146	387								
[221,]	154	151	197	178	162	213	214	217	270	300
356	222	286								
[222,]	284	214	208	365	341	304	240	179	167	27
78	114	221								
[223,]	245	43	72	373	117	140	288	68	82	21
34	247	202								
[224,]	250	163	323	247	153	343	161	102	274	64

215	153	382									
[225,]	333	317	233	194	193	104	259	251	147	376	
197	389	220									
[226,]	393	261	263	183	50	72	198	75	83	290	
169	204	92									
[227,]	72	312	422	38	228	395	79	341	448	89	
82	121	91									
[228,]	96	211	135	234	378	262	282	387	301	123	
304	97	249									
[229,]	365	363	402	331	358	397	352	338	401	326	
151	307	124									
[230,]	38	186	177	202	405	374	212	403	391	420	
461	390	460									
[231,]	130	166	267	231	276	360	233	261	368	179	
325	186	316									
[232,]	112	147	114	346	389	312	332	348	288	260	
202	251	178									
[233,]	334	203	311	63	23	74	248	120	238	198	
404	93	311									
[234,]	71	44	62	177	95	92	194	132	109	188	
167	373	383									
[235,]	69	210	286	101	257	320	63	221	298	304	
91	324	93									
[236,]	2	2	2	4	2	2	6	4	4	3	
36	8	161									
[237,]	158	91	7	358	295	26	356	245	13	118	
46	294	102									
[238,]	373	266	238	440	402	350	408	297	245	107	
333	109	347									
[239,]	30	133	40	43	130	38	93	273	81	115	
439	29	293									
[240,]	312	410	181	327	430	189	327	417	182	316	
341	198	185									
[241,]	483	492	488	476	495	491	449	488	480	441	
472	437	480									
[242,]	265	80	206	375	164	328	351	128	279	52	
104	283	399									
[243,]	345	415	419	414	458	465	443	464	474	453	
482	480	497									
[244,]	295	232	213	352	319	275	329	262	232	60	
135	253	400									
[245,]	203	368	343	106	294	244	138	336	305	298	
442	168	405									
[246,]	344	377	352	413	444	432	393	415	395	258	
302	191	198									
[247,]	60	29	19	461	451	352	280	176	69	186	
166	262	213									
[248,]	341	331	477	60	53	403	424	427	488	271	
230	237	176									
[249,]	134	72	86	325	231	220	269	158	156	204	
367	30	51									

[250,]	63	42	194	67	35	175	124	88	292	41
93	288	416								
[251,]	10	68	145	20	111	216	49	277	370	340
487	22	304								
[252,]	266	366	334	307	420	373	208	350	311	112
279	46	110								
[253,]	139	115	264	220	158	331	418	383	455	333
191	345	192								
[254,]	262	389	383	278	411	406	256	393	396	419
251	315	80								
[255,]	55	82	90	93	94	103	82	112	110	177
380	125	340								
[256,]	93	150	76	357	414	282	304	358	211	327
410	326	427								
[257,]	270	362	301	189	334	246	307	404	358	168
137	365	365								
[258,]	294	237	438	380	363	469	123	100	386	427
323	384	189								
[259,]	438	422	446	376	357	426	251	193	320	369
281	216	99								
[260,]	428	474	453	370	463	444	140	345	264	199
267	159	193								
[261,]	331	70	385	53	7	121	416	145	449	434
351	405	241								
[262,]	48	437	405	187	477	474	96	461	459	331
432	39	70								
[263,]	434	456	464	363	410	453	268	310	410	341
334	260	210								
[264,]	97	127	128	150	150	143	258	274	254	200
420	197	441								
[265,]	164	34	74	330	119	166	306	106	144	57
64	452	468								
[266,]	64	104	49	314	373	177	54	97	36	306
434	151	362								
[267,]	251	471	196	299	479	236	392	486	350	493
494	439	472								
[268,]	189	177	239	201	187	239	265	243	302	253
124	340	180								
[269,]	82	65	297	155	91	367	203	160	420	95
61	290	168								
[270,]	465	484	481	306	450	423	191	408	363	378
177	248	61								
[271,]	383	435	309	337	413	254	299	367	202	364
429	84	138								
[272,]	200	272	375	81	115	266	199	289	406	356
479	117	445								
[273,]	445	275	439	408	178	429	402	147	408	124
138	279	336								
[274,]	431	356	314	405	343	274	407	303	246	19
363	115	467								
[275,]	187	205	225	270	300	289	255	275	281	142

441	90	435									
[276,]	499	496	499	499	496	499	496	495	496	464	
447	490	496									
[277,]	165	278	101	110	201	58	298	394	184	113	
256	49	106									
[278,]	23	122	77	77	213	128	53	204	115	370	
214	234	69									
[279,]	190	192	329	263	270	390	88	108	253	329	
388	250	344									
[280,]	239	128	244	233	110	228	149	76	159	45	
255	83	352									
[281,]	467	486	474	449	490	473	361	467	417	75	
467	4	73									
[282,]	466	315	321	477	408	409	452	281	297	71	
362	302	473									
[283,]	88	17	29	378	143	138	372	130	121	16	
45	156	306									
[284,]	278	181	129	389	337	231	415	352	273	214	
131	243	133									
[285,]	296	436	416	45	165	176	202	398	407	448	
252	327	46									
[286,]	481	444	381	494	482	466	491	481	467	403	
476	236	454									
[287,]	27	55	15	199	262	49	287	333	86	257	
261	364	398									
[288,]	6	6	37	52	20	186	56	32	233	122	
74	409	384									
[289,]	113	134	144	176	179	172	301	313	303	181	
165	306	292									
[290,]	152	352	155	50	212	54	94	324	104	46	
97	75	131									
[291,]	423	297	459	216	58	356	437	321	471	418	
433	206	212									
[292,]	54	357	275	82	407	313	39	326	231	285	
361	182	259									
[293,]	486	480	410	475	483	404	495	493	478	492	
497	226	487									
[294,]	182	172	242	208	192	261	41	46	79	196	
231	87	77									
[295,]	302	273	298	300	282	299	291	264	304	175	
219	229	276									
[296,]	490	494	494	482	494	495	490	494	497	405	
489	292	486									
[297,]	224	251	411	65	76	306	417	429	476	412	
481	53	209									
[298,]	175	201	228	266	309	300	320	346	360	148	
107	379	378									
[299,]	471	479	471	458	484	475	462	472	469	355	
480	263	475									
[300,]	21	185	351	175	423	464	57	311	432	433	
426	149	84									

[301,]	315	130	221	336	141	233	232	78	142	17
83	42	134								
[302,]	36	10	28	396	171	272	38	10	17	66
67	356	373								
[303,]	234	264	364	57	70	179	147	189	334	125
108	118	83								
[304,]	474	400	432	281	59	142	338	103	194	308
247	201	140								
[305,]	268	419	456	125	324	435	75	263	413	407
446	116	158								
[306,]	170	195	111	78	79	47	227	255	143	137
146	148	153								
[307,]	291	170	274	326	208	324	353	214	338	43
66	317	363								
[308,]	171	340	149	61	218	62	139	339	126	53
52	165	109								
[309,]	246	446	483	40	267	459	168	426	483	268
298	128	128								
[310,]	314	206	125	372	305	160	314	202	106	147
101	167	104								
[311,]	375	420	404	341	404	401	355	382	399	428
438	386	421								
[312,]	408	336	392	248	132	234	483	469	479	105
69	127	63								
[313,]	276	291	356	271	302	358	246	270	357	263
245	269	252								
[314,]	131	20	429	280	40	472	67	14	419	183
152	329	309								
[315,]	81	54	67	267	167	155	300	213	192	81
207	207	397								
[316,]	57	212	124	113	315	159	90	294	165	313
182	362	271								
[317,]	56	176	140	103	236	170	13	44	34	242
300	123	139								
[318,]	310	387	158	344	426	171	324	399	149	94
360	60	284								
[319,]	352	245	230	347	248	199	378	256	224	59
317	44	203								
[320,]	290	223	69	121	69	23	297	228	60	284
189	185	98								
[321,]	103	380	349	18	127	117	37	265	223	195
278	136	173								
[322,]	308	407	337	162	312	200	215	359	275	358
318	434	438								
[323,]	33	83	279	84	120	366	81	159	385	282
238	214	166								
[324,]	269	443	330	219	432	305	216	428	316	264
203	291	227								
[325,]	367	347	426	86	60	180	360	325	430	178
242	108	132								
[326,]	346	119	394	313	72	383	239	53	340	360

403	152	190									
[327,]	273	14	102	430	71	285	419	60	236	153	
31	429	147									
[328,]	392	179	269	407	197	297	370	116	204	141	
469	137	477									
[329,]	13	7	4	85	18	12	7	5	2	7	
33	50	96									
[330,]	484	351	354	462	263	265	482	373	382	176	
374	398	474									
[331,]	370	123	217	348	77	164	109	16	48	379	
163	193	34									
[332,]	458	401	391	386	261	253	441	361	367	221	
276	314	361									
[333,]	399	434	470	412	443	478	263	314	443	117	
103	54	37									
[334,]	493	488	496	406	399	490	477	471	494	447	
448	122	82									
[335,]	197	113	202	197	96	198	156	86	170	266	
126	363	222									
[336,]	379	439	390	418	462	446	322	397	344	445	
369	293	81									
[337,]	29	63	10	186	258	44	253	307	64	49	
379	266	478									
[338,]	176	282	284	117	217	224	117	236	249	50	
119	96	187									
[339,]	153	180	282	102	103	208	61	95	185	386	
198	338	127									
[340,]	371	470	437	381	474	452	43	240	160	307	
224	77	36									
[341,]	205	227	253	308	352	339	274	299	312	131	
98	244	184									
[342,]	16	167	189	16	89	124	18	127	148	36	
171	48	188									
[343,]	272	392	387	390	461	457	261	392	402	458	
437	287	157									
[344,]	498	500	500	497	500	500	498	500	500	495	
496	453	492									
[345,]	77	111	91	218	252	184	165	198	153	411	
401	56	26									
[346,]	228	355	418	136	290	387	108	272	390	163	
396	80	274									
[347,]	15	11	14	148	36	45	118	45	47	145	
338	63	160									
[348,]	354	383	346	420	447	428	420	432	418	130	
373	135	396									
[349,]	47	22	18	190	73	40	142	64	29	82	
453	21	332									
[350,]	50	182	110	58	182	100	271	412	331	251	
200	275	206									
[351,]	132	140	127	371	390	342	369	354	318	243	
488	208	489									

[352,]	110	21	11	277	44	30	311	73	32	429
312	454	411								
[353,]	172	440	358	69	383	248	385	479	461	366
349	176	117								
[354,]	497	493	493	495	487	485	493	487	485	396
43	463	171								
[355,]	40	61	44	92	93	56	237	258	158	85
145	256	372								
[356,]	12	3	3	454	222	147	289	30	20	79
140	238	358								
[357,]	491	491	482	465	478	448	476	483	458	276
382	311	419								
[358,]	159	132	107	484	480	470	479	477	470	23
462	9	426								
[359,]	35	25	41	23	10	22	71	51	57	295
162	359	242								
[360,]	117	224	220	138	246	218	160	282	263	339
427	349	451								
[361,]	403	69	46	456	180	94	466	220	114	40
84	320	415								
[362,]	482	483	489	490	493	494	488	492	493	486
463	494	495								
[363,]	328	319	249	391	417	332	281	284	190	217
127	449	448								
[364,]	402	378	316	438	435	385	427	411	366	128
473	296	494								
[365,]	495	495	490	480	489	447	481	490	451	499
499	28	490								
[366,]	449	405	304	444	422	311	442	388	289	425
470	423	482								
[367,]	83	124	377	49	57	327	228	269	456	201
178	289	281								
[368,]	376	364	431	249	239	371	169	170	319	391
105	184	17								
[369,]	455	354	461	460	421	476	434	302	457	110
50	342	170								
[370,]	255	367	328	349	442	427	422	462	454	135
459	130	470								
[371,]	145	75	205	342	242	381	183	98	243	194
423	352	471								
[372,]	92	246	369	382	459	477	11	35	101	102
89	58	40								
[373,]	218	321	276	200	344	278	234	356	314	454
418	430	375								
[374,]	470	450	408	479	468	455	445	406	377	414
425	472	488								
[375,]	397	290	407	59	17	90	244	107	295	467
289	55	5								
[376,]	5	27	137	2	5	31	2	3	7	6
24	5	3								
[377,]	7	4	5	15	4	7	5	2	3	4

15	103	226									
[378,]	220	94	38	374	250	88	272	122	46	14	
187	33	351									
[379,]	209	116	236	323	225	345	430	365	435	126	
335	277	449									
[380,]	388	399	433	441	455	471	387	381	442	120	
239	264	402									
[381,]	31	41	106	28	30	82	27	33	77	9	
42	19	43									
[382,]	329	293	372	252	216	325	350	312	400	197	
343	132	229									
[383,]	199	40	296	182	32	292	310	96	394	173	
172	129	113									
[384,]	283	155	243	305	163	247	346	205	285	84	
229	219	407									
[385,]	26	131	65	120	303	134	100	287	138	170	
75	202	67									
[386,]	111	156	163	185	232	212	334	360	353	362	
355	285	267									
[387,]	25	105	133	118	265	281	102	253	290	210	
313	245	342									
[388,]	385	215	148	426	317	195	390	195	117	80	
109	393	450									
[389,]	316	337	341	319	379	357	250	290	294	202	
419	85	324									
[390,]	169	76	154	288	133	237	230	113	199	10	
39	57	152									
[391,]	191	33	100	366	134	243	116	29	65	30	
41	403	423									
[392,]	275	438	451	134	372	422	200	413	450	87	
421	14	149									
[393,]	435	318	428	428	333	449	464	409	465	422	
451	407	455									
[394,]	214	117	214	320	215	322	211	119	220	189	
130	284	194									
[395,]	395	448	452	179	296	346	131	230	313	149	
121	119	79									
[396,]	4	5	16	3	3	14	3	6	8	12	
2	99	2									
[397,]	267	279	441	170	170	430	91	123	393	315	
381	233	319									
[398,]	285	159	198	353	247	279	330	196	237	209	
143	424	418									
[399,]	230	190	345	318	308	425	219	190	365	182	
352	175	348									
[400,]	8	143	312	8	137	333	25	335	447	404	
422	32	23									
[401,]	249	239	176	302	318	215	341	334	256	165	
394	313	456									
[402,]	327	173	142	433	364	294	331	166	130	134	
115	154	126									

[403,]	188	15	81	404	92	270	296	37	131	324
196	442	436								
[404,]	492	497	495	496	498	498	497	499	499	485
484	281	294								
[405,]	469	458	447	410	388	394	475	466	473	55
297	40	169								
[406,]	104	191	465	70	105	462	22	47	422	203
4	469	21								
[407,]	28	9	169	27	6	132	77	18	278	5
11	20	11								
[408,]	78	79	43	259	235	106	164	156	74	223
364	180	320								
[409,]	14	32	229	135	207	436	35	79	317	252
431	64	219								
[410,]	65	95	271	312	351	451	85	117	323	172
424	282	462								
[411,]	62	19	118	284	88	319	267	89	309	229
400	200	395								
[412,]	418	462	367	351	427	287	363	414	277	309
205	334	231								
[413,]	107	146	219	322	375	405	270	293	362	347
139	223	55								
[414,]	446	459	400	434	448	402	411	416	356	402
295	163	49								
[415,]	80	99	211	237	251	363	122	141	267	162
154	160	137								
[416,]	108	139	93	213	237	141	173	207	128	155
92	203	123								
[417,]	163	241	82	180	289	80	380	420	225	127
228	72	125								
[418,]	335	409	458	324	425	468	333	405	464	232
393	142	310								
[419,]	20	86	260	6	9	61	9	28	112	11
13	12	4								
[420,]	143	178	203	228	273	284	83	115	140	171
96	126	56								
[421,]	201	220	248	293	321	318	242	266	282	132
199	360	443								
[422,]	360	468	414	80	314	165	220	425	351	416
402	76	41								
[423,]	138	89	99	240	147	151	151	93	95	38
149	27	75								
[424,]	303	403	472	41	99	361	104	241	444	192
449	31	201								
[425,]	85	161	207	74	114	161	148	231	287	2
81	3	195								
[426,]	51	100	143	160	205	259	58	114	155	37
73	98	150								
[427,]	59	288	353	71	310	370	106	369	426	410
359	252	122								
[428,]	32	74	216	36	55	193	21	40	136	28

118	7	15									
[429,]	464	453	486	471	469	492	459	439	487	500	
500	444	500									
[430,]	34	16	52	94	29	73	73	34	76	13	
26	124	136									
[431,]	288	240	123	388	386	211	366	320	164	63	
332	139	430									
[432,]	347	187	268	265	87	157	313	138	218	83	
72	157	111									
[433,]	52	135	170	128	233	264	162	285	315	215	
293	143	174									
[434,]	489	487	492	486	491	493	458	473	484	491	
493	487	498									
[435,]	406	427	292	309	345	150	337	351	173	211	
120	169	68									
[436,]	500	499	498	500	497	496	500	497	495	490	
495	491	499									
[437,]	460	418	463	422	356	454	318	167	372	86	
336	66	287									
[438,]	91	26	30	264	75	63	217	72	54	319	
457	286	463									
[439,]	424	452	384	443	466	433	439	448	412	437	
328	417	223									
[440,]	339	250	293	369	316	334	365	268	310	205	
413	111	343									
[441,]	141	327	393	193	394	445	345	443	466	406	
466	427	483									
[442,]	53	98	113	168	211	210	120	186	189	296	
290	319	323									
[443,]	95	45	56	29	12	21	72	41	33	184	
337	235	366									
[444,]	181	126	119	316	268	219	339	267	235	18	
110	104	381									
[445,]	359	57	435	310	28	431	245	22	398	291	
141	343	182									
[446,]	480	455	480	487	471	487	470	434	475	443	
390	425	345									
[447,]	277	269	395	282	285	420	284	278	424	67	
77	241	239									
[448,]	87	31	151	130	38	162	279	139	330	54	
428	18	240									
[449,]	86	162	240	419	457	467	358	407	436	213	
55	265	44									
[450,]	192	92	94	403	332	291	286	161	146	35	
193	71	338									
[451,]	317	197	289	415	369	417	394	283	374	42	
60	300	314									
[452,]	68	59	84	107	63	87	24	17	24	286	
28	348	16									
[453,]	74	23	58	174	41	83	31	13	15	334	
56	280	24									

[454,]	253	129	227	291	146	251	384	259	355	146
125	323	321								
[455,]	73	93	147	132	109	174	166	178	240	344
395	309	374								
[456,]	221	149	199	274	185	242	205	149	197	279
324	190	196								
[457,]	161	87	283	123	47	240	190	109	339	239
240	353	371								
[458,]	116	77	103	141	68	95	283	200	221	68
237	105	329								
[459,]	75	52	182	257	169	353	292	216	387	207
192	246	211								
[460,]	178	218	320	169	209	326	146	208	329	98
68	164	87								
[461,]	166	236	250	275	360	335	257	328	337	160
464	23	295								
[462,]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	2	1								
[463,]	343	463	449	171	393	386	145	370	383	375
288	188	72								
[464,]	148	335	406	157	370	434	323	440	468	353
436	402	465								
[465,]	185	13	50	273	15	66	185	15	42	109
99	335	359								
[466,]	127	142	193	338	367	382	125	143	196	249
416	305	452								
[467,]	179	78	33	457	438	288	347	201	75	88
179	333	446								
[468,]	195	96	120	431	385	376	371	229	257	103
225	367	457								
[469,]	198	447	462	21	191	329	66	376	446	350
258	321	200								
[470,]	309	160	160	439	384	351	413	292	276	114
301	51	148								
[471,]	384	466	454	204	403	391	277	422	429	374
370	67	45								
[472,]	39	141	85	122	274	149	204	362	250	317
350	278	325								
[473,]	98	136	280	114	123	296	87	134	293	267
220	161	115								
[474,]	232	107	61	340	199	89	348	192	87	111
106	303	327								
[475,]	425	490	485	129	467	443	50	433	380	346
112	255	52								
[476,]	61	313	42	72	350	36	64	349	38	299
217	218	135								
[477,]	281	346	425	48	85	230	15	31	99	318
344	378	412								
[478,]	157	244	218	333	424	378	197	308	265	93
226	26	54								
[479,]	447	370	386	445	400	407	222	94	123	371

358	308	273									
[480,]	436	432	412	367	377	359	485	485	482	121	
253	120	255									
[481,]	413	433	466	239	275	419	294	315	441	92	
164	36	47									
[482,]	120	81	192	215	125	283	181	121	260	29	
270	43	317									
[483,]	485	475	491	466	464	489	471	459	491	368	
378	464	485									
[484,]	22	281	172	46	342	194	17	203	105	136	
331	92	253									
[485,]	240	231	484	191	190	486	40	48	462	33	
90	89	205									
[486,]	128	28	285	256	56	384	89	25	251	32	
70	134	217									
[487,]	94	71	53	258	183	105	226	171	91	44	
155	259	433									
[488,]	357	416	427	287	371	400	187	276	349	245	
210	346	337									
[489,]	84	393	313	139	433	369	195	449	423	389	
327	189	78									
[490,]	173	164	327	283	280	418	133	140	322	283	
306	270	297									
[491,]	115	193	122	198	293	167	276	343	239	62	
111	61	88									
[492,]	442	276	445	472	419	481	487	454	489	206	
47	166	19									
[493,]	149	396	257	96	365	168	97	371	206	256	
456	16	94									
[494,]	226	168	331	181	118	315	207	165	352	305	
347	95	95									
[495,]	19	183	190	13	74	93	29	185	186	240	
283	271	312									
[496,]	101	60	258	301	184	411	249	154	384	159	
136	392	409									
[497,]	24	174	246	7	24	50	10	54	88	250	
241	181	156									
[498,]	142	138	223	268	255	321	135	137	207	20	
339	52	429									
[499,]	457	469	443	451	472	456	440	447	439	424	
474	341	459									
[500,]	225	169	294	260	195	330	241	187	327	254	
188	395	389									

\$AveFC

	log/unlog(class1/class2)	
244901_at	0.0607139843	
244902 at	-0.0051480361	

244903_at	-0.0086843449
244904_at	0.1287719163
244905_at	0.0300767794
244906_at	-0.2176251310
244907_at	0.0537387043
244908_at	0.0400093845
244909_at	-0.0026368265
244910_s_at	0.1155983833
244911_at	-0.0274651148
244912_at	0.1479697159
244913_at	-0.0500974293
244914_at	0.0108609002
244915_s_at	0.0785838135
244916_at	-0.0078043626
244917_at	-0.0445855825
244918_at	0.0450090022
244919_at	0.1121052224
244920_s_at	0.0113574498
244921_s_at	-0.1021899725
244922_s_at	-0.0851047971
244923_s_at	-0.0022494389
244924_at	0.0207896037
244925_at	0.0957711872
244926_s_at	-0.1455818786
244927_at	0.0107999967
244928_s_at	0.0635038187
244929_at	0.0359804384
244930_at	-0.2057149008
244931_at	0.0319397742
244932_at	-0.0665997277
244933_at	-0.1533091733
244934_at	0.0517268548
244935_at	-0.0218472300
244936_at	-0.0667101204
244937_at	0.0140995430
244938_at	-0.0277072347
244939_at	0.0477460036
244940_at	0.0124279319
244941_at	0.0478858826
244942_at	0.0763293631
244943_at	-0.1193940814
244944_s_at	-0.0837578618
244945_at	-0.1241804411
244946_at	0.0295930287
244947_at	-0.0347503674
244948_at	-0.0050451732
244949_at	-0.0145135540
244950_at	-0.0953771286
244951_s_at	-0.0319425022
244952_at	0.0059484435
244953_s_at	0.0171917330

244954_s_at	0.0098688257
244955_at	-0.0941519541
244956_s_at	-0.0009686403
244957_at	-0.0036529485
244958_at	-0.0399518523
244959_s_at	-0.0024204597
244960_at	-0.1574561914
244961_at	-0.0299248914
244962_at	-0.0502971127
244963_at	0.0236130617
244964_at	-0.0578812478
244965_at	-0.0763497152
244966_at	-0.0962380955
244967_at	-0.0461031480
244968_at	-0.0751820478
244969_at	-0.2324323930
244970_at	0.0687361443
244971_at	-0.0325157582
244972_at	-0.0380073853
244973_at	-0.2147473514
244974_at	-0.0383821787
244975_at	-0.0730134016
244976_at	-0.0224665255
244977_at	-0.0565607989
244978_at	0.0016997499
244979_at	0.0544805308
244980_at	-0.0020539221
244981_at	-0.1127728106
244982_at	-0.0215016725
244983_at	0.0154618304
244984_at	-0.0424181272
244985_at	-0.0427146384
244986_at	-0.0375605529
244987_s_at	0.0076478076
244988_s_at	-0.0101423499
244989_s_at	0.0799429434
244990_s_at	-0.0902080994
244991_s_at	-0.0417898214
244992_s_at	-0.0264913507
244993_s_at	-0.0912182931
244994_at	-0.0515182789
244995_at	-0.1306558865
244996_at	-0.0851920759
244997_at	-0.0959364812
244998_at	-0.0487424695
244999_at	-0.0902928356
245000_at	-0.0158881037
245001_at	-0.0123436767
245002_at	-0.1053733907
245003_at	-0.0970200855
245004_at	-0.0297341472

245005_at	-0.0459071937
245006_at	0.0034693981
245007_at	-0.0195262590
245008_at	-0.0086465966
245009_at	-0.0121406371
245010_at	0.0735398128
245011_at	0.0260231442
245012_at	-0.0034213250
245013_at	0.0147856608
245014_at	0.0156295261
245015_at	0.0369335653
245016_at	0.0330731456
245017_at	-0.0425959128
245018_at	-0.0413305712
245019_at	-0.0557304653
245020_at	0.0296147163
245021_at	-0.0847229564
245022_at	-0.1155555529
245023_at	-0.0905138265
245024_at	-0.1221206099
245025_at	-0.1750040293
245026_at	0.0096111233
245027_at	-0.0742569939
245028_at	-0.1554150598
245029_at	-0.3056510428
245030_at	0.0094145954
245031_at	-0.1322030785
245032_at	-0.0147910332
245033_at	-0.1037621046
245034_at	-0.0830561410
245035_at	-0.0623788742
245036_at	0.0803378738
245037_at	-0.0314785866
245038_at	-0.1738697853
245039_at	-0.1427602418
245040_at	-0.1072300409
245041_at	-0.3958369579
245042_at	0.1428009441
245043_at	-0.0044857873
245044_at	-0.0181450746
245045_at	-0.0002410643
245046_at	0.1457350095
245047_at	0.0512822686
245048_at	-0.0598654454
245049_at	-0.1855143284
245050_at	-0.1125223742
245051_at	0.2139149494
245052_at	-0.4105191907
245053_at	0.0914564688
245054_at	0.0081428139
245055_at	0.1007956967

245056_at	-0.0025505449
245057_at	0.1130763229
245058_at	0.0268419062
245059_at	-0.1829986803
245060_at	-0.0843211728
245061_at	0.0080729645
245062_at	0.0848028554
245063_at	-0.0635858827
245064_at	0.0627080721
245065_at	-0.0154883616
245066_at	0.0444341266
245067_at	0.0499423605
245068_at	0.0442734956
245069_at	0.0823211879
245070_at	0.0347584179
245071_at	0.0670915527
245072_s_at	0.0145633050
245073_at	0.0168307414
245074_at	0.0218173150
245075_at	0.4761349261
245076_at	0.2439436506
245077_at	0.0617337836
245078_at	-0.1551457988
245079_at	0.2186810829
245080_at	-0.0109318678
245081_at	0.0308321542
245082_at	-0.2278713995
245083_at	-0.0704434515
245084_at	-0.1270102851
245085_at	0.0827461579
245086_at	0.0830271797
245087_at	-0.0695516848
245088_at	0.1339374452
245089_at	-0.0436410293
245090_at	0.3250685059
245091_at	0.1057675915
245092_at	0.1042753919
245093_at	0.1254639236
245094_at	0.3554623452
245095_at	0.0741425391
245096_at	0.0535873300
245097_at	-0.0099345846
245098_at	0.1758953195
245099_at	0.1080623702
245100_at	0.0957365803
245101_at	0.0697766720
245102_at	-0.0142385535
245103_at	-0.1010617930
245104_at	-0.0319081615
245105_at	0.0378294264
245106_at	-0.0542658236

245107_at	0.0252130237
245108_at	0.1301866910
245109_at	0.2502363492
245110_at	-0.0260758018
245111_at	-0.0477971987
245112_at	-0.4899842056
245113_at	-0.0435880105
245114_at	-0.1070394593
245115_at	0.1097066310
245116_at	0.0483506945
245117_at	0.2178944085
245118_at	0.0338068109
245119_at	-0.5975688011
245120_at	0.0758932641
245121_at	0.0114418434
245122_at	0.1124267406
245123_at	0.1797006590
245124_at	0.0541391206
245125_at	-0.0179298680
245126_at	0.0800151538
245127_at	0.0954679305
245128_at	0.0450788237
245129_at	-0.0415394393
245130_at	-0.1564026457
245131_s_at	0.0073495443
245132_at	0.0124470996
245133_at	0.0491138180
245134_s_at	0.0644147305
245135_at	0.0605560206
245136_at	0.6765187537
245137_at	0.1678123226
245138_at	-0.0109098980
245139_at	0.1355026753
245140_at	-0.0316875366
245141_at	-0.4734007016
245142_at	0.0459557653
245143_at	-0.4491632241
245144_at	0.0245601102
245145_at	-0.0523559165
245146_at	-0.0671554148
245147_at	0.0549762136
245148_at	-0.0578948815
245149_at	0.1205098899
245150_at	0.1135443420
245151_at	0.0436290746
245152_at	0.0519001931
245153_at	-0.0269625236
245154_at	-0.0632318986
245155_at	0.0875386847
245156_at	-0.0640244100
245157_at	-0.0280188557

245158_at	-0.0972284641
245159_at	-0.0551950106
245160_at	-0.0615293054
245161_at	-0.0479648602
245162_at	-0.0419260946
245163_at	-0.1068929652
245164_at	-0.0044317782
245165_at	0.0236159168
245166_at	0.0309163582
245167_s_at	-0.3784581928
245168_at	0.0284531861
245169_at	0.0978705568
245170_at	-0.0901059270
245171_at	-0.0441040241
245172_at	-0.0872652232
245173_at	-0.0335096881
245174_at	-0.0273894096
245175_at	-0.0171305117
245176_at	-0.8288976534
245177_at	0.1195296609
245178_at	0.0958223305
245179_at	-0.0255190157
245180_at	0.1006968991
245181_at	-0.0600874014
245182_at	-0.1240029720
245183_at	0.1923487012
245184_at	0.0268516506
245185_at	-0.0372585126
245186_at	-0.3218720144
245187_s_at	0.0414138702
245188_at	0.1569650339
245189_at	0.0374651906
245190_at	0.1612440178
245191_at	-0.1168900560
245192_at	0.0098921077
245193_at	-0.5387350437
245194_at	0.1209946865
245195_at	0.0038948457
245196_at	-0.5617274880
245197_at	-0.0887707796
245198_at	-0.0028320664
245199_at	-0.3249151271
245200_at	-0.0440853951
245201_at	0.1809911693
245202_at	0.1627207927
245203_at	0.1125876523
245204_at	-0.0033354509
245205_at	-0.0706768879
245206_at	0.1218406837
245207_at	0.0485875566
245208_at	0.1563883241

245209_at	-0.0497191635
245210_at	0.0870205431
245211_at	-0.1858123831
245212_at	0.0184328038
245213_at	-0.0220070024
245214_at	0.0387704703
245215_at	0.0736002991
245216_at	0.0263956606
245217_at	0.1240708930
245218_s_at	0.0296690922
245219_at	0.0712480560
245220_at	0.1042625640
245221_s_at	0.0771026950
245222_at	-0.1018688426
245223_at	0.0559752446
245224_at	-0.0391691773
245225_at	0.0311168953
245226_at	-0.0163365187
245227_s_at	0.0901227109
245228_at	-0.0927701559
245229_at	0.4756587321
245230_at	-0.1810109842
245231_at	0.0994575921
245232_at	-0.0823490958
245233_at	0.0234950736
245234_at	-0.3158601549
245235_at	0.0498613792
245236_at	-0.1250515970
245237_at	0.0496072176
245238_at	0.1114104546
245239_at	0.0388565581
245240_at	0.0070541655
245241_at	0.0407779292
245242_at	0.2065369242
245243_at	-0.1527057089
245244_at	-1.0093699393
245245_at	0.0801307311
245246_at	0.0020868523
245247_at	0.1998051146
245248_at	-0.0825232653
245249_at	0.1712726064
245250_at	0.0458994048
245251_at	-0.1702523667
245252_at	0.0020368564
245253_at	-0.0547475222
245254_at	-0.3500944252
245255_at	0.1124066809
245256_at	0.1735245115
245257_at	-0.2676585483
245258_at	-0.0582751592
245259_at	0.1471960770

245260_at	-0.0678801092
245261_at	0.0478509152
245262_at	-0.6684619716
245263_at	-0.0810401782
245264_at	-0.2173121888
245265_at	-0.7936350800
245266_at	-0.2664999562
245267_at	0.0238872937
245268_at	0.0391063810
245269_at	-0.0554859506
245270_at	-0.1463832827
245271_at	-0.0681702742
245272_at	0.1352567609
245273_at	-0.1392173313
245274_at	-0.3361590214
245275_at	0.1018118474
245276_at	0.6613777401
245277_at	0.5653171897
245278_at	0.1817190146
245279_at	-0.0462208734
245280_at	-0.1044829072
245281_at	0.3698630233
245282_at	-0.0115081715
245283_at	0.0897888988
245284_at	0.0226343986
245285_s_at	0.1440350957
245286_at	-0.0220968709
245287_at	0.0362093860
245288_at	-0.0113118589
245289_at	-0.0306841356
245290_at	0.2282230228
245291_at	0.1209432792
245292_at	0.0251757089
245293_at	-0.2461651543
245294_at	0.0471241192
245295_at	0.0434978049
245296_at	0.7263823065
245297_at	-0.0402966409
245298_at	-0.0340488799
245299_at	-0.0161060908
245300_at	0.1079776869
245301_at	-0.0577743665
245302_at	0.0689301592
245303_at	-0.0162011733
245304_at	-0.6698339022
245305_at	-0.0461286832
245306_at	0.1338403563
245307_at	0.4855700233
245308_at	0.0648375791
245309_at	0.0652709476
245310_at	-0.0576582192

245311_at	0.0209777599
245312_at	-0.0766115144
245313_at	0.0312662986
245314_at	-0.0789813069
245315_at	0.0840150740
245316_at	0.1108986043
245317_at	0.0904760934
245318_at	-0.1006112436
245319_at	0.5069560418
245320_at	0.1230150987
245321_at	-0.0223046185
245322_at	-0.0228528028
245323_at	0.2047315902
245324_at	0.0009066268
245325_at	0.4045412920
245326_at	0.1807282940
245327_at	-0.0271147477
245328_at	0.3244621804
245329_at	-0.9947455620
245330_at	0.3129557862
245331_at	0.0102178686
245332_at	0.1156455534
245333_at	0.0581538061
245334_at	-0.7167355668
245335_at	0.0379987054
245336_at	-1.0410664357
245337_at	-0.0296832794
245338_at	-0.0099770535
245339_at	-0.1898713805
245340_at	-0.0333548416
245341_at	-0.2428640123
245342_at	0.0304882703
245343_at	0.1344373981
245344_at	0.1090272114
245345_at	0.0131145600
245346_at	-0.2976892301
245347_at	0.0352716015
245348_at	0.1347783685
245349_at	0.0317746768
245350_at	0.1008147776
245351_at	0.0314634635
245352_at	0.2371246948
245353_at	0.2199925223
245354_at	0.0235358624
245355_at	-0.0015601645
245356_at	0.0315813134
245357_at	0.0158884910
245358_at	0.1114012663
245359_at	0.0373793898
245360_at	0.1076798348
245361_at	0.0096923316

245362_at	1.3260892889
245363_at	-0.0415943505
245364_at	-0.1790666928
245365_at	0.1480684938
245366_at	-0.0522441368
245367_at	0.0127762251
245368_at	-0.0362245963
245369_at	-0.0401370475
245370_at	0.0469456104
245371_at	-0.0416086621
245372_at	0.0111343418
245373_s_at	0.0730747346
245374_at	0.0772737668
245375_at	-0.0641785318
245376_at	0.0943008093
245377_at	-0.0089374503
245378_at	0.1094427793
245379_at	-0.0822144826
245380_at	-0.0940202694
245381_at	0.0606955876
245382_at	0.1291920236
245383_at	-0.3861555558
245384_at	0.1015399579
245385_at	0.0692050643
245386_at	0.1610039361
245387_at	0.0913168714
245388_at	-0.0611644378
245389_at	-0.0294728105
245390_at	-0.0098988065
245391_at	0.1376505420
245392_at	-0.0411127992
245393_at	0.0535267771
245394_at	0.0420952678
245395_at	0.0834419098
245396_at	-0.0044770882
245397_at	0.1556046627
245398_at	0.0907902074
245399_at	-0.2953812968
245400_at	-0.0291548083

Αναφορές

1. Schena, M., et al., Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995. 270(5235): p. 467-70.
2. Human Genome Project, http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml
3. GeneChips, <http://www.gene-chips.com/>
4. Affymetrix GeneChips, <http://www.affymetrix.com/index.affx>
5. Northern Analysis, <http://www.ambion.com/techlib/basics/northern/index.html>
6. Real Time - PCR, <http://www.ambion.com/techlib/basics/rtPCR/index.html>
7. Brown laboratory, http://cmgm.stanford.edu/pbrown/Pat_Brown_Lab_Home_Page/Home.html
8. Gray laboratory, <http://cancer.ucsf.edu/gray/public/>
9. Wigler laboratory, <http://www.cshl.edu/public/SCIENCE/wigler.html>
10. Microarrays Factsheet, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>
11. Comparative Genomic Hybridization (CGH), <http://amba.charite.de/cgh/>
12. Nuclear runoff assay, http://www.steadyhealth.com/encyclopedia/Nuclear_runoff_assay
13. Allison, D.B., et al., Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet*, 2006. 7(1): p. 55-65.
14. Kerr, M.K., Design considerations for efficient and effective microarray studies. *Biometrics*, 2003. 59(4): p. 822-8.
15. Miller, L.D., et al., Optimal gene expression analysis by microarrays. *Cancer Cell*, 2002. 2(5): p. 353-61.
16. Pan, W., J. Lin, and C.T. Le, How many replicates of arrays are required to detect gene expression changes in microarray experiments? A mixture model

approach. *Genome Biol*, 2002. 3(5): p. research0022.

17. Pavlidis, P., Q. Li, and W.S. Noble, The effect of replication on gene expression microarray experiments. *Bioinformatics*, 2003. 19(13): p. 1620-7.
18. Han, E.S., et al., Reproducibility, sources of variability, pooling, and sample size: important considerations for the design of high-density oligonucleotide array experiments. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2004. 59(4): p. 306-15.
19. Wei, C., J. Li, and R.E. Bumgarner, Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *BMC Genomics*, 2004. 5(1): p. 87.
20. Tsai, C.A., et al., Sample size for gene expression microarray experiments. *Bioinformatics*, 2005. 21(8): p. 1502-8.
21. Kendzierski, C., et al., On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(12): p. 4252-7.
22. Mary-Huard, T., et al., Biases induced by pooling samples in microarray experiments. *Bioinformatics*, 2007. 23(13): p. i313-8.
23. Agilent 2100 Bioanalyzer, <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/instruments/lab-on-a-chip/2100bioanalyzer/pages/default.aspx>
24. Schroeder, A., et al., The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 2006. 7: p. 3.
25. Van Gelder, R.N., et al., Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(5): p. 1663-7.
26. Kerr, K.F., Extended analysis of benchmark datasets for Agilent two-color microarrays. *BMC Bioinformatics*, 2007. 8: p. 371.
27. Nygaard, V. and E. Hovig, Options available for profiling small samples: a review of sample amplification technology when combined with microarray profiling. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(3): p. 996-1014.
28. PCR, <http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/pcr.html>
29. Novoradovskaya, N., et al., Universal Reference RNA as a standard for microarray experiments. *BMC Genomics*, 2004. 5(1): p. 20.
30. Illumina BeadChips, <http://www.illumina.com/>

31. GeneChip Consortia Program, http://www.affymetrix.com/partners_programs/programs/consortia.affx
32. Applied Biosystems: Human genome survey v2, <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=602388>
33. CodeLink Human Whole Genome Bioarray
34. Nimblegen, <http://www.nimblegen.com/>
35. Phalanx Biotech: Human OneArray, <http://www.phalanxbiotech.com/main.html>
36. Pruitt, K.D., T. Tatusova, and D.R. Maglott, NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Database issue): p. D61-5.
37. NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
38. Schuler, G.D., Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med*, 1997. 75(10): p. 694-8.
39. Troyanskaya, O.G., Putting microarrays in a context: integrated analysis of diverse biological data. *Brief Bioinform*, 2005. 6(1): p. 34-43.
40. Teufel, A., et al., Current bioinformatics tools in genomic biomedical research (Review). *Int J Mol Med*, 2006. 17(6): p. 967-73.
41. Quackenbush, J., Extracting biology from high-dimensional biological data. *J Exp Biol*, 2007. 210(Pt 9): p. 1507-17.
42. Wheeler, D.L., et al., Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(Database issue): p. D13-21.
43. European Biotechnology Institute, <http://www.ebi.ac.uk/>
44. Hubbard, T.J., et al., Ensembl 2007. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Database issue): p. D610-7.
45. Kuhn, R.M., et al., The UCSC genome browser database: update 2007. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Database issue): p. D668-73.

46. The Gene Ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(Database issue): p. D440-4.
47. Ogata, H., et al., KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res*, 1999. 27(1): p. 29-34.
48. Doniger, S.W., et al., MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data. *Genome Biol*, 2003. 4(1): p. R7.
49. Zeeberg, B.R., et al., GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol*, 2003. 4(4): p. R28.
50. Khatri, P. and S. Draghici, Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics*, 2005. 21(18): p. 3587-95.
51. Huang da, W., et al., DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Web Server issue): p. W169-75.
52. Barrett, T. and R. Edgar, Gene expression omnibus: microarray data storage, submission, retrieval, and analysis. *Methods Enzymol*, 2006. 411: p. 352-69.
53. Barrett, T., et al., NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles--database and tools update. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Database issue): p. D760-5.
54. Spellman, P.T., et al., Design and implementation of microarray gene expression markup language (MAGE-ML). *Genome Biol*, 2002. 3(9): p. RESEARCH0046.
55. Microsoft Excel, <http://office.microsoft.com/el-gr/excel/FX100487621032.aspx>
56. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(9): p. 5116-21.
57. Gentleman, R.C., et al., Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, 2004. 5(10): p. R80.
58. Cannata, N., E. Merelli, and R.B. Altman, Time to organize the bioinformatics resourceome. *PLoS Comput Biol*, 2005. 1(7): p. e76.

59. Fox, J.A., S. McMillan, and B.F. Ouellette, Conducting research on the web: 2007 update for the bioinformatics links directory. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(Web Server issue): p. W3-5.
60. R-project, <http://www.r-project.org/>
61. GeneSifter, <http://www.genesifter.net/>
62. Agilent: Genespring GX, <http://www.chem.agilent.com/en-US/products/software/lifesciencesinformatics/genespringgx/pages/default.aspx>
63. Biotique Systems: X-ray, <http://www.biotiquesystems.com/Products-Solutions/XRAY/>
64. DNASTar: ArrayStar, <http://www.dnastar.com/products/arraystar.php>
65. Genomatix: ChipInspector, <http://www.genomatix.de/products/ChipInspector/>
66. Insightful: S + ArrayAnalyzer, http://www.insightful.com/products/s-plus_arrayanalyzer/
67. Molecular Devices: Acuity, http://www.moleculardevices.com/pages/software/gn_acuity.html
68. Ocimum Biosolutions: Genowiz, http://www.ocimumbio.com/web/bioinformatics/prod_details.asp?prod_id=20&prodType=1
69. Partek: Genomics Suit, <http://www.partek.com/partekgs>
70. Rosetta Biosoftware: Resolver, <http://www.rosettabio.com/products/resolver>
71. SAS: JMP Genomics, <http://www.jmp.com/software/genomics/>
72. TIBCO: Spotfire Decision Site, <http://spotfire.tibco.com/products/decisionsite.cfm>
73. Biodiscovery: GeneDirector, <http://www.biodiscovery.com/index/news-app/storv.9/title.arragen-ltd-selects-biodiscovery-inc-s-genedirector-enterprise-software-for-data-management-of-microarray-gene-expression-rese>
74. Genomics: Geneus, <http://www.genomics.com/about-us/archive-2007/affymetrix>

75. Integromics: ArrayHub, <http://www.integromics.com/arrayhub.php>
76. PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
77. Roberts, P.C., Gene expression microarray data analysis demystified. *Biotechnol Annu Rev*, 2008. 14: p. 29-61.
78. Stevens, J.R. and R.W. Doerge, Meta-analysis combines affymetrix microarray results across laboratories. *Comp Funct Genomics*, 2005. 6(3): p. 116-22.
79. Breitling, R., et al., Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett*, 2004. 573(1-3): p. 83-92.
80. Hong, F. and R. Breitling, A comparison of meta-analysis methods for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. *Bioinformatics*, 2008. 24(3): p. 374-82.
81. Kadota, K., Y. Nakai, and K. Shimizu, A weighted average difference method for detecting differentially expressed genes from microarray data. *Algorithms Mol Biol*, 2008. 3: p. 8.
82. Choi, J.K., et al., Combining multiple microarray studies and modeling interstudy variation. *Bioinformatics*, 2003. 19 Suppl 1: p. i84-90.
83. Hong, F., et al., RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics*, 2006. 22(22): p. 2825-7.
84. DeConde, R.P., et al., Combining results of microarray experiments: a rank aggregation approach. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 2006. 5: p. Article15.
85. Stevens, J.R. and R.W. Doerge, Combining Affymetrix microarray results. *BMC Bioinformatics*, 2005. 6: p. 57.
86. Scopus, <http://www.scopus.com/>
87. IEEE, <http://www.ieee.org/portal/site>
88. Stata, <http://www.stata.com/>
89. Zintzaras, E. and J.P. Ioannidis, Meta-analysis for ranked discovery datasets: theoretical framework and empirical demonstration for microarrays. *Comput Biol Chem*, 2008. 32(1): p. 38-46.

90. Rhodes, D.R., et al., ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia*, 2004. 6(1): p. 1-6.
91. Aggarwal, A., et al., Topological and functional discovery in a gene coexpression meta-network of gastric cancer. *Cancer Res*, 2006. 66(1): p. 232-41.
92. Boussioutas, A., et al., Distinctive patterns of gene expression in premalignant gastric mucosa and gastric cancer. *Cancer Res*, 2003. 63(10): p. 2569-77.
93. Chen, X., et al., Variation in gene expression patterns in human gastric cancers. *Mol Biol Cell*, 2003. 14(8): p. 3208-15.
94. Hippo, Y., et al., Global gene expression analysis of gastric cancer by oligonucleotide microarrays. *Cancer Res*, 2002. 62(1): p. 233-40.
95. Tay, S.T., et al., A combined comparative genomic hybridization and expression microarray analysis of gastric cancer reveals novel molecular subtypes. *Cancer Res*, 2003. 63(12): p. 3309-16.
96. Agnelli, L., et al., Molecular classification of multiple myeloma: a distinct transcriptional profile characterizes patients expressing CCND1 and negative for 14q32 translocations. *J Clin Oncol*, 2005. 23(29): p. 7296-306.
97. Chen, X., et al., Meta-analysis of nasopharyngeal carcinoma microarray data explores mechanism of EBV-regulated neoplastic transformation. *BMC Genomics*, 2008. 9: p. 322.
98. Choi, H., et al., A latent variable approach for meta-analysis of gene expression data from multiple microarray experiments. *BMC Bioinformatics*, 2007. 8: p. 364.
99. Borozan, I., et al., MAID : an effect size based model for microarray data integration across laboratories and platforms. *BMC Bioinformatics*, 2008. 9: p. 305.
100. Choi, J.K., et al., Integrative analysis of multiple gene expression profiles applied to liver cancer study. *FEBS Lett*, 2004. 565(1-3): p. 93-100.
101. Wang, J., et al., Differences in gene expression between B-cell chronic lymphocytic leukemia and normal B cells: a meta-analysis of three microarray studies. *Bioinformatics*, 2004. 20(17): p. 3166-78.
102. Shen, R., D. Ghosh, and A.M. Chinnaiyan, Prognostic meta-signature of breast cancer developed by two-stage mixture modeling of microarray data. *BMC Genomics*, 2004. 5(1): p. 94.

103. Sorlie, T., et al., Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(19): p. 10869-74.
104. van 't Veer, L.J., et al., Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002. 415(6871): p. 530-6.
105. Sotiriou, C., et al., Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(18): p. 10393-8.
106. Huang, E., et al., Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet*, 2003. 361(9369): p. 1590-6.
107. Severgnini, M., et al., Strategies for comparing gene expression profiles from different microarray platforms: application to a case-control experiment. *Anal Biochem*, 2006. 353(1): p. 43-56.
108. Schneider, J., et al., Identification and meta-analysis of a small gene expression signature for the diagnosis of estrogen receptor status in invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer*, 2006. 119(12): p. 2974-9.
109. Saviozzi, S., et al., Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 2006. 6: p. 200.
110. Rhodes, D.R., et al., Meta-analysis of microarrays: interstudy validation of gene expression profiles reveals pathway dysregulation in prostate cancer. *Cancer Res*, 2002. 62(15): p. 4427-33.
111. Ramasamy, A., et al., Key issues in conducting a meta-analysis of gene expression microarray datasets. *PLoS Med*, 2008. 5(9): p. e184.
112. Park, T., et al., Combining multiple microarrays in the presence of controlling variables. *Bioinformatics*, 2006. 22(14): p. 1682-9.
113. Ma, S. and J. Huang, Regularized gene selection in cancer microarray meta-analysis. *BMC Bioinformatics*, 2009. 10: p. 1.
114. Kong, X., V. Mas, and K.J. Archer, A non-parametric meta-analysis approach for combining independent microarray datasets: application using two microarray datasets pertaining to chronic allograft nephropathy. *BMC Genomics*, 2008. 9: p. 98.

115. Gur-Dedeoglu, B., et al., A resampling-based meta-analysis for detection of differential gene expression in breast cancer. *BMC Cancer*, 2008. 8: p. 396.
116. Fishel, I., A. Kaufman, and E. Ruppin, Meta-analysis of gene expression data: a predictor-based approach. *Bioinformatics*, 2007. 23(13): p. 1599-606.
117. Ghosh, D., et al., Statistical issues and methods for meta-analysis of microarray data: a case study in prostate cancer. *Funct Integr Genomics*, 2003. 3(4): p. 180-8.
118. Zintzaras, E. and J.P. Ioannidis, Heterogeneity testing in meta-analysis of genome searches. *Genet Epidemiol*, 2005. 28(2): p. 123-37.
119. Nemhauser, J.L., T.C. Mockler, and J. Chory, Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol*, 2004. 2(9): p. E258.
120. Stanford Microarray Database (SMD), <http://smd.stanford.edu/> .
121. Yu, Y.P., et al., Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy. *J Clin Oncol*, 2004. 22(14): p. 2790-9.
122. Welsh, J.B., et al., Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*, 2001. 61(16): p. 5974-8.
123. Singh, D., et al., Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. *Cancer Cell*, 2002. 1(2): p. 203-9.
124. Ramaswamy, S., et al., Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(26): p. 15149-54.
125. Luo, J., et al., Human prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: molecular dissection by gene expression profiling. *Cancer Res*, 2001. 61(12): p. 4683-8.
126. Lapointe, J., et al., Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(3): p. 811-6.
127. Dhanasekaran, S.M., et al., Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature*, 2001. 412(6849): p. 822-6.
128. Ioannidis, J.P., et al., Genetic associations in large versus small studies: an empirical assessment. *Lancet*, 2003. 361(9357): p. 567-71.
129. SPSS, <http://www.spss.com/>