



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Tossicologia

XXV ciclo

**ANALISI INTEGRATA DELL'ESPRESSIONE
DI GENI/MICRORNA IN UN MODELLO DI
EPATOCANCEROGENESI SPERIMENTALE**

Settore scientifico disciplinare di afferenza: MED 04

Presentata da:	Dott.ssa Claudia Manca
Coordinatore Dottorato:	Prof. Amedeo Columbano
Relatore:	Prof. Amedeo Columbano

Esame finale a.a. 2011 - 2012

Indice

▪	Abbreviazioni	pag. 4
	<i>Introduzione</i>	pag. 6
▪	Il Carcinoma Epatocellulare	pag. 6
-	Incidenza globale del carcinoma epatocellulare	pag. 6
-	Principali fattori di rischio dell'HCC	pag. 7
-	Meccanismi molecolari dell'epatocancerogenesi	pag. 12
▪	microRNA	pag. 17
-	Biogenesi dei microRNA	pag. 17
-	microRNA e cancro	pag. 19
-	microRNA e carcinoma epatocellulare	pag. 21
-	Ruolo dei microRNA nella clinica	pag. 24
▪	Modelli di epatocancerogenesi sperimentale	pag. 26
-	Modello di Solt-Farber o dell'Epatocita Resistente	pag. 26
	<i>Scopo della Ricerca</i>	pag. 28
	<i>Materiali e Metodi</i>	pag. 29
▪	Animali	pag. 29
▪	Protocollo sperimentale	pag. 29
▪	Istologia e immunoistochimica	pag. 30
-	Preparazione del tessuto	pag. 30
-	Colorazione con ematossilina ed eosina	pag. 30
-	Immunoistochimica per la proteina GST-P	pag. 31
-	Immunoistochimica per la proteina KRT-19	pag. 31
▪	Laser Capture Microdissection	pag. 32
▪	Isolamento dell'RNA dalle lesioni epatiche	pag. 33
-	Estrazione dell'RNA col kit PicoPure	pag. 33
-	Estrazione dell'RNA col kit mirVana	pag. 33
-	Estrazione dell'RNA dagli aHCC e dai fegati di controllo	pag. 33
-	Valutazione quantitativa e qualitativa dell'RNA	pag. 34

proveniente dalla microdissezione	
▪ Microarrays	pag. 35
- Amplificazione dell'RNA	pag. 36
- Ibridazione su beadchips Illumina	pag. 36
- Analisi dei dati ottenuti dai microarrays	pag. 37
▪ IPA (Ingenuity Pathway Analysis)	pag. 38
▪ GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)	pag. 39
▪ TaqMan Low Density Array (TLDA)	pag. 39
- Analisi dei dati ottenuti dalle TLDA	pag. 41
▪ Validazione dei dati ottenuti dai microarrays e dalle TLDA mediante RT-Real Time PCR	pag. 41
- RT-PCR	pag. 41
- Real Time PCR	pag. 42
▪ Integrazione dei dati di trascrittomica e miRNomica	pag. 43
<i>Risultati</i>	pag. 45
▪ Determinazione del profilo di espressione dell'mRNA nelle diverse fasi del processo di epatocancerogenesi	pag. 45
▪ Analisi delle vie del segnale e analisi funzionale dei geni deregolati nelle varie fasi dell'epatocancerogenesi	pag. 49
▪ Identificazione delle signature molecolari attraverso il software GSEA	pag. 51
▪ Profilo di espressione dei miRNA nelle varie fasi dell'epatocancerogenesi	pag. 52
▪ Analisi integrata mRNA/microRNA	pag. 55
▪ Il profilo di espressione degli HCC di ratto rispecchia quello degli HCC umani	pag. 57
<i>Discussione</i>	pag. 59
<i>Conclusioni</i>	pag. 63
<i>Bibliografia</i>	pag. 64
<i>Tabelle supplementari</i>	pag. 72

Abbreviazioni

2-AAF	2-acetilaminofluorene
3'-UTR	3'-untranslated region
ABC	adenosine triphosphate-binding cassette
ADE	adenoma
AFB1	aflatossina B1
AFP	alfafetoproteina
AGO	proteina argonauta
aHCC	carcinoma epatocellulare tardivo
ALP	fosfatasi alcalina
ALT	alanina aminotransferasi
ARE	antioxidant responsive elements
CDK	chinasi ciclina dipendenti
CTNNB1	ciclina B1
DENA	dietilnitrosamina
DM	diabete mellito
EGF	fattore di crescita dell'epidermide
eHCC	carcinoma epatocellulare precoce
FAK	chinasi di adesione focale
GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
GEDAS	Gene Expression Data Analysis Studio
GGT	gamma-glutamyltransferasi
GPXx	glutathione peroxidase
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GST-P	glutathione-S-transferasi forma placentare
HBV	virus dell'epatite B
HCC	carcinoma epatocellulare
HCV	virus dell'epatite C
HDV	virus dell'epatite D
HGF	fattore di crescita epatocitario
HH	emocromatosi ereditaria
HMGA1	high-mobility group AT-hook 1
IGF-2	fattore di crescita insulino simile di tipo 2

IGF2R	recettore per il fattore di crescita insulino simile-2
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
KEAP1	kelch-like ECH-associated protein
KRT-19	citocheratina-19
LIMMA	Linear Models for MicroArray data
LPS/IL1	lipopolisaccaridi/interleuchina-1
MMP	metalloproteasi della matrice
MXD4	Max associated protein 4
NAFDL	steatosi epatica non alcolica
NASH	steatoepatite non alcolica
NFE2L2 (NRF2)	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
NR1I2	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2
NR1I3	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3
NR2F1	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1
p16/INK4a (CDKN2A)	cyclin-dependent kinase inhibitor-2A
PCT	porfiria cutanea tarda
PI3K	fosfatidil-inositolo 3 chinasi
PPARA	recettore attivato dal proliferatore dei perossisomi- α
pRB	proteina del retinoblastoma
PTEN	omologo della fosfatasi e della tensina
PXR	recettori del pregnano
RISC	RNA induced silencing complex
RXR	recettori dell'acido retinoico
TGF-α	fattore di crescita trasformante α
TLDA	TaqMan Low Density Array

Introduzione

Il Carcinoma Epatocellulare

Incidenza globale del carcinoma epatocellulare

Il Carcinoma Epatocellulare (HCC), o tumore primitivo del fegato, rappresenta uno dei più importanti problemi sanitari a livello mondiale; costituisce infatti la quinta più comune neoplasia e la terza causa di morte correlata al cancro (*Parkin DM et al., 2001*).

Attualmente vengono diagnosticati circa 500 mila nuovi casi ogni anno, di cui più dell'80% [Fig.1] si manifesta in aree ad alto rischio come il Sudafrica e l'Est Asiatico (*Parkin DM, 2002*). Tuttavia, se negli ultimi anni è stata registrata, in queste aree, un'incoraggiante riduzione dell'incidenza degli HCC, al contrario si è verificato un incremento nelle zone a basso rischio quali l'Europa e gli Stati Uniti d'America, correlato per lo più a una crescente prevalenza dell'infezione da virus dell'epatite C (*McGlynn KA et al., 2001*).

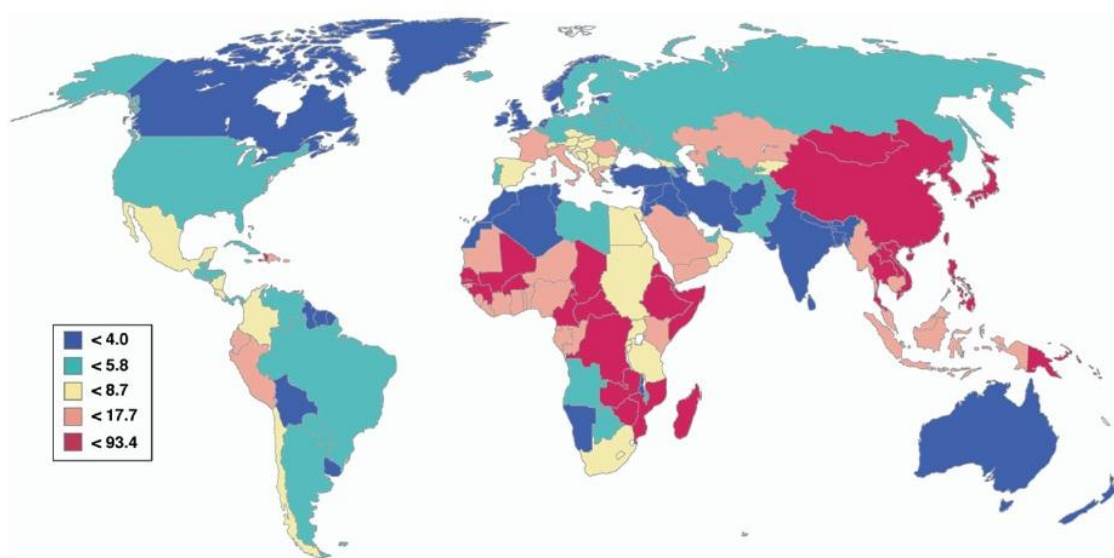


Fig.1: incidenza dell'HCC nei vari Stati del mondo (*El-Serag HB and Rudolph KL, 2007*).

Proprio gli USA rappresentano un importante esempio di come il tasso d'incidenza dell'HCC vari notevolmente anche tra le diverse popolazioni residenti in una determinata regione geografica a prescindere dalle differenze legate all'età e al sesso; gli Asiatici americani presentano infatti un tasso doppio rispetto agli Afroamericani, i quali a loro volta hanno un tasso due volte maggiore nei confronti della popolazione bianca (*El-Serag HB and Rudolph KL, 2007*).

E' stato inoltre visto come in quasi tutte le popolazioni gli uomini sviluppano HCC più delle donne, con un rapporto che si aggira tra 2:1 e 4:1 in base alla regione geografica considerata; ciò potrebbe essere dovuto a una diversa esposizione ai vari fattori di rischio, ma dati presenti in letteratura i quali mostrano come topi maschi sviluppino HCC in misura maggiore rispetto a topi femmine, supportano l'ipotesi che la progressione dell'HCC sia influenzata dagli ormoni androgeni piuttosto che dall'esposizione sesso-specifica ai fattori di rischio (*Rudolph KL et al., 2000*).

Da tenere in considerazione è anche la fascia d'età in cui si registra il picco di sviluppo dell'HCC che dipende sicuramente dall'area geografica considerata, dal tasso d'incidenza, dal sesso e dall'eziologia (*Parkin DM, 2001*); si può in ogni caso affermare che le donne raggiungono il picco con 5 anni di ritardo rispetto agli uomini.

Principali fattori di rischio dell'HCC

Il carcinoma epatocellulare è uno dei pochi tipi di tumore di cui siano stati ben identificati i principali fattori di rischio (*Bosch X et al., 1999; Colombo M in: Berr F et al., 2003*) i quali variano a seconda della regione geografica considerata.

Il fattore di rischio clinico da tenere maggiormente in considerazione è la cirrosi epatica la quale, nell'80% dei casi, porta ad epatocarcinoma; ciò ha portato a supporre che un pre-esistente stato cirrotico sia un importante prerequisito per lo sviluppo dell'HCC, nonostante ci siano anche dei casi in cui si ha il tumore in assenza di cirrosi.

Tra i principali fattori che causano l'HCC nell'uomo includiamo fattori virali, ambientali, ormonali, legati alla dieta e legati all'ospite.

Fattori virali

Virus dell'epatite B (HBV)

Il legame presente tra HCC e infezione da HBV è stato identificato nei primi anni Ottanta ed è stato successivamente studiato in modo approfondito.

A oggi si stima che circa due miliardi di persone siano state infettate da HBV e che 350 milioni siano portatori cronici (*WHO Media centre, 2008*). Globalmente, l'infezione cronica da virus dell'epatite B rappresenta il principale fattore causale per lo sviluppo del carcinoma epatocellulare; studi di caso-controllo mostrano infatti come l'HBV possa incrementare il rischio di sviluppare HCC dalle 5 alle 14 volte e questo avviene principalmente in aree endemiche come l'Africa e l'Asia, dove il virus viene generalmente trasmesso per via verticale (dalla madre al neonato) e più del 90% degli infettati seguono poi un decorso cronico. Diversa è la situazione nelle zone a basso

rischio dove la trasmissione avviene per lo più in età adulta attraverso contatto sessuale, trasfusioni del sangue o altre procedure invasive praticate in condizioni non sterili (trasmissione orizzontale) (*Alter MJ, 2003*); in questo caso più del 90% delle infezioni acute regrediscono spontaneamente.

Sebbene l'HBV sia notoriamente in grado di determinare l'insorgenza dell'HCC in assenza di cirrosi, tuttavia circa il 70-90% degli HCC correlati ad HBV sviluppano in pazienti cirrotici.

Tra gli altri fattori che aumentano il rischio di sviluppare HCC in pazienti portatori cronici di HBV ritroviamo: l'età avanzata (o una maggiore durata dell'infezione), il sesso maschile, la razza, la storia familiare dell'HCC, l'esposizione ad aflatossina B1, l'alcool, il tabacco e la co-infezione con virus dell'epatite C (HCV) o dell'epatite D (HDV) (*El-Serag HB and Rudolph KL, 2007*).

Nonostante le numerose evidenze epidemiologiche, per determinare il rischio di sviluppare HCC è molto importante considerare anche l'aspetto virologico dell'infezione. E' noto che differenze genotipiche e mutazioni genetiche potrebbero avere degli effetti sulle proprietà patogeniche del virus come l'infettività, il meccanismo di trasmissione, la capacità di integrazione nel DNA umano e l'espressione proteica virale, tutti fattori che influenzano il fenotipo della malattia. Tuttavia il ruolo dell'HBV nella genesi tumorale resta ancora da chiarire (*Gao J et al., 2012*).

Virus dell'epatite C (HCV)

L'HCV venne identificato vent'anni dopo la scoperta dell' HBV (*Choo QL et al., 1989*).

L'infezione da virus dell'epatite C rappresenta la causa virale maggiormente responsabile dello sviluppo di HCC nelle aree in cui l'HBV ha una bassa prevalenza come i Paesi Occidentali e il Giappone (*Raza SA et al., 2007*). Secondo quanto dichiarato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, circa il 3% della popolazione mondiale è stata infettata dall'HCV e 170 milioni tra gli infettati sono portatori cronici del virus.

La porzione di HCC riconducibili ad epatite cronica causata da HCV è pari al 31% (*IARC, 2008*) e la loro incidenza varia in base all'esistenza di cofattori quali: cirrosi epatica, livelli di alfafetoproteina (AFP) e conta delle piastrine (*Fattovich G et al., 2006*). Generalmente, l'incidenza annua dell'HCC in pazienti cirrotici è del 3-5% (*WHO, 2002*). La co-infezione con HBV e l'assunzione di alcool potrebbero incrementare l'incidenza da 2 a 4 volte (*Fattovich G et al., 2006*).

Il meccanismo attraverso il quale l'HCV causa l'HCC non è ancora stato chiarito. Diversamente dall'HBV, il virus dell'epatite C non si integra nel genoma umano e non sembra codificare per proteine trasformanti. Si ipotizza che, nel contesto di un'epatite cronica e di una conseguente progressione a cirrosi, una continua infiammazione e rigenerazione epatocitaria portino al danno cromosomale e alla promozione della cancerogenesi epatica (*Gomaa AI et al., 2008*).

Fattori ambientali

Intossicazione da aflatossine

Le aflatossine rappresentano una classe di micotossine prodotte dalle specie fungine *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* diffuse soprattutto nel Sud-Est asiatico e nel Sudafrica; esse crescono principalmente in cibi come cereali e noci conservati in condizioni di elevato calore e umidità. Tra tutte, l'aflatossina B1 (AFB1) è la più importante in quanto nel 1987 è stata inserita dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) tra le sostanze sicuramente cancerogene (IARC, 1987).

Una volta ingerita, l'AFB1 viene immediatamente metabolizzata nell'intermedio attivo AFB1-eso-8,9-epossido che può legare il DNA e causare, tra le altre cose, la formazione di mutazioni nel gene codificante l'oncosoppressore p53 (in particolare nel codone 249 della p53) (Garner RC et al., 1972); questa mutazione è stata osservata nel 30%-60% degli HCC sviluppati nelle aree geografiche endemiche per l'AFB1 (Bressac B et al., 1991; Turner PC et al., 2002).

Studi prospettici condotti a Shanghai, hanno dimostrato l'esistenza di un'interazione tra l'esposizione ad aflatossina B1 e l'infezione cronica da HBV; infatti, mentre la sola esposizione ad AFB1 aumenta il rischio di sviluppare HCC di circa 4 volte e la sola infezione da HBV lo incrementa di circa 7 volte, si è visto come in individui portatori cronici di HBV e per i quali è stata riscontrata un'escrezione urinaria dei metaboliti dell'aflatossina, vi sia un aumentato rischio di sviluppare HCC di circa 60 volte (Qian GS et al., 1994).

Alcool

L'assunzione di alcool venne messa in correlazione con l'incidenza e la mortalità del carcinoma epatocellulare già a metà degli anni Ottanta (Nanji AA et al., 1985).

Un elevato consumo alcolico, inteso come un'ingestione superiore a 50-70 g al giorno per periodi prolungati, rappresenta un fattore di rischio certo per lo sviluppo di HCC.

L'alcool condurrebbe ad epatocancerogenesi attraverso due differenti meccanismi: diretto (genotossico) e indiretto; quest'ultimo comprende sia lo sviluppo intermedio della cirrosi epatica la quale rappresenta la via che con maggiore probabilità conduce all'HCC nei Paesi Occidentali (London WT et al., 1996), sia un effetto sinergico con altri fattori di rischio quali le infezioni da virus dell'epatite B e C.

Dati presenti in letteratura mostrano come tra i consumatori di bevande alcoliche, il rischio di sviluppare HCC aumenti linearmente, una volta superati i 60 g al giorno, con il quantitativo ingerito; la contemporanea presenza dell'infezione da HCV aumenta del doppio il rischio di andare incontro a carcinoma epatocellulare (Donato F et al., 2002). Sono stati inoltre riscontrati

effetti additivi tra assunzione di alcool e diabete, obesità e fumo (*Wang LY et al., 2003; Yuan JM et al., 2004; Singal AK et al., 2007; Chuang SC et al., 2009*).

Tabacco

La possibile esistenza di un legame tra tabacco e rischio di sviluppare HCC, è stata particolarmente studiata negli ultimi 30 anni, ma non sono stati ottenuti risultati consistenti. Infatti, tra gli oltre 40 studi effettuati tra il 1983 e il 2006, il numero di quelli che hanno riportato risultati positivi è molto simile al numero di studi dai quali si sono ottenuti risultati negativi (*Schottenfeld D et al., 2006*).

Fattori ormonali

Contraccettivi orali

I contraccettivi orali vennero inizialmente messi in relazione con lo sviluppo di tumori benigni al fegato (*Kenya PR, 1990; Korula J et al., 1991*); lo studio della transizione da adenoma ad HCC (*Gyorffy EJ et al., 1989; Korula J et al., 1991*) insieme a ulteriori dati scientifici, indicarono la presenza di un legame tra l'utilizzo di contraccettivi orali e lo sviluppo di carcinoma epatocellulare.

Il razionale deriva dal fatto che il numero dei recettori nucleari per gli estrogeni presenti negli epatociti aumenta nell'HCC, suggerendo una risposta ormonale da parte del tessuto epatico neoplastico.

Si ipotizza che gli estrogeni causino il carcinoma epatocellulare incrementando il tasso proliferativo degli epatociti e provocando di conseguenza un aumento delle mutazioni spontanee dovute principalmente ad errori della DNA polimerasi (*De BV et al., 1996*). Tuttavia non è ancora presente un'evidenza epidemiologica che attesti la certa associazione tra un prolungato consumo di contraccettivi orali e un aumentato rischio di sviluppare HCC. Inoltre, non si sa ancora nulla riguardo il possibile legame tra carcinoma epatocellulare e contraccettivi orali di nuova generazione a basso dosaggio (*El-Serag HB and Rudolph KL, 2007*).

Fattori legati alla dieta

Il fattore che suscita maggiore interesse è il caffè; molti sono infatti gli studi che nel tentativo di trovare un'associazione tra caffè e HCC hanno riportato una correlazione inversa tra consumo di caffè e rischio di sviluppare il tumore, così come un effetto positivo sulla funzionalità epatica e sulla cirrosi. Si è visto come una regolare assunzione di caffè sia inversamente associata all'attività sierica della gamma-glutamilttransferasi (GGT) ampiamente utilizzata come marcatore di cirrosi,

così come all'attività di altri marcatori di danno epatico quali l'alanina aminotransferasi (ALT) e la fosfatasi alcalina (ALP).

Nonostante gli studi svolti abbiano fornito delle evidenze consistenti, resta comunque difficile trovare una spiegazione per gli effetti positivi svolti dal caffè (Gao J *et al.*, 2012). Ci sono inoltre numerosi studi che hanno evidenziato una correlazione inversa tra HCC e consumo di tè verde, frutta e verdura, latte e yogurt, carni bianche e uova; ma i risultati sono ancora inconsistenti (Gao J *et al.*, 2012).

Fattori legati all'ospite

Sindromi metaboliche

- **Obesità:** sono sempre più numerose le evidenze che mostrano come l'obesità sia correlata ad un'aumentata incidenza e mortalità dell'epatocarcinoma. Un esempio di quanto affermato è dato da uno studio di coorte della durata di 16 anni condotto negli USA, dove la mortalità dovuta a tumore al fegato dei 900 mila individui coinvolti è risultata 5 volte maggiore nei soggetti aventi un elevato indice di massa corporea (BMI, Body Mass Index) (35-40 kg/m²) rispetto a quelli con BMI normale (Calle EE *et al.*, 2003). Dai risultati ottenuti è inoltre emerso come l'effetto dell'obesità sull'HCC sia maggiore negli uomini piuttosto che nelle donne (Calle EE *et al.*, 2003).

L'obesità porterebbe al tumore attraverso lo sviluppo della steatosi epatica non alcolica (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) la quale può progredire attraverso una fase infiammatoria definita steatoepatite non alcolica (Non Alcoholic Steato-Hepatitis, NASH) fino alla fibrosi, alla cirrosi, e quindi all'epatocarcinoma (Gao J *et al.*, 2012).

- **Diabete mellito (DM):** è tipicamente diviso in DM di tipo 1 e DM di tipo 2. Quest'ultima forma, in continua crescita e fortemente correlata all'obesità, è caratterizzata da iperglicemia, insulino resistenza e iperinsulinemia (Baffy G *et al.*, 2012).

Questo disturbo è stato associato ad un incrementato rischio di sviluppare diversi tipi di cancro (Giovannucci E *et al.*, 2012), e considerevoli evidenze lo hanno posto in correlazione con lo sviluppo e la progressione dell'HCC (El-Serag HB *et al.*, 2006). Una possibile spiegazione deriva dal fatto che il diabete appartiene al gruppo delle sindromi metaboliche, le quali aumentano il rischio di sviluppare la NASH che condurrebbe poi al carcinoma (El-Serag HB and Rudolph KL, 2007). Nonostante l'identificazione di questa possibile associazione causale, lo studio della correlazione tra DM e HCC ha posto le basi per la formulazione di altre ipotesi. Una di queste spiegherebbe la relazione tra diabete e carcinoma come

conseguenza dell'infezione da HCV (*White DL et al., 2008*); altri studi suggeriscono che il diabete potrebbe svilupparsi in seguito a cirrosi e altre patologie epatiche croniche.

I risultati ottenuti tra le diverse popolazioni sono comunque abbastanza contrastanti e sono quindi necessari ulteriori studi (*Gao J et al., 2012*).

- Sovraccarico di ferro: il fegato rappresenta la sede fondamentale per il deposito e il metabolismo del ferro e anomalie di queste funzioni porterebbero in primo luogo a danni del tessuto epatico. Sono causa di un eccessivo accumulo di ferro a livello epatico sia alcuni disordini metabolici, come l'emocromatosi ereditaria (HH), sia un'errata alimentazione. È stato visto come livelli molto alti di ferro possano incrementare di 200 volte il rischio di sviluppare HCC (*Kowdley KV, 2004*). L'accumulo di ferro porta allo sviluppo di epatocarcinoma principalmente attraverso una fase cirrotica intermedia, ma ci sono delle evidenze che dimostrano come si possa arrivare ad HCC anche indipendentemente da essa (*Blumberg RS et al., 1988*). Il sovraccarico di ferro può inoltre interagire con le infezioni da virus dell'epatite B e C, con l'eccessivo consumo alcolico e con molti altri fattori di rischio, e agisce come cofattore nella patogenesi del carcinoma epatocellulare (*Kew MC, 2009*).
- Tra le altre sindromi metaboliche che possono incrementare il rischio di sviluppare HCC vengono incluse: la tirosinemia, la deficienza di alfa-1-tripsina, l'ipercitrullinemia, la porfiria cutanea tarda (PCT) e la glicogenosi (*LARC, 2008*).

Meccanismi molecolari dell'epatocancerogenesi

L'epatocancerogenesi è un processo multifasico molto complesso fortemente correlato alla presenza di un danno epatico cronico, che solo raramente si manifesta in individui con fegato sano.

La condizione predisponente allo sviluppo dell'HCC è la cirrosi, la quale sviluppa dopo circa 20-40 anni di latenza. Per capire le basi molecolari dell'epatocancerogenesi diventa quindi importante riuscire a decifrare sia i meccanismi molecolari che avvengono durante la cirrosi epatica, sia l'insieme delle anomalie cromosomali e delle modificazioni genetiche ed epigenetiche che si verificano durante le fasi di iniziazione, promozione e progressione della patologia (*Aravalli RN, 2008; El-Serag HB and Rudolph KL, 2007*).

Nella fase pre-neoplastica, successivamente al danno cronico provocato da uno o più agenti eziologici, gli epatociti vanno incontro a un'intensa stimolazione mitogenica dovuta all'esposizione ad elevati livelli di fattori di crescita (quali il fattore di crescita insulino simile di tipo 2, IGF-2 e il fattore di crescita trasformante α , TGF- α) e citochine attivate in seguito all'infiammazione dovuta a necrosi cellulare, all'azione di proteine virali e all'intensa risposta

rigenerativa successiva alla perdita cellulare; questi fattori possono portare all'attivazione di importanti vie del segnale coinvolte nella proliferazione cellulare (Thorgeirsson SS et al., 2002). Cicli continui di questo processo necrotico/rigenerativo promuovono un danno cronico che culmina nella cirrosi epatica, caratterizzata dalla formazione di noduli epatici circondati da depositi di collagene. L'elevato tasso di proliferazione cellulare, insieme all'accorciamento dei telomeri e alla riespressione delle telomerasi, porta all'accumulo di epatociti sensibili a subire alterazioni geniche strutturali (amplificazioni, mutazioni, delezioni e trasposizioni) e allo sviluppo di una popolazione epatocitaria monoclonale che andrà a formare foci iperplastici di epatociti fenotipicamente alterati che progrediranno poi nelle successive fasi displastica e neoplastica, fase, quest'ultima, nella quale i carcinomi epatocellulari potranno essere classificati in base al loro grado di differenziamento [Fig.2] (PaRaskevi AF et al., 2006).

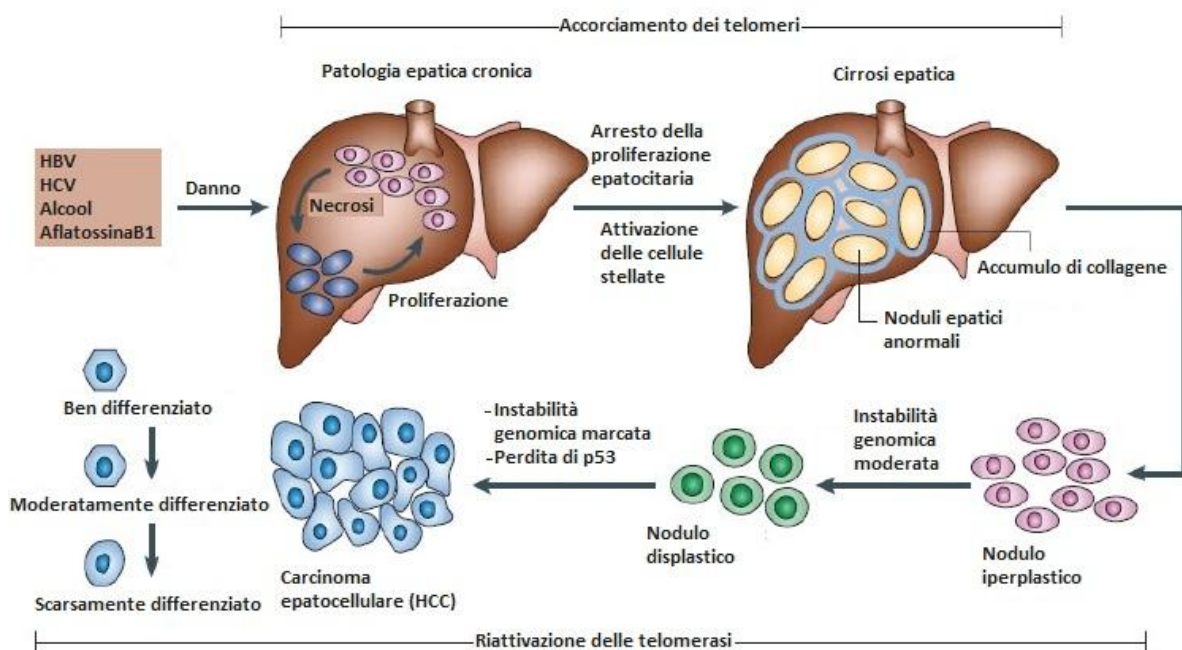


Fig.2: progressione istopatologica e caratteristiche molecolari dell'HCC (PaRaskevi AF et al., Nature, 2006).

Una delle alterazioni più frequenti nell'epatocancerogenesi è la perdita della funzionalità dei "guardiani" (check-point) del ciclo cellulare. Tra i check-point maggiormente deregolati troviamo:

- Il soppressore tumorale p53: in condizioni normali limita la sopravvivenza e la proliferazione cellulare in risposta all'accorciamento dei telomeri, induce l'arresto del ciclo cellulare in seguito all'attivazione di oncogeni (meccanismo che prende il nome di "senescenza indotta da oncogeni") (Di MR et al., 2006) e protegge l'integrità del genoma. E' stato visto che in circa la metà dei tumori umani, il gene soppressore tumorale TP53 viene inattivato da una singola mutazione puntiforme (Aravalli RN, 2008), mentre nella restante parte la proteina p53 è

espressa a livelli normali ma risulta difettoso il segnale che porta all'arresto del ciclo cellulare e di conseguenza all'apoptosi. Una perdita della funzionalità della p53 allo stadio cirrotico potrebbe fornire un vantaggio selettivo degli epatociti aventi telomeri gravemente accorciati, porterebbe all'instabilità cromosomica e all'iniziazione dell'HCC (*El-Serag HB and Rudolph KL, 2007*).

- La proteina del retinoblastoma pRb: è anch'essa un soppressore tumorale e rappresenta un'importante barriera cellulare contro lo sviluppo del cancro. Il danneggiamento di questo check-point potrebbe portare, come per la p53, alla progressione degli epatociti con telomeri accorciati durante lo stadio cirrotico (*Plentz RR et al., 2007*). Negli HCC umani, la pathway di Rb è alterata in più dell'80% dei casi ed è, insieme all'inattivazione del gene codificante la proteina p16/INK4a dovuta alla metilazione del suo promotore, l'alterazione maggiormente rappresentata (*Azechi H et al., 2001*).
- Inoltre, nella maggior parte degli HCC umani, vi è un aumento dell'espressione della ganchirina (un inibitore della funzionalità di p53 e Rb) la quale contribuisce al processo di epatocancerogenesi destabilizzando Rb (*Higashitsuji H et al., 2000*).

I suddetti soppressori tumorali, insieme all'axin 1, al recettore per il fattore di crescita insulino-simile di tipo 2 (IGF2-R) e ad altri ben noti oncosoppressori, sono localizzati in alcuni tra i loci cromosomici che normalmente subiscono, nell'HCC, una perdita di eterozigotà, quali i cromosomi 1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 13q, 16p, 16q e 17p; ciò causerebbe quindi una perdita della loro funzionalità. Sono invece state documentate amplificazioni nei cromosomi 1p, 6p, 7q, 8q e 17q, che potrebbero conseguentemente portare all'attivazione di oncogeni come il c-myc (*Trevisani F et al., 2008*). Le alterazioni riscontrate a livello cromosomico porterebbero allo sviluppo di aberrazioni genetiche ed epigenetiche e alla conseguente attivazione delle vie del segnale oncogeniche corrispondenti.

Un notevole aiuto per lo studio delle pathway molecolari implicate nell'HCC, per l'identificazione dei geni espressi in modo anomalo e per la generazione di profili molecolari capaci di discriminare tra i diversi tipi di tumori epatici e tra lesioni precoci evolutive e non evolutive, è arrivato a fine anni Novanta in seguito al successo avuto dal Progetto Genoma Umano, il quale ha posto le basi per la nascita di un'era fondata su una nuova concezione della biologia intesa non più come lo studio del singolo gene o della singola proteina, ma come lo studio integrato del comportamento, della funzione e delle relazioni esistenti tra i diversi elementi costituenti la cellula, il tessuto e l'intero organismo. Il fondamento di questa branca della biologia detta "sistemica" è stato quindi quello di prelevare i dati ottenuti dalle nuove tecnologie "omiche"

(quali la genomica, la trascrittomica, la proteomica, la metabolomica e la miRNomica) e integrarli con i pre-esistenti modelli teorici al fine di giungere all'identificazione di biomarcatori, vie del segnale, networks cellulari e potenziali bersagli terapeutici utili per la creazione di un approccio medico personalizzato. (*Aravalli RN, 2008; Weston AD and Hood L, 2004*).

Dall'elevato numero di studi condotti nel corso degli anni, è emerso che in ogni tumore si ha un'attivazione aberrante di vie di trasduzione del segnale coinvolte nella proliferazione, sopravvivenza, differenziazione cellulare e angiogenesi.

Tra le pathways che generalmente mostrano un'alterata attività nell'HCC troviamo:

- la via del segnale Raf/Ras/Mek/Erk o delle chinasi attivate da mitogeni (MAPK): viene attivata in risposta ad un incremento di segnali a monte dovuto ad un'aumentata espressione di fattori quali il fattore di crescita insulino-simile (IGF), il fattore di crescita dell'epidermide (EGF), quello epatocitario (HGF) e altri (*Kudo M, 2012*);
- la via della Wnt/ β -catenina: è stata originariamente identificata nella *Drosophila melanogaster* ed è altamente conservata in processi quali omeostasi, proliferazione cellulare, differenziamento, motilità ed apoptosi (*Aravalli RN, 2008*). Viene finemente regolata durante le fasi precoci dello sviluppo epatico (*Micsenyi A et al., 2004*). Sono numerosi gli studi che hanno trovato una deregolazione di questa pathway in diversi tipi di tumore umano, incluso l'HCC (*Herbst A and Kolligs FT, 2007*). L'attivazione di questa via del segnale si verifica frequentemente in HCC murini e umani che riguardano mutazioni somatiche così come una repressione a livello trascrizionale di regolatori negativi (*De La CA et al., 1998; Chan DW et al., 2006*);
- la via fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K)/Akt/mTOR: un'attivazione del segnale di Akt ed una compromissione del suo regolatore negativo PTEN (omologo della fosfatasi e della tensina) sono state riportate nel 40%-60% degli HCC umani (*Hu TH et al., 2003*).
- la via delle proteine Hedgehog (*Sicklick JK et al., 2006*);
- la via del segnale del fattore di crescita epatocitario (HGF)/cMET (*Kaposi-Novak P et al., 2006*).

Alcune tra le pathways sopra citate coinvolte nell'HCC, sono correlate anche alle fasi di sviluppo epatico. L'attivazione di vie del segnale dello sviluppo suggerisce che alcuni HCC possono generare da cellule staminali epatiche. Infatti, mentre una normale rigenerazione epatica non necessita di cellule staminali perché gli epatociti residui mantengono la capacità di rientrare nel ciclo cellulare, durante lo stadio cirrotico si crea un ambiente sfavorevole per la crescita che potrebbe portare all'attivazione e alla trasformazione delle cellule staminali (*El-Serag HB and Rudolph KL, 2007*).

Come si può notare [Fig.3], le pathways oncogeniche implicate nel processo di cancerogenesi epatica sono molto eterogenee se paragonate ad altri tipi tumorali e vengono ampiamente studiate al fine di identificare potenziali biomarcatori e target molecolari (Aravalli RN, 2008; El-Serag HB and Rudolph KL, 2007). Tuttavia, nonostante l'elevato numero di studi effettuati, non si è ancora giunti all'individuazione di una via del segnale caratteristica delle fasi di sviluppo e progressione del carcinoma epatocellulare.

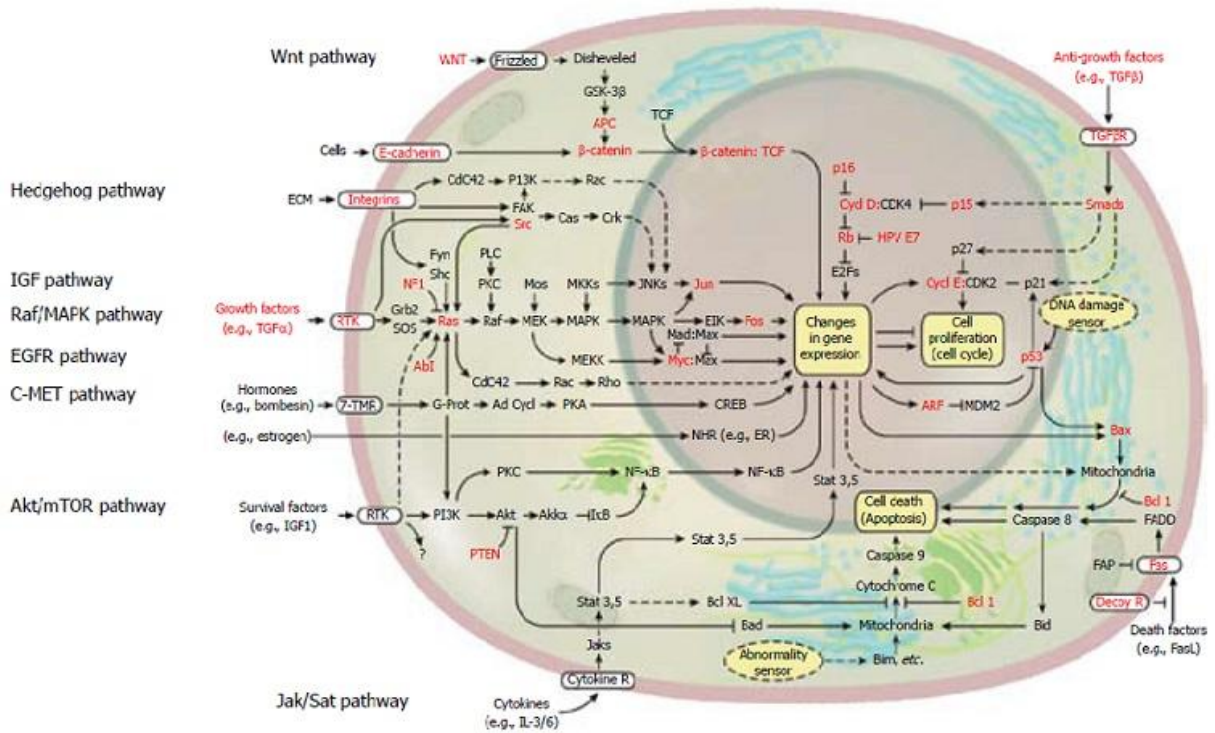


Fig.3: vie del segnale maggiormente coinvolte nel carcinoma epatocellulare (Kudo M, *World J Gastroenterol*, 2012).

Recentemente, agli studi riguardanti l'analisi dell'espressione genica, si è aggiunta una serie di pubblicazioni le quali affermano che la classificazione dei tumori può essere condotta non solo attraverso l'analisi dell'espressione genica, ma anche mediante l'analisi dell'espressione di quella porzione di RNA non codificanti che, nelle cellule dei mammiferi, rappresenta la stragrande maggioranza della popolazione di RNA totale.

In particolare la ricerca si è focalizzata sullo studio di piccole molecole di RNA le quali hanno la capacità di regolare l'espressione genica e proteica; un sottogruppo di questi piccoli RNA non codificanti è rappresentato dai microRNA.

MicroRNA

I microRNA (miRNA o miR) sono delle piccole molecole endogene di RNA non codificante a singola elica aventi una lunghezza compresa tra i 19 e i 25 nucleotidi, i quali possono regolare l'espressione di diversi geni target.

Sono espressi in un elevato numero di organismi, incluso l'uomo; sono altamente conservati e specifici per tessuto e stadio di sviluppo e giocano un ruolo cruciale in processi biologici molto importanti quali il controllo della proliferazione cellulare, l'apoptosi, il differenziamento cellulare, il mantenimento della staminalità, la risposta a segnali extracellulari e di stress.

La scoperta dei microRNA risale al 1993 quando Victor Ambros e colleghi, Rosalind Lee e Rhonda Feinbaum, scoprirono che il gene *lin-4*, noto per il suo ruolo esercitato nel controllo dello sviluppo larvale del nematode *Caenorhabditis elegans*, non codificava per una proteina bensì dava origine a una coppia di piccoli RNA, di cui il più lungo rappresentava il precursore di quello più corto avente una lunghezza di circa 22 nucleotidi. Il piccolo RNA *lin-4* aveva la capacità di legare la 3'-UTR (Untranslated Region) dell'RNA messaggero codificante la proteina *lin-14*, provocandone la repressione (*Lee RC et al., 1993*).

I microRNA hanno quindi la funzione di inibire l'espressione genica a livello post-trascrizionale attraverso il riconoscimento di siti target a loro complementari situati preferenzialmente nelle regioni 3'-UTR degli RNA messaggeri su cui essi agiscono.

Biogenesi dei microRNA

La maggior parte dei microRNA viene trascritta a partire sia da geni indipendenti sia da introni facenti parte di geni codificanti proteine, dal complesso della RNA polimerasi II come un lungo trascritto primario avente struttura a forcina denominato Pri-miRNA il quale, all'interno del nucleo della cellula, viene processato dall'Rnasi III Droscha in un lungo Pre-miRNA di 70-100 nucleotidi circa. Questo subisce l'azione della proteina Exportina la quale, coadiuvata dalla GTPasi Ran, consente il suo passaggio nel citoplasma, dove il Pre-miRNA viene ulteriormente processato dall'Rnasi III Dicer (*Chen XM, 2009*). A tal proposito è importante dire che cellule e topi in cui è stata soppressa l'espressione del gene Dicer (*DCR^{-/-}*) non sono vitali, e ciò è indice dell'importante ruolo svolto da questo enzima durante lo sviluppo e le normali funzioni cellulari (*Bernstein E et al., 2003*). La risultante di questa processazione è un RNA a doppio filamento (miRNA/miRNA* duplex) che viene legato dalla proteina Argonauta (Ago) ed incorporato nel complesso enzimatico chiamato RISC (RNA Induced Silencing Complex). Uno dei due filamenti del duplex (il filamento guida o miRNA) rimarrà legato all'Ago e costituirà il miRNA maturo di circa 22 nucleotidi, mentre l'altro filamento (filamento passeggero o miRNA*) verrà degradato

(Melo SA and Esteller M, 2011). Il miRNA maturo all'interno del RISC è in grado di legarsi a sequenze specifiche degli RNA messaggeri (mRNA) target, ovvero le 3'-UTR (Chen XM, 2009). A questo punto, il meccanismo d'azione del miRNA dipenderà principalmente dal grado di complementarità esistente tra esso e il messaggero target: una complementarità perfetta tra le due sequenze, più frequente nelle specie vegetali, determinerà una degradazione dell'RNA messaggero attraverso un taglio endonucleotidico, mentre una complementarità imperfetta, caratteristica delle specie animali, porterà con più probabilità al blocco del processo di traduzione determinando una riduzione dell'espressione proteica senza degradazione del messaggero (Milazzo M et al., 2011) [Fig.4].

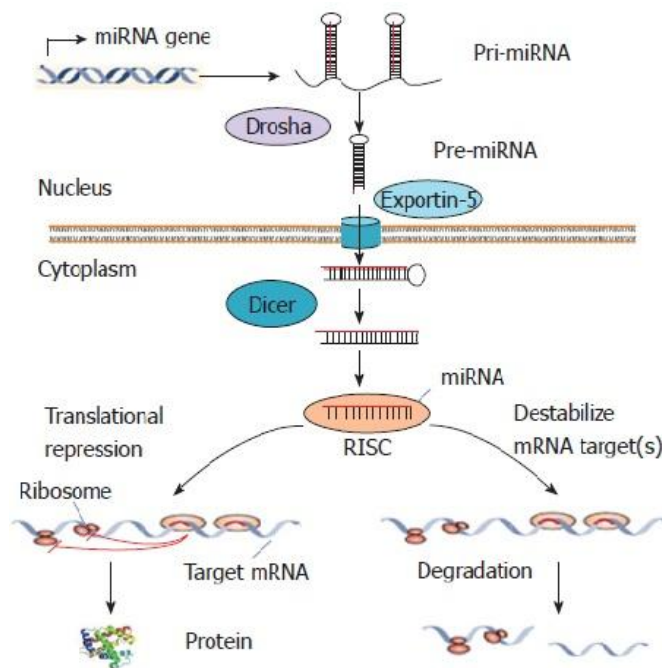


Fig.4: biogenesi dei microRNA (Chen XM, World J Gastroenterol, 2009).

I microRNA svolgono quindi un'importante funzione nel regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale.

Un microRNA può avere diversi RNA messaggeri target e ciascuno di questi può essere regolato da diversi microRNA; si pensa che circa il 30% dei geni umani venga regolato dai microRNA (Chen XM, 2009). Un singolo miRNA è quindi capace di modulare l'espressione di molteplici pathways molecolari e conseguentemente di regolare le funzioni della cellula.

microRNA e Cancro

La deregolazione di questi piccoli RNA non codificanti è stata osservata in un'elevato numero di patologie umane, quali le malattie neurodegenerative, l'ipertrofia cardiaca, i disordini del sistema immunitario e altre.

Per quanto riguarda il cancro, le prime evidenze di una connessione tra questa patologia e i microRNA si ebbero nei primi anni del Duemila quando Calin e collaboratori osservarono che due geni di miRNA, il miR-15 e il miR-16, presentavano una ridotta espressione dovuta a delezioni e traslocazioni nel locus cromosomico 13q14.3 in circa il 70% degli individui affetti da leucemia linfatica cronica a cellule B (B-CLL) (Calin GA et al., 2002). Da quel momento numerosi gruppi si sono occupati di identificare delle "signature" di microRNA specifici per ogni tipo di tumore analizzato, tra cui i tumori alla mammella, al polmone, alla tiroide, il glioblastoma primario, i tumori al colon e numerosi altri; si è inoltre cercato di identificare quali potessero essere le alterazioni causanti una deregolazione dei miRNA nelle diverse tipologie di tumori umani.

E' così emerso che nel processo di cancerogenesi sono coinvolte specifiche anomalie che alterano l'espressione dei microRNA e possono incidere sul loro comportamento facendoli agire come oncogeni o come oncosoppressori anche in base alle proteine codificate dagli RNA messaggeri da loro bersagliati [Fig.5].

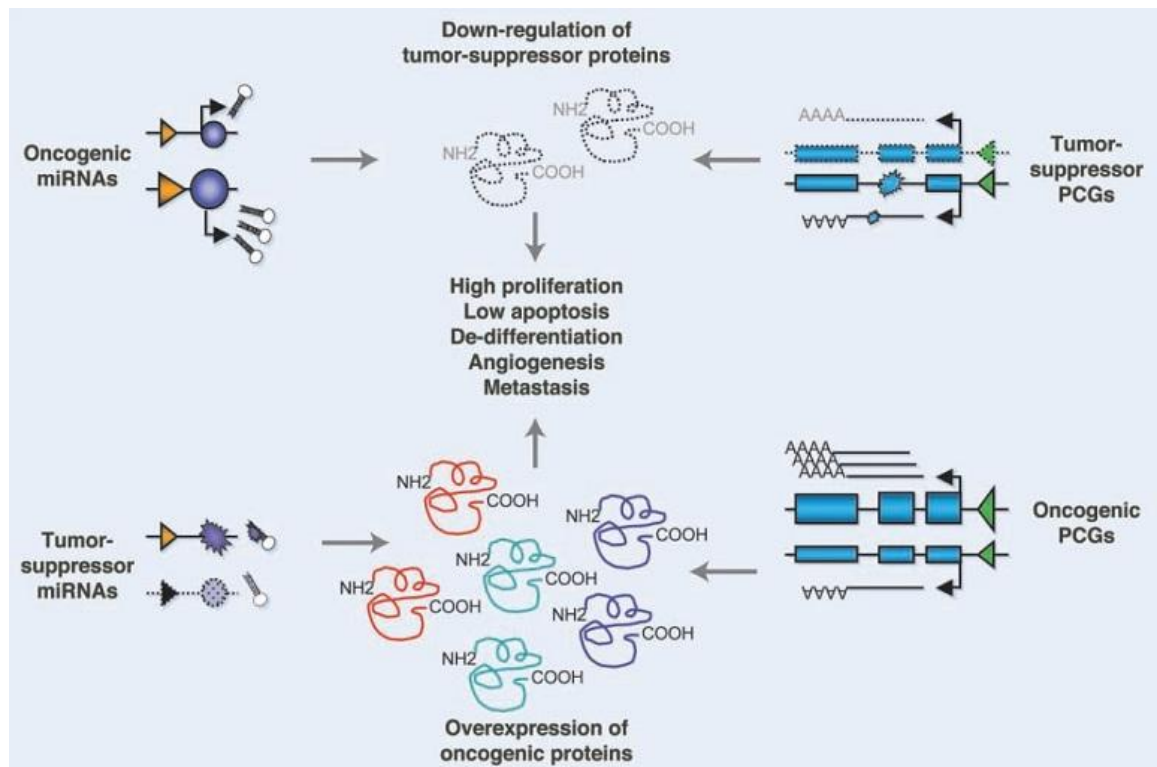


Fig.5: attivazione e inattivazione dei miRNA e loro regolazione dei geni codificanti proteine (PCG) nel processo di tumorigenesi umana (Calin GA and Croce CM, Cancer Res, 2006).

Queste sono le stesse di quelle precedentemente descritte per i geni codificanti proteine, ovvero riarrangiamenti cromosomici, amplificazioni e delezioni genomiche, mutazioni somatiche e della linea germinale, e modificazioni epigenetiche.

In aggiunta alle alterazioni genetiche ed epigenetiche, anche il danneggiamento di uno o più enzimi coinvolti nella biogenesi dei microRNA potrebbe causare la loro deregolazione; si è visto come i livelli di espressione dei complessi enzimatici Dicer e Drosha siano alterati in diversi tumori (*Melo SA and Esteller M, 2011*); un esempio è dato da studi effettuati in individui affetti da carcinoma a cellule squamose della cervice uterina, nei quali è stata riscontrata una iper-espressione del Drosha in più della metà dei campioni analizzati, dovuta probabilmente a un'amplificazione della regione del cromosoma 5 dove è localizzato il gene codificante l'enzima (*Muralidhar B et al., 2007*).

Sono diversi gli studi che hanno constatato come lo spettro dei microRNA espressi nelle cellule tumorali sia molto diverso se paragonato a quello della controparte di cellule normali (*Calin GA and Croce CM, 2006*); è stata inoltre documentata un'alterata espressione dei microRNA nelle cellule in fase pre-neoplastica; si è ad esempio visto che negli adenomi del colon vi è una ridotta espressione dei miR-143 e miR-145 (*Michael MZ et al., 2003*); negli adenomi ipofisari, un tipo di tumore benigno che mostra una delezione nel locus cromosomico 13q14.3, vi è invece una ridotta espressione dei miR-16-1 e miR-15a (*Bottoni A et al., 2005*). Inoltre, è stato dimostrato come il miRNA-221, altamente espresso nei tumori papillari tiroidei, sia molto espresso anche nella porzione tissutale normale adiacente al tumore, ma non nel tessuto tiroideo normale derivante da individui sani. Ciò porterebbe a ipotizzare che, in alcuni casi, il profilo genico di microRNA specifici per il cancro si ritrovi anche in eventi coinvolti nell'iniziazione del processo neoplastico (*He H et al., 2005*). La deregolazione dei microRNA svolge quindi un ruolo chiave in tutto il processo di cancerogenesi e raggiunge il culmine con lo sviluppo del cancro; un esempio di alcuni tra i miRNA coinvolti nello sviluppo dei tumori umani è riportato nella tabella 1 (*Melo SA and Esteller M, 2011*).

Un altro risultato degno di nota è stato ottenuto da alcuni studi effettuati in modelli preclinici e in pazienti malati di cancro, nei quali si è dimostrato che la patologia neoplastica coinvolge non solo i miRNA presenti a livello tissutale, ma anche i livelli dei microRNA circolanti nel flusso sanguigno e che specifici miRNA presenti nel siero possono essere associati a specifici tumori. Anche se quest'approccio necessita di ulteriori validazioni, tuttavia questa scoperta fa pensare a un futuro in cui si potrebbe rilevare la presenza di un tumore semplicemente misurando i livelli di miRNA sierici o plasmatici (*Zhu Q et al., 2012; Chen RX et al., 2012*).

I microRNA associati al cancro potrebbero quindi rappresentare un nuovo gruppo di possibili target da utilizzare nella strategia terapeutica antitumorale (*Giordano and Columbano A, 2012*).

Human miRNA	Deregulation in cancer
let-7 family (various)	Down-regulated in lung, breast, gastric, ovary, prostate and colon cancer
miR-10b (2q31.1, intergenic)	Overexpression in AML
miR-15a, miR-16-1 cluster (13q14.3, intron 4 non-coding RNA <i>DLEU2</i>).	Down-regulated in breast cancer. Overexpressed in metastatic breast cancer
miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-17-92 cluster (13q31.3, intron 3 <i>C13orf25</i>)	Down-regulated in CLL, DLBCL, multiple myeloma, pituitary adenoma, prostate and pancreatic cancer
	Up-regulated in nasopharyngeal carcinoma
	LOH at miR-17-92 locus in melanoma, ovarian and breast cancer
miR-26a (3p22.2)	Overexpression in lung and colon cancer, lymphoma, multiple myeloma, medulloblastoma
	Down-regulation in hepatocellular carcinomas
	Up-regulation in breast cancer
miR-106b-93-25 cluster (7q22.1)	Overexpression in gastric, colon and prostate cancer, neuroblastoma and multiple myeloma
miR-21 (17q23.1, 3'UTR <i>TMEM49</i>)	Overexpression in glioblastoma, breast, lung, prostate, colon, stomach, esophageal, and cervical cancer, uterine leiomyosarcoma, DLBCL, head and neck cancer
miR-29 family (various)	Down-regulation in CLL, colon, breast, and lung cancer and cholangiocarcinomas
	Up-regulation in breast cancer
miR-34 family (1p36.23, 11q23.1, intergenic)	Down-regulated in pancreatic cancer and Burkitt's lymphoma.
	Hypermethylation of miR-34b, c in colon cancer
miR-101 (1p31.3, 9p24.1)	Down-regulation in prostate cancer, hepatocellular carcinoma, and bladder cancer
miR-122a (18q21.31 intergenic)	Down-regulation in hepatocellular carcinoma
miR-124a family (various)	Hypermethylation in colon, breast, gastric and lung cancer, leukemia and lymphoma
miR-125a, miR-125b (various)	Down-regulation in glioblastoma, breast, prostate and ovarian cancer
	Up-regulation in myelodysplastic syndrome and AML
miR-127 (14q32, <i>RTL1</i> exon)	Hypermethylation in tumor cell lines
miR-143, miR-145 cluster (intergenic 5q32)	Down-regulated in colon adenoma/carcinoma, in breast, lung, and cervical cancer, in B-cell malignancies
miR-155 (21q21.3, exon 3 ncRNA <i>BIC</i>)	Overexpressed in pediatric Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, primary mediastinal lymphoma, DLBCL, breast, lung, colon, pancreatic cancer
miR-181 family (various)	Overexpressed in breast, pancreas, and prostate cancer
miR-221, miR-222 cluster (Xp11.3, intergenic)	Overexpressed in CLL, thyroid papillary carcinoma, glioblastoma. Down-regulated in AML
miR-200 family (various)	Down-regulated in clear-cell carcinoma, metastatic breast cancer
miR-205 (1q32.2)	Overexpression in NSCLC
	Down-regulated in prostate cancer
miR-372, miR-373 cluster (19q13.41, intergenic)	Overexpression in testicular cancer

■ Antitumorigenic; ■ Oncogenic.

Tab.1: microRNA deregolati nei tumori umani (*Melo SA and Esteller M, FEBS Letters, 2011*).

microRNA e Carcinoma Epatocellulare

Tra i vari studi effettuati, sono molti quelli che recentemente si sono focalizzati sui microRNA deregolati nell'HCC umano. I risultati ottenuti hanno mostrato come alcuni di essi siano specificamente alterati nelle cellule e nei tessuti tumorali rispetto agli epatociti e ai tessuti sani. Approfondire il ruolo di questi microRNA potrebbe quindi fornire ulteriori spiegazioni sui processi coinvolti nella trasformazione neoplastica e nel comportamento maligno delle cellule epatiche.

L'alterata espressione di alcuni microRNA è stata associata non solo all'HCC ma anche ai suoi caratteristici fattori di rischio. Il miR-96 è stato ad esempio posto in correlazione con l'infezione da virus dell'epatite B, mentre il miR-126* con un elevato consumo di alcool. In individui con HCC portatori di HCV e aventi cirrosi epatica è stata riscontrata una iper-espressione dei miRNA-122, -100 e -10a e al contrario una ipo-espressione dei miRNA-198 e -145 rispetto al normale parenchima epatico (*Chen XM, 2009*). Tra i miRNA i cui livelli risultano incrementati nel carcinoma epatocellulare troviamo: il miR-21, il miR-34a, il miR-221/222 e il miR-224. Allo

stesso modo, diversi studi hanno identificato dei microRNA la cui espressione è invece diminuita, e tra questi citiamo: il miR-122, il miR-145 e il miR-199a (Braconi C and Patel T, 2008).

Ci sono evidenze le quali dimostrano che i miRNA hanno un ruolo importante anche nella progressione dell'HCC; un esempio è dato da uno studio condotto da Murakami e collaboratori i quali, attraverso l'analisi di 24 HCC e dei rispettivi tessuti non tumorali ad essi adiacenti, hanno non solo identificato un set di miRNA iper e ipo-espressi nei campioni tumorali rispetto alla controparte sana, ma hanno inoltre trovato una correlazione inversa tra i livelli di espressione di alcuni microRNA (miRNA-92, -20, -18 e il precursore del miRNA-18) e il grado di differenziamento del carcinoma epatocellulare, suggerendo un coinvolgimento di specifici miRNA nella progressione della patologia (Murakami Y et al., 2006).

Essendo coinvolti nella progressione del tumore, i microRNA svolgono un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nei processi di invasione e metastatizzazione tumorale [Fig.6] (Huang S and He X, 2011).

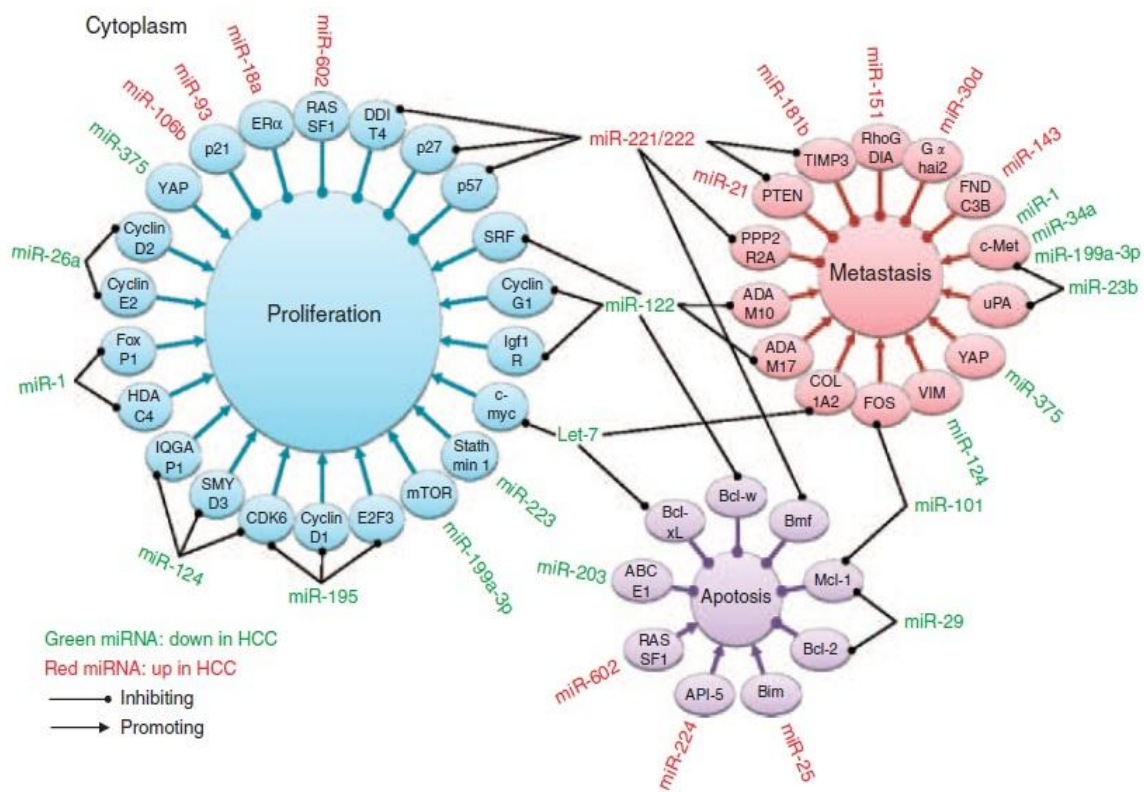


Fig.6: insieme dei microRNA e dei loro geni target coinvolti nei meccanismi che permettono la progressione dell'HCC (Huang S and He X, British Journal of Cancer, 2011).

E' stato ad esempio dimostrato come le cicline, una famiglia di proteine le quali regolano la progressione del ciclo cellulare attraverso l'attivazione di specifiche chinasi, e le chinasi ciclina dipendenti (CDK) possano subire l'azione di determinati microRNA; tra questi il miRNA-26a, la

cui espressione è ridotta nell'HCC, ha la capacità di targettare e reprimere l'azione di entrambe le cicline D2 ed E2 determinando in questo modo l'arresto del ciclo cellulare (Kota J *et al.*, 2009).

Per quanto riguarda il processo apoptotico, crescenti evidenze riportano come ci siano diversi microRNA che bersagliano i geni della famiglia Bcl-2 codificanti per proteine con azione pro e anti-apoptotica; questi miRNA "aiuterebbero" le cellule cancerose a evitare la morte cellulare programmata. Mentre in condizioni normali si ha, ad esempio, una riduzione dei livelli proteici della proteina anti-apoptotica Bcl-w da parte del miRNA-122 (Lin CJ *et al.*, 2008), o della Bcl-xL da parte della famiglia let-7 (Shimizu S *et al.*, 2010), nell'HCC si ha una ridotta espressione di questi miRNA e ciò determina una maggiore resistenza delle cellule tumorali ai segnali apoptotici. Diversi studi hanno identificato anche un coinvolgimento dei microRNA nel processo di invasione e metastasi. Nel 2007, Meng ha dimostrato per primo come un'alterata espressione del miR-21 determinasse non solo lo sviluppo, ma anche l'invasione dell'HCC attraverso una sua azione diretta sul messaggero codificante il soppressore tumorale PTEN (omologo della fosfatasi e della tensina); il miR-21 può infatti alterare la fosforilazione della chinasi di adesione focale (FAK) e l'espressione delle metalloproteasi della matrice MMP2 e MMP9, mediatori a valle di PTEN, e promuovere in tal modo i processi di migrazione cellulare ed invasione (Meng F *et al.*, 2007). Allo stesso modo Budhu e collaboratori hanno sottolineato l'importanza di una signature di 20 miRNA in grado di distinguere tra HCC primari con metastasi venose e tumori solitari privi di metastasi; in aggiunta, un'analisi predittiva ha rivelato che la maggior parte dei miRNA identificati sono associati con il grado di sopravvivenza dei pazienti alla patologia (Budhu *et al.*, 2008).

Risultati contrastanti sono stati recentemente ottenuti da Wong e collaboratori, che non hanno osservato differenze tra HCC primari con o senza metastasi venose, bensì una marcata riduzione globale dei livelli di espressione dei microRNA nelle metastasi venose rispetto all'HCC primario. Questi dati suggeriscono che la deregolazione dei miRNA è un evento abbastanza precoce nel processo di cancerogenesi e che l'ulteriore riduzione dei livelli di espressione dei miRNA peggiora una pre-esistente deregolazione e promuove lo sviluppo delle metastasi (Wong CM *et al.*, 2012).

Nel loro insieme, i risultati ottenuti hanno rivelato l'elevata importanza del contributo fornito dai microRNA nello sviluppo e nella progressione del carcinoma epatocellulare. L'utilizzo di una classificazione basata sui miRNA che correla con l'eziologia, le modificazioni patogenetiche o la predisposizione alla malignità, potrebbe promuovere lo sviluppo di diagnosi molecolari e permetterebbe un'ulteriore definizione di questi fenotipi. Ciò potrebbe condurre ad un possibile utilizzo dei microRNA nella clinica in qualità di marcatori diagnostici predittivi del comportamento del tumore.

Ruolo dei microRNA nella clinica

L'interesse nel voler caratterizzare al meglio i microRNA, è nato non solo dalla necessità di una più approfondita conoscenza dei meccanismi molecolari che stanno alla base dell'epatocancerogenesi, ma anche dal loro potenziale utilizzo in terapia.

MicroRNA e risposta alla terapia farmacologica

Uno dei fattori che influisce maggiormente sulla sopravvivenza dei pazienti con carcinoma epatocellulare è la resistenza ai trattamenti terapeutici. Sono numerosi gli studi che hanno dimostrato un coinvolgimento dei microRNA nei meccanismi correlati alla sensibilità dei vari tipi tumorali alla terapia.

Per quanto riguarda l'HCC è stato visto, ad esempio, come il re-inserimento del miR-122 in linee cellulari di epatocarcinoma renda le cellule sensibili al trattamento con adriamicina e vincristina per mezzo dell'ipo-espressione del gene antiapoptotico Bcl-w e della ciclina B1 (*Xu Y et al., 2011*). Recentemente, molti studi hanno dimostrato che la resistenza alla chemioterapia è spesso dovuta ad un'alterata espressione dei trasportatori dei farmaci. E' stato infatti visto che negli HCC si ha un'iper-espressione dei trasportatori ABC (adenosine triphosphate-binding cassette) associata ad una ipo-espressione di diversi microRNA; in particolare è stata osservata, in campioni di HCC umani, un'iper-espressione di 5 geni ABC che sembra essere mediata da 13 microRNA (*Borel F et al., 2012*).

Le terapie molecolari si sono recentemente inserite nel contesto clinico e hanno dimostrato una buona efficacia in vari tipi di tumori, anche se solitamente la resistenza al trattamento insorge poco dopo l'inizio della terapia. Nell'HCC le terapie biologiche più utilizzate sono l'interferone e il sorafenib; la risposta all'interferone è stata vista essere influenzata dal miR-146a che induce resistenza al trattamento attraverso l'ipo-espressione del gene SMAD4 (*Tomokuni A et al., 2011*), e dal miR-26 la cui ridotta espressione aumenta la risposta dei pazienti alla terapia (*Ji J et al., 2009*).

MicroRNA come target terapeutici

Molti studi in vitro e preclinici sono stati eseguiti mediante tecniche di re-introduzione o di inibizione, nelle cellule tumorali, di microRNA aventi funzione rispettivamente oncosoppressoria od oncogenica; questi trattamenti hanno spesso comportato una riduzione della proliferazione cellulare e dell'invasione o un incremento dell'apoptosi cellulare. Questo implica che i microRNA (nel caso degli oncosoppressori) o i loro inibitori (nel caso di miRNA oncogenici) possono essere utilizzati nella terapia. Uno dei principali vantaggi nel modulare l'espressione dei microRNA piuttosto che quella dei geni, deriva dal fatto che questi piccoli RNA non codificanti hanno la

capacità di regolare contemporaneamente l'espressione di molti geni target e diverse vie del segnale (*Giordano S and Columbano A, 2012*).

Per quanto riguarda l'HCC sono numerosi gli studi che hanno dimostrato il ruolo dei microRNA come target terapeutici. Recentemente due studi hanno mostrato l'efficacia del miR-221 come target terapeutico nell'HCC (*Park JK et al., 2011; Callegari E et al., 2012*). In entrambe le ricerche sono stati somministrati, per via sistemica, o l'isoforma modificata del miR-221 (*Park JK et al., 2011*) o l'antagomiR-221 (*Callegari E et al., 2012*); entrambi hanno prodotto un effetto antitumorale che ha aumentato la sopravvivenza dei topi e una riduzione del numero e delle dimensioni dei noduli tumorali.

Inoltre, è stato dimostrato come la somministrazione del miR-124 sia capace di inibire lo sviluppo dell'HCC indotto dalla DENA in topi, suffragando l'ipotesi che la somministrazione sistemica del miR-124 possa rappresentare un approccio terapeutico antitumorale funzionale.

Nonostante gli innumerevoli studi riguardanti i miRNA abbiano portato a risultati incoraggianti e abbiano contribuito ad accrescere la nostra conoscenza sullo sviluppo e sulla progressione del carcinoma epatocellulare, siamo tuttavia ancora lontani dall'aver il quadro completo dei meccanismi molecolari attraverso i quali i miRNA, insieme ai geni codificanti proteine, controllano il processo di tumorigenesi.

Essendo l'epatocancerogenesi un processo multifasico, resta inoltre da capire se la deregolazione dei geni e dei microRNA coinvolti nell'HCC rappresenti un evento causale per lo sviluppo e la progressione del tumore o se la loro alterazione sia semplicemente una conseguenza delle modificazioni metaboliche e strutturali alle quali vanno incontro le cellule trasformate.

Per chiarire questo punto, gli studi dovrebbero analizzare le modificazioni che si manifestano nelle fasi iniziali del processo di cancerogenesi epatica; sfortunatamente nell'uomo vi è un'elevata difficoltà clinica nel diagnosticare lo stadio in cui sono presenti solo lesioni precoci e conseguentemente è complicato riuscire ad ottenere del materiale da queste al fine di svolgere gli studi necessari a chiarire i meccanismi molecolari che stanno alla base del processo multifasico di cancerogenesi epatica.

Considerate le suddette difficoltà, si rivela quindi necessario l'utilizzo di modelli animali di epatocancerogenesi che possano essere d'aiuto nell'identificazione, nell'isolamento e nella successiva analisi di specifiche lesioni ottenute nelle diverse fasi del processo di cancerogenesi.

Modelli di Epatocancerogenesi Sperimentale

Modello di Solt-Farber o dell'Epatocita Resistente

Tra i modelli sperimentali più utilizzati per la caratterizzazione del processo di cancerogenesi epatica, nella nostra ricerca è stato utilizzato il Modello dell'Epatocita Resistente o Modello di Solt & Farber, il quale ci ha permesso di effettuare un'analisi sequenziale delle diverse fasi che portano allo sviluppo dell'HCC utilizzando il ratto come modello sperimentale (*Solt DB et al., 1977*).

Il protocollo sperimentale, prevede che gli animali (ratti Fisher maschi F-344, Charles River, Milano) vengano sottoposti alla somministrazione intraperitoneale di una singola dose necrogenica dell'agente iniziante dietilnitrosamina (DENA, 150 mg/kg) seguita, dopo due settimane, da un regime promuovente necessario per la selezione degli epatociti resistenti. Questo, prevede una durata di 15 giorni ed è costituito da una dieta addizionata col mito-inibitore 2-acetilaminofluorene (2-AAF, 0.02%), più una epatectomia parziale (PH) dei 2/3 del fegato che viene effettuata tra la prima e la seconda settimana di trattamento con il 2-AAF. Terminato il regime promuovente, i ratti vengono rimessi in una dieta standard fino al momento del sacrificio.

Il mitoinibitore 2-AAF ha la funzione di inibire completamente la proliferazione degli epatociti normali, mentre è inefficace nei confronti degli epatociti precedentemente iniziati dalla DENA. Le cellule iniziate vanno rapidamente incontro ad espansione clonale e formano lesioni pre-neoplastiche identificabili grazie alla loro positività alla colorazione immunohistochimica per la forma placentare dell'enzima glutatione-S-transferasi (GST-P). Nelle settimane successive i noduli assumono dimensioni apprezzabili macroscopicamente, sino ad occupare la maggior parte del fegato. Successivamente, in gran parte delle lesioni pre-neoplastiche gli epatociti perdono gradualmente la colorazione per il GST-P, riacquisendo un fenotipo differenziato. Queste lesioni pre-neoplastiche, attraverso un processo detto di rimodellamento, si reintegrano nel parenchima circostante. Una minima frazione dei noduli pre-neoplastici progredisce col tempo a formare adenomi e dopo 10-14 mesi, si ha la comparsa di carcinomi epatocellulari.

Studi condotti nel nostro laboratorio hanno portato all'identificazione, tra i noduli pre-neoplastici positivi alla colorazione per il GST-P, di una sottopopolazione di noduli persistenti che esprimono la proteina dei filamenti intermedi citocheratina 19 (KRT-19) (*Andersen JB et al., 2010*). La KRT-19 viene normalmente espressa, nel fegato adulto, dalle cellule epiteliali dei dotti biliari, ma non dagli epatociti. Un'espressione alterata di questo filamento intermedio da parte degli epatociti può essere osservata durante lo sviluppo di foci di rigenerazione nella cirrosi e durante la proliferazione di cellule progenitrici epatiche in vitro (*Su Q et al., 2003*). Inoltre, è stato visto come

tra le sottoclassi di HCC definibili secondo criteri molecolari, la variante di HCC caratterizzata dalla espressione della proteina citocheratina-19 presenta la peggiore prognosi (*Lee JS et al., 2006*). Lo studio del profilo di espressione genica delle lesioni pre-neoplastiche positive per la KRT-19 ha dimostrato che esse posseggono il maggiore potenziale di progressione fino allo stadio di HCC, dando origine alla quasi totalità degli HCC generati nel modello dell'Epatocita Resistente (*Andersen J.B. et al., 2010*).

Scopo della Ricerca

Lo scopo del presente studio è stato quello di effettuare un'analisi integrata del profilo di espressione globale dei geni e dei microRNA attraverso l'utilizzo del modello di epatocancerogenesi sperimentale dell'Epatocita Resistente. Questo approccio consente infatti di identificare le interazioni esistenti tra i microRNA e gli RNA messaggeri da essi regolati al fine di identificare potenziali biomarcatori e target terapeutici.

In particolare ci siamo proposti di:

- identificare i geni e i microRNA che mostrano un'alterata regolazione durante il processo multifasico di cancerogenesi epatica, focalizzando la nostra attenzione sulle meno note fasi pre-neoplastiche precoci;
- stabilire un profilo di espressione dell'RNA messaggero per l'identificazione e la caratterizzazione funzionale di specifiche vie del segnale molecolari implicate nelle diverse fasi del processo di epatocancerogenesi;
- analizzare le relazioni esistenti tra gli RNA messaggeri e i microRNA al fine di identificare dei networks integrati che sono alterati nelle fasi iniziali del processo e si mantengono alterati lungo tutta la progressione tumorale;
- effettuare un'analisi comparata tra mRNA e miRNA trovati deregolati nelle lesioni pre-neoplastiche e neoplastiche nel ratto e quelle identificate negli HCC umani.

Materiali e Metodi

Animali

Per gli esperimenti sono stati utilizzati ratti Fisher maschi F-344 (Charles River, Milano), aventi peso corporeo di circa 100-125 grammi e alimentati con una dieta standard (Mucedola, Milano).

Prima di iniziare le procedure sperimentali gli animali sono stati sottoposti ad una settimana di adattamento con le seguenti condizioni di stabulazione: ciclo luce-buio di 12 ore, temperatura costante di 25°C e disponibilità *ad libitum* di acqua e cibo. Durante lo studio sono state rispettate le Linee Guida per la Cura e l'Utilizzo degli Animali da Laboratorio e tutte le procedure sono state approvate dal Comitato Etico dell'Università di Cagliari e dal Ministero Italiano della Sanità.

Protocollo Sperimentale

I ratti appartenenti al gruppo sperimentale sono stati trattati in accordo col protocollo dell'Epatocita Resistente [Fig.7]. Essi sono stati sottoposti ad una singola dose necrogenica, pari a 150 mg/kg di peso corporeo, dell'agente iniziante dietilnitrosamina (DENA) (Sigma, Milano); questa è stata disciolta in soluzione salina ed iniettata in cavità peritoneale. Dopo due settimane dal trattamento iniziante gli animali sono stati sottoposti al regime di promozione di Solt & Farber (*Solt DB et al., 1977*): per 15 giorni è stata somministrata una dieta contenente il mitoinibitore 2-acetilamminofluorene (2-AAF) (Sigma, Milano) allo 0,02% e tra la prima e la seconda settimana di dieta, al fine di stimolare la rigenerazione epatica, è stata praticata una epatectomia parziale (PH) dei 2/3 del fegato sotto anestesia generale indotta con dietiletere, secondo la metodica descritta da Higgins (*Higgins G.M., 1931*). Trascorse le 2 settimane di regime promovente, i ratti sono stati ricondotti alla dieta basale.

Un gruppo addizionale di animali, per il quale sono stati omessi sia il trattamento iniziante che quello promuovente, è stato utilizzato come gruppo di controllo.

Gli animali appartenenti a ciascun gruppo sperimentale (trattati e controlli), sono stati suddivisi in tre sottogruppi e sacrificati a 3 tempi diversi:

- il primo sottogruppo è stato sacrificato, insieme ai relativi controlli, dopo 10 settimane dalla somministrazione della DENA per valutare la presenza di lesioni pre-neoplastiche precoci GST-P positive e KRT-19 positive e negative;
- il secondo sottogruppo è stato sacrificato, insieme ai relativi controlli, dopo circa 10 mesi dall'iniziazione al fine di valutare la presenza di adenomi (Ade) ed eventuali carcinomi epatocellulari precoci (eHCC);

- il terzo sottogruppo è stato sacrificato, insieme ai relativi controlli, dopo 14 mesi dall'iniziazione, tempo in cui gli animali sottoposti al protocollo RH sviluppano carcinomi epatocellulari in stadio avanzato (aHCC) spesso associati a metastasi polmonari.

I carcinomi epatocellulari scelti per l'analisi sono stati selezionati sulla base dei criteri proposti in "Histologic Typing of Liver Tumors of the Rat" (Stewart HLW, 1980).

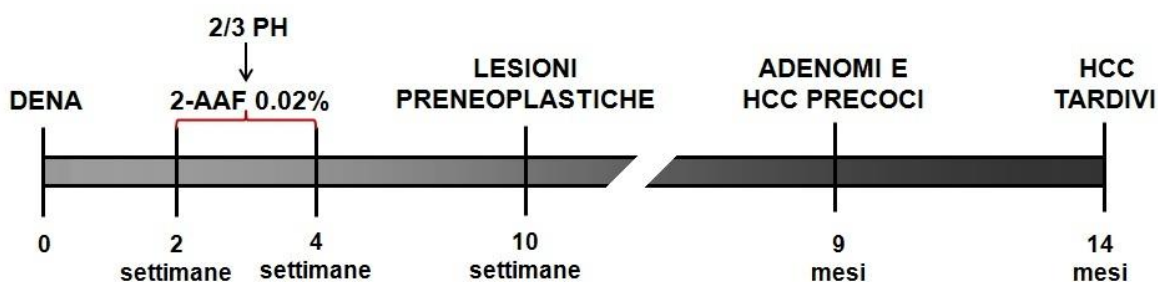


Fig.7: protocollo sperimentale dell'Epatocita Resistente (RH) o di Solt & Farber.

Istologia e Immunoistochimica

Preparazione del tessuto

Al momento dei sacrifici, il fegato prelevato da ogni animale è stato diviso, attraverso l'uso di un bisturi, in vari pezzi i quali sono stati trattati secondo 3 diverse modalità:

- alcuni pezzi sono stati fissati in formalina al 10% per 24 ore e successivamente sottoposti a processazione; in quest'ultima, sono stati disidratati attraverso una scala crescente degli alcoli, "chiarificati" in Histo-Clear, immersi in paraffina sciolta a caldo (60°C) ed inclusi in blocchetti i quali sono stati conservati a temperatura ambiente fino al momento del taglio al microtomo;
- altri pezzi sono stati rapidamente criofissati: sono stati infatti immersi per circa 15 secondi in un recipiente contenente isopentano il quale è stato raffreddato mediante immersione del recipiente in azoto liquido; sono stati poi conservati alla temperatura di -80°C fino al momento del taglio al criostato;
- altri ancora sono stati congelati in azoto liquido e anch'essi conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

Colorazione con Ematossilina ed Eosina

I preparati di fegato inclusi in paraffina sono stati tagliati, mediante l'utilizzo del microtomo, in sezioni dello spessore di 4 µm, queste sono state stese su appositi vetrini, "sparaffinate" prima in stufa e poi immergendole in xilene, e quindi reidratate in una scala decrescente degli alcoli. Le sezioni sono state colorate per 15 minuti circa con ematossilina Carazzi e successivamente con

eosina. E' quindi avvenuta la disidratazione attraverso una serie ascendente di alcoli ed è stato successivamente montato il vetrino coprioggetto.

Immunoistochimica per la proteina GST-P

La colorazione immunoistochimica per la proteina GST-P (Glutathione-S-Transferasi-Placentare) è stata eseguita su sezioni aventi uno spessore di 6 μm ottenute mediante taglio al criostatato. Queste sono state fissate in acetone freddo (-20°C) per 20 minuti e lasciate asciugare a temperatura ambiente. Dopo essere state lavate 2 volte in tampone PBS (Phosphate Buffered Saline), è stato effettuato il blocco delle perossidasi endogene mediante incubazione col reagente Peroxidase Block (DAKO, Milano) per 10 minuti. E' seguita un'altra fase di lavaggio che ha preceduto il blocco dei siti aspecifici mediante incubazione delle sezioni per 1 ora in camera umida a temperatura ambiente con *normal goat serum* diluito in rapporto 1:10 con la soluzione tampone PBS. Le sezioni sono state poi incubate per tutta la notte in camera umida a $+4^{\circ}\text{C}$ con l'anticorpo anti-GST-P (Mannan-Binding Lectin Antibodies, MBL, Germania) sviluppato in *rabbit*, ad una diluizione di 1:1000 in tampone PBS. Il giorno seguente, dopo 2 lavaggi in soluzione tampone, l'antigene è stato rivelato mediante l'incubazione delle sezioni con l'anticorpo secondario *anti-rabbit* coniugato con *Horseradish Peroxidase* (HRP) (DAKO EnVision, Milano) per 30 minuti in camera umida a temperatura ambiente, seguita dall'aggiunta del cromogeno 3,3-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB). Le sezioni sono state controcolorate con ematossilina di Harris e disidratate mediante scala crescente degli alcoli. Al termine della colorazione immunoistochimica è stato montato il coprioggetto in modo da rendere i vetrini disponibili alla visualizzazione al microscopio.

Immunoistochimica per la proteina KRT-19

La colorazione immunoistochimica per la proteina KRT-19 (Citocheratina-19) è stata anch'essa eseguita su sezioni criostatate dello spessore di 6 μm fissate in acetone freddo per 20 minuti. Le perossidasi endogene e i siti aspecifici sono stati bloccati eseguendo la stessa procedura utilizzata nella colorazione immunoistochimica per l'enzima GST-P. Successivamente le sezioni sono state incubate per 2 ore e 45 minuti in camera umida a temperatura ambiente con l'anticorpo primario anti-KRT-19 (Novocastra, Leica Biosystems, Milano) sviluppato in *mouse* e diluito 1:50 con tampone PBS. Le sezioni sono state quindi lavate in tampone PBS, incubate per 45 minuti con anticorpo secondario *anti-mouse* coniugato col sistema HRP diluito 1:200 in PBS, e rivelate grazie a una soluzione contenente la DAB la quale ha evidenziato la colorazione. Le sezioni sono state

controcolorate con ematossilina di Harris, disidratate e successivamente è stato montato il coprioggetto.

Laser Capture Microdissection

L'identificazione delle lesioni sviluppate a partire dalla decima settimana dall'iniezione dell'agente iniziante DENA fino al termine del protocollo di Solt-Farber, è avvenuta per mezzo delle colorazioni immunohistochimiche per l'enzima GST-P e la proteina KRT-19 precedentemente descritte.

Per quanto riguarda l'isolamento delle lesioni pre-neoplastiche precoci, degli adenomi e degli HCC precoci, al momento del taglio al criostato, oltre a sezioni dello spessore di 6 μm , sono state tagliate anche sezioni seriali di spessore di 15 μm che sono state montate su particolari vetrini PEN-Membrane (Leica Biosystems, Milano). Queste sono state utilizzate per la microdissezione avvenuta utilizzando il microscopio laser Leica LMD6000 [Fig.8].

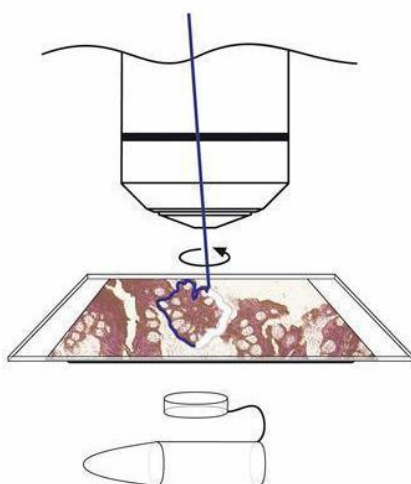


Fig.8: dissezione mediante il microscopio laser Leica LMD6000.

Immediatamente prima di eseguire la dissezione ogni sezione è stata rapidamente idratata, colorata con Cresyl Violetto e disidratata. Questo passaggio è stato effettuato al fine di individuare la localizzazione delle lesioni di nostro interesse, le quali erano state precedentemente identificate sulle sezioni seriali sottoposte all'IIC per la GST-P e la KRT-19.

Si è successivamente proceduto con la dissezione dell'area interessata, eseguita al massimo in 20 minuti per evitare la degradazione dell'RNA. Le lesioni epatiche isolate sono state divise in 2 gruppi ognuno dei quali è stato trattato con un diverso tampone di estrazione:

- le lesioni appartenenti al primo gruppo sono state trattate con 50 μl di Extraction Buffer (XP) PicoPure, centrifugate a 16100 x g per 5" e incubate per 30' a 42°C per ottenere la lisi del tessuto disseccato. I campioni così omogenati sono stati centrifugati a 800 x g per 2' e

- conservati a -80°C in attesa di essere utilizzati per l'estrazione dell'RNA totale col kit PicoPure (Arcturus, Life Technologies, Monza);
- alle lesioni appartenenti al secondo gruppo sono stati invece aggiunti 50 µl di Lysis Buffer (LB) mirVana; i tubini contenenti i dissecati più il tampone di estrazione sono stati centrifugati a 16100 x g per 5" e conservati a -80°C in attesa di essere utilizzati per l'estrazione dell'RNA totale col kit mirVana (Ambion, Life Technologies, Monza).

Isolamento dell'RNA dalle lesioni epatiche

L'RNA proveniente dalle lesioni pre-neoplastiche ed epatiche precoci microdissezionate e dai rispettivi fegati sani di controllo, è stato isolato mediante l'utilizzo di 2 diversi kit di estrazione. La scelta del kit da utilizzare è stata effettuata in base al tipo di analisi cui sarebbe dovuto andare incontro l'RNA estratto, ovvero: analisi dell'espressione genica (kit PicoPure) o analisi dell'espressione dei microRNA (kit mirVana).

Estrazione dell'RNA col kit PicoPure

Previo pretrattamento delle colonnine di estrazione con Conditioning Buffer (CB), su queste sono stati applicati i 50 µl di campione contenente il tessuto dissezionato e il tampone usato al momento della dissezione, addizionati con altri 50 µl di Extraction Buffer; sono poi stati aggiunti 100 µl di etanolo al 70%. I campioni sono stati centrifugati e dopo tre passaggi di lavaggio con Wash Buffer, l'RNA è stato eluito in 20 µl d'acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC).

Estrazione dell'RNA col kit mirVana

Dopo aver portato il volume del Lysis Buffer a 300 µl, al lisato sono stati aggiunti 30 µl di miRNA Homogenate Additive. Sono stati successivamente addizionati alle colonnine 300 µl di fenolo-acido:cloroformio:alcol isoamilico (125:24:1) e il tutto è stato vortexato e centrifugato. In seguito alla centrifugata è stato possibile osservare una divisione in fasi delle soluzioni; la fase acquosa contenente l'RNA è stata prelevata e trasferita in nuovi tubini e a questa sono stati addizionati 1,25 volumi di etanolo al 100%. I campioni sono stati centrifugati e dopo tre passaggi di lavaggio con Wash Buffer, l'RNA è stato eluito in 100 µl di acqua DEPC pre-riscaldata a 95°C.

Estrazione RNA totale dagli HCC tardivi e dai fegati di controllo

L'RNA totale proveniente dagli HCC tardivi (14 mesi) e dai rispettivi fegati di controllo è stato estratto a partire da pezzi di fegati congelati in azoto liquido al momento del sacrificio. Da ciascun pezzo, sottoposto a frantumazione meccanica in un mortaio raffreddato, è stato prelevato un frammento delle dimensioni comprese tra gli 80 e i 100 mg. A ciascun frammento è stato

addizionato 1 ml di TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen, Life Technologies, Monza); il tutto è stato omogenato con un Polytron per qualche secondo, centrifugato per 10 minuti a 12000 x g in una centrifuga refrigerata a 4°C e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. I campioni sono quindi stati trattati con 200 µl di cloroformio (per ml di Trizol utilizzato), vortexati per 15" e incubati a temperatura ambiente per 2-3 minuti circa; sono stati poi centrifugati per 15 minuti a 12000 x g allo scopo di ottenere una separazione della soluzione in 3 fasi: una fase superiore contenente l'RNA, un disco biancastro intermedio contenente il DNA e una fase inferiore contenente le proteine. Al termine della centrifugata la fase acquosa superiore contenente l'RNA è stata prelevata, trasferita in un nuovo tubino e miscelata delicatamente con 500 µl di isopropanolo (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Francia); i tubini sono stati incubati a temperatura ambiente per 10 minuti e centrifugati per 10 minuti a 12000 x g per consentire la precipitazione dell'RNA. L'RNA precipitato, visibile sotto forma di pellet nel fondo dei tubini, è stato lavato con 1 ml di etanolo al 75%, centrifugato per 5 minuti a 7500 x g, fatto asciugare all'aria e successivamente risospeso in un quantitativo d'acqua DEPC che è variato in base alla grandezza del pellet ottenuto (Gibco, Life Technologies, Milano).

Al fine di eliminare completamente i proteoglicani e i polisaccaridi (glicogeno) che potevano interferire con l'ibridazione dei campioni durante la preparazione dei chip Illumina per l'analisi dell'espressione genica, l'RNA eluito è stato sottoposto ad un ulteriore processo di purificazione condotto utilizzando sodio acetato 3M ad un pH di 5.2. E' stata infine effettuata una seconda precipitazione in etanolo al 75%, al termine della quale l'RNA sotto forma di pellet è stato fatto asciugare all'aria e successivamente risospeso in acqua DEPC.

Valutazione quantitativa e qualitativa dell'RNA proveniente dalla microdissezione

Un'aliquota (1.2 µl) dell'RNA totale estratto dai noduli pre-neoplastici, dagli adenomi, dagli HCC precoci e tardivi e dai rispettivi controlli è stata utilizzata per valutare la concentrazione e la purezza dell'RNA mediante l'utilizzo dello strumento NanoDrop1000 (Thermo Scientific, Francia): l'assorbanza a 260 nm (lunghezza d'onda di assorbimento massima degli acidi nucleici) ha permesso di valutare la concentrazione degli RNA misurati, mentre il rapporto tra la lettura a 260 e quella a 280 nm (lunghezza d'onda di assorbimento massima delle proteine) ha consentito di valutare la purezza dei campioni; per essere considerato accettabile tale rapporto deve essere compreso tra 1.8 e 2.0.

La qualità dell'RNA è stata invece valutata analizzando 1 µl di campione mediante lo strumento Bioanalyzer2100 (Agilent Technologies, Milano). Tale strumento opera una microelettroforesi del campione e fornisce un indice di integrità dell'RNA (RNA Integrity Number, RIN), ovvero un valore numerico che può essere compreso tra 0 e 10 a seconda di quanto l'RNA che si sta analizzando è degradato; un RIN=0 indica una completa degradazione mentre un RIN=10 è indice di ottima qualità. Nel nostro studio, sono stati ulteriormente processati solo i campioni che presentavano un RIN \geq 6.

Microarrays

Per l'analisi dell'espressione genica è stato utilizzato l'RNA totale estratto mediante il Trizol[®] Reagent e il kit PicoPure, le cui procedure sono state precedentemente descritte. L'analisi del trascrittoma è stata effettuata utilizzando i Microarrays Illumina BeadChip contenenti 21791 sonde oligonucleotidiche gene-specifiche. Sono stati preparati in totale 4 chip che hanno permesso lo studio di 48 campioni suddivisi nei seguenti gruppi:

- 10 campioni ottenuti da fegato di ratti F-344 non trattati utilizzati come **controlli assoluti**; di questi: 4 sono stati utilizzati come controlli degli animali sacrificati dopo 10 settimane dall'iniziazione, 3 sono stati utilizzati come controlli degli animali sacrificati dopo 10 mesi dall'iniezione della DENA e altri 3 sono stati utilizzati come controlli degli animali sacrificati dopo 14 mesi dall'iniezione della DENA;
- 10 campioni ottenuti da pool di lesioni **pre-neoplastiche KRT-19-** microdissecate da sezioni di fegato di ratti F-344 sottoposti al protocollo di Solt & Farber e sacrificati dopo 10 settimane dall'iniezione della DENA;
- 10 campioni ottenuti da pool di **lesioni pre-neoplastiche KRT-19+** microdissecate da sezioni di fegato di ratti F-344 sottoposti al protocollo di Solt & Farber e sacrificati dopo 10 settimane dall'iniezione della DENA;
- 4 campioni ottenuti da pool di **adenomi** microdissecati da sezioni di fegato di ratti F-344 sottoposti al protocollo di Solt & Farber e sacrificati dopo 10 mesi dall'iniezione della DENA;
- 5 campioni ottenuti da pool di **HCC precoci** microdissecati a partire da sezioni di fegato di ratti F-344 sottoposti al protocollo di Solt & Farber e sacrificati dopo 10 mesi dall'iniezione della DENA;
- 9 campioni ottenuti da **HCC tardivi** estratti da fegato di ratti F-344 sottoposti al protocollo di Solt & Farber e sacrificati dopo 14 mesi dall'iniezione della DENA.

Amplificazione dell'RNA

Per ogni campione (o pool di campioni) sono stati amplificati 150 ng di RNA tramite l'utilizzo dell'Illumina® TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, Life Technologies, Milano).

Il protocollo di amplificazione ha previsto le seguenti fasi:

- trascrizione inversa che ha permesso di sintetizzare, a partire dall'RNA totale e mediante l'utilizzo di una trascrittasi inversa ingegnerizzata, un DNA complementare (cDNA) a singolo filamento (ssDNA): in questa reazione sono stati utilizzati i T7Oligo(dt)primer i quali hanno consentito la sintesi di un filamento di ss cDNA contenente la sequenza del promotore virale T7;
- sintesi di cDNA a doppio filamento (ds cDNA): gli enzimi chiave per la riuscita di questa reazione sono stati la DNA Polimerasi e l'RNasi H che ha permesso la degradazione dell'mRNA stampo;
- purificazione del ds cDNA;
- trascrizione in vitro (IVT), ovvero sintesi di cRNA: durante questa reazione sono stati utilizzati ribonucleotidi biotinilati i quali hanno consentito la sintesi di numerose copie di cRNA biotinilati;
- purificazione del cRNA.

Ibridazione su BeadChips Illumina

750 ng di cRNA biotinilati sono stati ibridati alle sonde presenti sui BeadChip (RatRef-12 V1 BeadChip, Illumina Inc.) ciascuno dei quali ha permesso l'analisi contemporanea di 12 campioni. Ognuno dei 12 supporti conteneva 21791 sonde che comprendevano geni target e varianti di splicing alternativo presenti nel database NCBI Reference Sequence (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/).

L'ibridazione è stata seguita da:

- lavaggi post-ibridazione;
- legame di coniugati streptavidina-Cy3 ai nucleotidi biotinilati;
- lavaggi post-marcatore;
- scansione con Illumina BeadReader500;
- analisi dei dati.

Analisi dei dati ottenuti dai Microarrays

Come prima cosa, si è proceduto con l'estrapolazione e successivamente l'integrazione dei dati ottenuti dai singoli chip mediante l'utilizzo del software BeadStudio v.3.0.19.0 con Gene Expression Module 3.0.14 (Illumina Inc., San Diego) che ha permesso di sottoporre questi dati a un controllo qualitativo oltre che all'analisi dell'espressione genica.

Al fine di poter confrontare tra loro i dati derivanti dai diversi chip e rimuovere eventuali errori sistematici nelle misurazioni, si è rivelato necessario normalizzare i dati. E' stata effettuata la normalizzazione con l'algoritmo quantile che ha permesso di uniformare i segnali di fluorescenza associati ad ogni gene utilizzando come riferimento i valori di fluorescenza emessa dai geni calibratori (controlli interni). E' stato poi utilizzato il software BRB Array Tools per estrapolare i geni la cui espressione risultava modificata di almeno 1.5 volte rispetto al valore della mediana in almeno il 20% degli array e i geni aventi al contempo un 50° percentile di valori di intensità superiori a 300.

A questo punto è stato stabilito il parametro p , ovvero la percentuale di geni differenzialmente espressi nell'esperimento di microarray. Il p è un valore che nella maggior parte delle analisi viene fissato ad un valore arbitrario; nel nostro caso è stato scelto un $p \leq 0.01$.

In ogni analisi che si rispetti, si incontra tuttavia il rischio che alcuni geni differenzialmente espressi non vengano riconosciuti (falsi negativi) e che alcuni geni vengano invece riconosciuti come differenzialmente espressi quando in realtà non lo sono (falsi positivi o errori di primo tipo α). Diventa quindi importante verificare quanto i geni trovati differenzialmente espressi siano effettivamente tali. Per fare questo abbiamo applicato il False Discovery Rate (FDR) un metodo implicito necessario per la stima di p , il quale utilizza la procedura di Benjamini-Hochberg (*Benjamini Y & Hochberg Y, 1995*); questo rappresenta un criterio di aggiustamento dei valori p dei test effettuati singolarmente sui geni, che ha come obiettivo quello di tenere sotto controllo l'errore di primo tipo α . Di conseguenza, una volta fissato un valore di tolleranza (nel nostro caso $p \leq 0.01$) si riesce a risalire al numero di geni differenzialmente espressi identificati.

Nella nostra ricerca, in accordo con questi criteri, tra i 21791 geni presenti negli array ne sono stati selezionati 1144 i quali hanno mostrato una iper- o ipo-espressione riproducibile.

Al fine di identificare i geni differenzialmente espressi (aventi $p \leq 0.01$) tra le lesioni preneoplastiche precoci e le lesioni avanzate, abbiamo applicato il software LIMMA (Linear Models for MicroArray data) (*Smyth GK, 2005*), ovvero un pacchetto per l'analisi dei dati che presenta delle caratteristiche che rendono ogni analisi stabile, in quanto sfrutta informazioni provenienti dall'intero insieme di geni. Quest'analisi si è basata sul logaritmo in base 2 del

rapporto tra i valori ottenuti dall'analisi di espressione dei dati (incentrato sulla mediana), utilizzando i valori del tessuto epatico di controllo come riferimento.

In seguito a quest'analisi, sono stati 869 i geni che hanno mostrato un'iper- o ipo-espressione riproducibile in almeno un confronto.

I dati ottenuti sono stati sottoposti a raggruppamento (clustering) mediante l'utilizzo di un approccio non supervisionato di tipo gerarchico (o raggruppamento ad albero), ovvero un approccio non guidato da una classificazione precedentemente nota in cui le relazioni tra i geni vengono rappresentate da una sorta di albero chiamato dendrogramma, nel quale la vicinanza dei rami riflette il grado di somiglianza. Infatti la distribuzione automatica è avvenuta in modo tale che i geni appartenenti ad un gruppo fossero tra essi più simili rispetto a quelli di un altro gruppo. Il grado di similarità è stato valutato matematicamente attraverso una misura di distanza: meno i termini sono distanti, più sono simili e più facilmente faranno parte di uno stesso gruppo. Abbiamo utilizzato il coefficiente di correlazione di Pearson come misura di distanza, e il Complete-Linkage come metodica necessaria per il calcolo della distanza presente tra i vari cluster genici.

Abbiamo quindi costruito l'heat-map attraverso l'utilizzo del software GEDAS (Gene Expression Data Analysis Studio) (*Fu L & Medico E, 2007*) al fine di visualizzare graficamente i risultati elaborati. Nella rappresentazione grafica il colore verde ha indicato un'intensità minima di fluorescenza emessa dal gene; il colore rosso ha indicato, al contrario, un'intensità massima di fluorescenza emessa.

IPA (Ingenuity Pathway Analysis)

IPA è un software che è stato sviluppato dalla Ingenuity Systems (www.ingenuity.com) con l'intento di aiutare a comprendere al meglio la complessità dei sistemi biologici. Integrando i dati ottenuti in un determinato studio con quelli provenienti da una varietà di piattaforme sperimentali, IPA permette di approfondire le interazioni molecolari e chimiche, i fenotipi cellulari e i processi patologici presenti in un determinato sistema.

Quest'analisi è stata da noi utilizzata al fine di vedere in quali vie del segnale fossero implicati i geni trovati deregolati nella nostra analisi. Come prima cosa, sono stati caricati nel software i geni riconosciuti nel Rat Genome Database (RGD) e, dove possibile, sono stati individuati quelli aventi corrispondenza umana.

L'analisi delle vie del segnale è stata effettuata sui geni alterati in modo significativo, aventi cioè un valore soglia di iper-espressione $>+2$ e ipo-espressione <-2 . Successivamente i geni deregolati sono stati posti in correlazione con determinate funzioni biologiche; l'unica restrizione posta è

stata quella di inserire un minimo di 8 geni per ogni funzione considerata al fine di mettere in rilievo le funzioni svolte dalla maggior parte dei geni trovati differenzialmente espressi. E' stato inoltre valutato il significato di ogni network e l'interconnessione tra le varie pathways.

Infine, grazie alla funzione "Fattori di Trascrizione", è stato possibile effettuare l'analisi dei fattori di trascrizione che controllano l'espressione dei geni presenti nel nostro insieme di dati.

GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)

GSEA (*Subramanian A et al., 2005*) rappresenta un potente approccio analitico per l'interpretazione dei dati di espressione genica. Questa metodica si focalizza sull'identificazione di set genici, ovvero gruppi di geni che condividono tra loro determinate caratteristiche quali: comuni funzioni biologiche, la localizzazione cromosomica, o i meccanismi di regolazione.

L'obiettivo che ci siamo prefissati con l'utilizzo di GSEA è stato quello di determinare quanto i geni appartenenti al gruppo di nostro interesse (set di geni L) fosse "arricchito" di termini presenti nel database Gene Ontology (set di geni S), al fine di poter calcolare un enrichment score (ES), ovvero un punteggio di arricchimento. Nella nostra ricerca sono stati caricati in GSEA solo i dati normalizzati con l'algoritmo quantile che presentavano un valore di $p < 0.01$. Sono stati caricati inoltre solo i geni che presentavano l'ID genica di ratto (RGD), ed è stato utilizzato il database Ensembl (www.ensembl.org) al fine di stabilire quali fossero i geni ortologhi tra ratto e uomo. Per stabilire l'arricchimento fenotipico sono state utilizzate 1000 permutazioni e sono stati discussi solo i risultati aventi un FDR con un valore di $q < 0.01$.

TaqMan Low Density Array (TLDA)

L'analisi del profilo di espressione dei microRNA è stata effettuata, mediante l'utilizzo delle TaqMan[®] Low Density Array (TLDA) (Applied Biosystems, Life Technologies, Monza), sull'RNA totale estratto col kit mirVana dalle stesse lesioni pre-neoplastiche precoci e neoplastiche precedentemente sottoposte all'analisi dell'espressione genica. Le TLDA sono delle

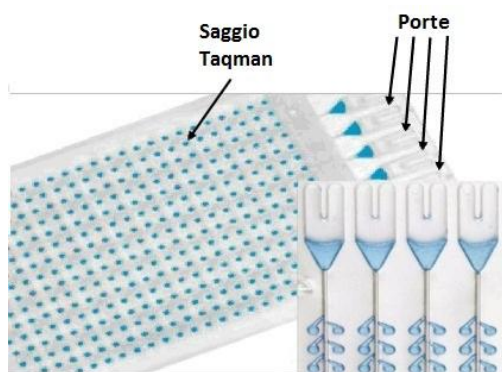


Fig.9: Applied Biosystems Micro Fluidic Card.

card micro-fluidiche composte da 384 pozzetti che permettono di effettuare fino a 384 reazioni contemporanee di Real Time-PCR sfruttando la tecnologia delle sonde TaqMan [Fig.9].

Ogni array include, oltre alle sonde che consentono di individuare e quantificare con estrema sensibilità esclusivamente la forma matura di determinati microRNA, anche dei controlli endogeni; tra questi

troviamo l'U6 di mammifero (MammU6) ripetuto quattro volte, un controllo positivo ed un assay non specifico dei mammiferi, l'ath-miR159a che viene utilizzato come controllo negativo.

In accordo col protocollo fornito dalla ditta, nella prima fase dell'analisi è stata effettuata la retro-trascrizione (RT) dell'RNA totale estratto dalle lesioni epatiche. Sono stati retro-trascritti 600 ng di RNA totale mediante l'utilizzo del TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit ed i primers per la RT Megaplex™ Primer Pools (Applied Biosystems, Life Technologies, Monza), un pool di primers forward e reverse in grado di permettere la retro-trascrizione di specifici microRNA. La reazione è stata condotta in un termociclatore alle seguenti condizioni di reazione:

Stage	Temp	Time
Cycle (40 cycles)	16°C	2 min
	42°C	1 min
	50°C	1 sec
Hold	85°C	5 min
Hold	4°C	∞

Terminata la RT, per ogni campione (o pool di campioni) sono stati presi 9 µl di cDNA i quali sono stati diluiti in 441 µl d'H₂O DEPC e miscelati con 450 µl di TaqMan Universal PCR Master Mix II (Applied Biosystem, Life Technologies, Monza) al fine di raggiungere un volume finale di 900 µl e poter procedere con l'analisi del miRNoma mediante Real Time PCR. A questo punto 800 µl di cDNA sono stati utilizzati per il caricamento delle micro-fluidic cards TaqMan Rodent miRNA Arrays A v2.0, ognuna delle quali è costituita da 8 "corsie" o "lanes" (100 µl per ogni lane) con i rispettivi canali di caricamento; ogni corsia è connessa a 48 pozzetti contenenti altrettante sonde. Sono state utilizzate tante card quanti erano i campioni sui quali effettuare l'analisi di miRNoma. La Real Time PCR è stata eseguita sul macchinario 7900HT Fast Real Time PCR con i seguenti parametri:

Step	AmpliTaq Gold Activation	PCR	
	HOLD	CYCLE (40 cycles)	
		Denature	Anneal/Extend
Temperature	95°C	95°C	60°C
Time	10 min	15 sec	1 min

Analisi dei dati ottenuti dalle TLDA

Come prima cosa, si è proceduto con la normalizzazione dei dati di espressione ottenuti da ciascuna card. Questa è stata fatta utilizzando il MammU6 come controllo endogeno in quanto i suoi valori di Ct si sono mantenuti costanti in tutti i campioni analizzati. Allo scopo di valutare i livelli di espressione relativa dei microRNA in ogni campione rispetto ai controlli della stessa età, è stato utilizzato il metodo del $\Delta\Delta Ct$ (*Livak KJ and Schmittgen TD, 2001*) mediante l'ausilio del software RQ Manager 1.2 (Applied Biosystem, Life Technologies, Milano). Per quanto riguarda tutti i campioni analizzati, sono stati esclusi dall'analisi i microRNA aventi valori di Ct indeterminati o superiori di 35 in quanto in questi casi l'espressione non è valutabile correttamente.

Così come per i dati di espressione genica, è stata applicata la metodica precedentemente descritta del False Discovery Rate (FDR) (*Benjamini Y and Hochberg Y, 1995*); una volta fissato il valore di $p \leq 0.05$, sono 200 i microRNA risultati differenzialmente espressi i quali hanno mostrato una iper- o ipo-espressione riproducibile.

E' stato poi, come per l'analisi genica, applicato il pacchetto per l'analisi LIMMA (Linear Models for MicroArray data) (*Smyth GK, 2005*) al fine di identificare i microRNA differenzialmente espressi (aventi $p \leq 0.05$) tra le lesioni ai vari tempi rispetto ai controlli della stessa età. I dati di espressione sono stati raggruppati mediante un approccio gerarchico non supervisionato, e attraverso l'utilizzo del software GEDAS (Gene Expression Data Analysis Studio) (*Fu L and Medico E, 2007*) è stata costruita l'heat-map per la visualizzazione grafica dei risultati.

Validazione dei risultati ottenuti dai microarrays e dalle TLDA mediante RT-Real Time PCR

RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Al fine di validare i risultati di espressione genica e dei microRNA ottenuti rispettivamente dai microarrays e dalle TLDA, l'RNA è stato retro-trascritto in cDNA mediante l'utilizzo dei Kit:

- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Life Technologies, Monza) per la RT dell'RNA messaggero: per ogni campione 1.5 μg di RNA sono stati diluiti in 10 μL di H_2O RNase free. Ad ogni campione sono stati aggiunti 2 μl di RT Buffer (10X), 2 μl di Random Primers (10X), 0.8 μl di dNTPs (100 mM), 1 μl dell'enzima Multiscribe Reverse Transcriptase, 1 μl di RNase Inhibitor e l'appropriata quantità d' H_2O fino a raggiungere un volume totale di 20 μl . I campioni sono stati incubati a: 25°C per 10 minuti, 37°C per 120 minuti e la reazione di sintesi del filamento di cDNA è stata interrotta mediante incubazione

per 5 minuti a 85°C; dopo uno step a 4°C i campioni sono stati conservati a -20°C fino al successivo utilizzo.

- TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Life Technologies, Monza) per la RT dei microRNA: l'RNA totale è stato diluito fino a raggiungere una concentrazione finale di 2 ng/μl. Per ogni campione, la mix di retro-trascrizione è risultata composta da: 4.16 μl di H₂O, 1.5 μl di Reverse Transcription Buffer (10X), 0.15 μl di dNTPs (100 mM), 0.19 μl di RNase Inhibitor e 1 μl di Multiscribe Reverse Transcriptase. Sono stati aggiunti 5 μl [2 ng/μl] dell'RNA da retro-trascrivere e 3 μl del primer specifico, per un volume totale di reazione di 15 μl. I campioni sono stati successivamente incubati in termociclatore a: 16°C per 30 minuti, 42°C per 30 minuti e 85°C per 5 minuti; dopo uno step a 4°C i campioni sono stati conservati a -20°C fino al successivo utilizzo.

Real Time PCR

I cDNA ottenuti dalle RT sono stati utilizzati per la validazione dei livelli di espressione di 7 geni e 10 microRNA selezionati casualmente.

- Per quanto riguarda la validazione dei 7 geni, la reazione di amplificazione è avvenuta in un volume totale di 10 μl così composti: 4 μl di cDNA [2.5 ng/μl] ottenuto dai singoli campioni di tessuto epatico ai vari stadi del processo di epatocancerogenesi e dai campioni di controllo, 5 μl di TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Monza) e 1 μl di sonde TaqMan specifiche (Applied Biosystems, Life Technologies, California). Nelle analisi di espressione genica sono state utilizzate le seguenti sonde TaqMan di ratto:

Rn 00756513_m1 per l'analisi di Akr1b8 (aldo-keto reductase family 1, member 8),

Rn 01462065_m1 per l'analisi di Ca2 (carbonic anhydrase 2),

Rn 01461970_m1 per l'analisi di Ca3 (carbonic anhydrase 3),

Rn 00562598_m1 per l'analisi di Cd24,

Rn 01471766_m1 per l'analisi di Mmd (monocyte to macrophage differentiation-associated),

Rn 01506194_m1 per l'analisi di Tob2 (transducer of ERBB2, 2),

Rn 01499872_m1 per l'analisi di Sds (serine dehydratase).

Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con il macchinario ABI PRISM 7300HT (Applied Biosystems, Life Technologies, Monza). I parametri utilizzati hanno compreso uno step iniziale di attivazione a 50°C per 2 minuti e 95°C per 10 minuti, seguito da 40 cicli di amplificazione condotti ciascuno a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto. I campioni sono stati analizzati in triplicato ed è stato amplificato, oltre al gene target, anche un gene

housekeeping (β -actina) per valutare eventuali variazioni nella quantità di cDNA utilizzato. I livelli di espressione genica sono stati valutati con il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e rappresentati come espressione relativa rispetto a un calibratore scelto tra i controlli.

- Per quanto riguarda la validazione dei 10 microRNA, il prodotto ottenuto dalla RT è stato come prima cosa diluito in 52 μ l di H₂O e si è poi proceduto con la reazione di amplificazione, la quale è avvenuta in un volume totale di 20 μ l così composti: 4.5 μ l di cDNA diluito, 14.5 μ l di TaqMan Universal Master Mix II no UNG (Applied Biosystems, Life Technologies, Monza) e 1 μ l di TaqMan microRNA Assays specifiche (Applied Biosystems, Life Technologies, California). Sono state utilizzate le seguenti sonde TaqMan:
464298_mat per l'analisi del miR-224,
000413 per l'analisi del miR-29b,
001090 per l'analisi del miR-93,
002563 per l'analisi del miR-542-5p,
002276 per l'analisi del miR-222,
000521 per l'analisi del miR-218,
002606 per l'analisi del miR-500,
000449 per l'analisi del miR-125b-5p,
464572_mat per l'analisi del miR-802,
001278 per l'analisi del miR-486,

I parametri utilizzati hanno compreso uno step iniziale di attivazione a 50°C per 2 minuti e 95°C per 10 minuti, seguito da 40 cicli di amplificazione condotti ciascuno a 95°C per 15 secondi e a 60°C per 1 minuto. I campioni sono stati analizzati in triplicato ed è stato amplificato, oltre al miRNA target, anche l'housekeeping 4.5 S RNA (H). I livelli di espressione dei microRNA sono stati valutati anche in questo caso con il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Integrazione dei dati di trascrittomico e miRNomico

I target molecolari dei microRNA trovati deregolati per il ratto, sono stati identificati mediante l'utilizzo del database TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), un software di predizione a cui si può accedere pubblicamente dal web. Nello specifico abbiamo ottenuto un network di regolazione post-trascrizionale composto da 210 microRNA e 9060 geni da essi bersagliati. Mediante l'utilizzo di questi dati, abbiamo estrapolato i microRNA targettanti ognuno dei geni differenzialmente espressi nei vari step del processo di epatocarcinogenesi della nostra ricerca (lesioni pre-neoplastiche precoci KRT-19+, adenomi/eHCC e aHCC).

E' stata quindi effettuata una correlazione tra le ID dei miRNA maturi estrapolati e le ID dei miRNA differenzialmente espressi nella stessa condizione sperimentale al fine di identificare dei gruppi composti da coppie di microRNA/mRNA dove entrambi gli elementi risultassero differenzialmente espressi nella stessa condizione sperimentale e fossero al contempo riconosciuti dal software TargetScan.

A questo punto, è stato utilizzato il software Cytoscape con l'obiettivo di rappresentare graficamente i network in cui sono coinvolti i gruppi di miRNA/mRNA che abbiamo trovato deregolati nella nostra ricerca. Cytoscape rappresenta infatti uno strumento bioinformatico che permette di effettuare delle analisi integrate e di visualizzare graficamente i network biologici. Il suo principio organizzativo si basa sulla costruzione di network dove le entità biologiche vengono rappresentate come "nodi" o punti d'intersezione, e le interazioni vengono invece rappresentate come frecce che collegano i vari nodi. (*Smoot ME et al., 2011*).

Risultati

Determinazione del profilo di espressione dell'mRNA nelle diverse fasi del processo di epatocancerogenesi

Un precedente studio di genomica funzionale comparata condotto nel nostro laboratorio (*Andersen JB et al., 2010*) aveva permesso di individuare, mediante colorazione immunohistochimica effettuata su sezioni ottenute da fegati di ratti sacrificati 10 settimane dopo iniezione con DENA, 2 popolazioni di lesioni pre-neoplastiche precoci; entrambe erano uniformemente positive per il marcatore Glutazione-S-Transferasi-Placentare (GST-P), ma si differenziavano in base alla positività o negatività per la Citocheratina-19 (KRT-19).

Mentre poco meno del 25% delle lesioni pre-neoplastiche erano KRT-19+, l'analisi di sezioni ottenute da fegati di animali sacrificati dopo 14 mesi dall'iniziazione aveva mostrato una quasi totale positività degli HCC tardivi per questo marcatore [Tab.2] supportando l'ipotesi che nel modello sperimentale dell'Epatocita Resistente da noi utilizzato, le lesioni pre-neoplastiche KRT-19+ rappresentano le progenitrici dell'HCC, mentre le lesioni KRT-19- sono quelle che con più probabilità regrediscono spontaneamente.

Lesioni Pre-neoplastiche Precoci				HCC			
N. Tot.	KRT-19-	KRT-19+	%	N. Tot.	KRT-19-	KRT-19+	%
539	407	132	24.5	10	1	9	90

Tab.2: % delle lesioni pre-neoplastiche precoci e degli HCC KRT-19+.

Basandoci su questo studio, nella nostra ricerca ci siamo proposti di generare un profilo di espressione genica delle diverse fasi del processo multifasico di epatocancerogenesi.

Innanzitutto le lesioni epatiche ottenute dalle varie fasi del processo di cancerogenesi epatica sono state identificate per mezzo della colorazione immunohistochimica per il GST-P e per la KRT-19; successivamente, un elevato numero di esse è stato microdissecato per mezzo del microscopio laser Leica LMD6000. In particolare sono state dissecate: 20 lesioni pre-neoplastiche precoci (10 lesioni KRT-19- e 10 lesioni KRT-19+), 4 adenomi (Ade), 5 HCC precoci (eHCC) e 9 HCC tardivi (aHCC).

Al fine di identificare i geni differenzialmente espressi durante il processo multifasico, è stata effettuata l'analisi del trascrittoma mediante l'utilizzo dei Microarrays Illumina BeadChip.

Tra i 21791 geni inclusi nell'array ne sono stati selezionati 1144 [Tab. suppl.1] sulla base dei criteri informatici descritti nei Materiali e Metodi. A questi è stato applicato un approccio gerarchico di

tipo non supervisionato che, globalmente, ha permesso di raggruppare separatamente le lesioni pre-neoplastiche KRT-19+ e quelle KRT-19-.

Nello specifico, le lesioni di ratto sono state raggruppate in 2 cluster principali [Fig.10]:

- 1) le lesioni pre-neoplastiche precoci KRT-19- (con un'unica eccezione) insieme al tessuto epatico di controllo;
- 2) le lesioni pre-neoplastiche precoci KRT-19+ insieme agli Ade/eHCC (selezionati in base alla loro positività per la KRT-19) e agli aHCC. All'interno di questo cluster, le lesioni KRT-19+, gli Ade/eHCC e gli aHCC hanno formato 3 sotto-raggruppamenti distinti.

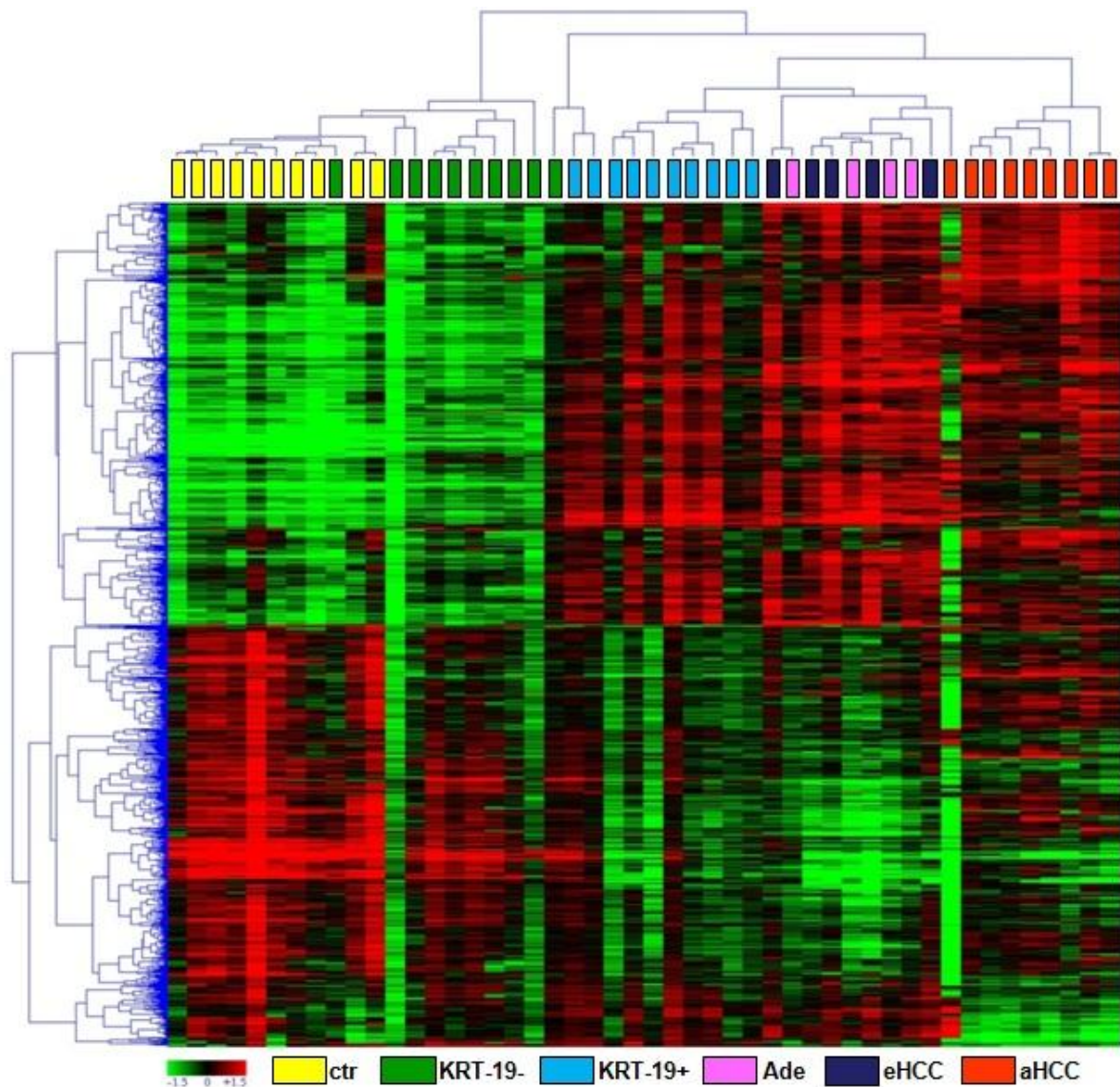


Fig.10: analisi trascrittomiche delle diverse fasi dell'epatocarcinogenesi.

L'immagine rappresenta il raggruppamento gerarchico di 1144 geni analizzati nei fegati di controllo, nelle lesioni pre-neoplastiche KRT-19- e KRT-19+, negli Ade/eHCC e negli aHCC in ratti sottoposti al protocollo RH. Ogni riga rappresenta il profilo di espressione di un RNA messaggero e ogni colonna rappresenta un campione. I colori rosso e verde indicano rispettivamente un'elevata e una bassa espressione del gene esaminato.

I risultati ottenuti dai microarray sono stati validati mediante Real Time PCR quantitativa effettuata su 7 geni selezionati casualmente e, come mostrato dai grafici [Fig.11], i risultati ottenuti hanno confermato i dati di espressione genica ottenuti dai microarray per tutti i geni esaminati.

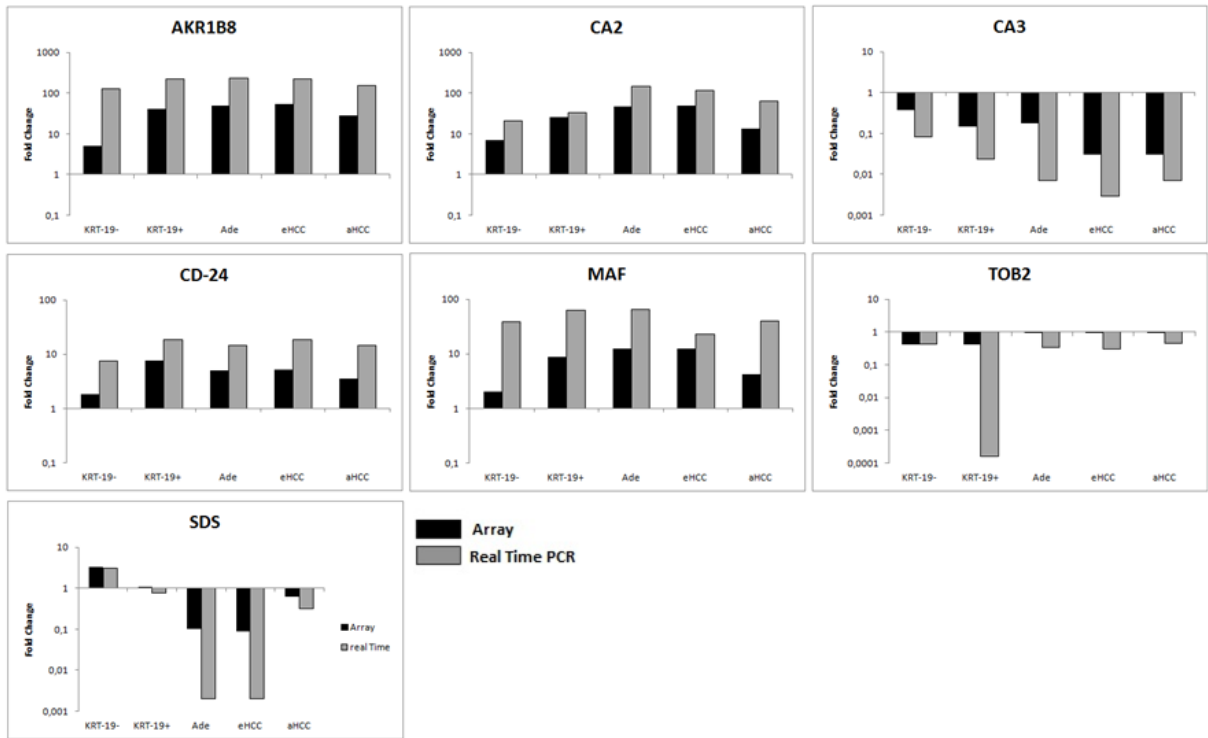


Fig.11: validazione, mediante RT-qPCR, di 7 geni selezionati casualmente: AKR1B8 (aldo-keto reductase family 1, member 8), CA2 (carbonic anhydrase 2), CA3 (carbonic anhydrase 3), CD-24, MAF (monocyte to macrophage differentiation-associated), TOB2 (transducer of ERBB2, 2) e SDS (serine dehydratase). L'espressione del mRNA è stata valutata in: lesioni KRT-19-, KRT-19+, Ade, eHCC e aHCC.

Al fine di identificare gruppi di geni differenzialmente espressi in ogni tipo di lesione rispetto ai

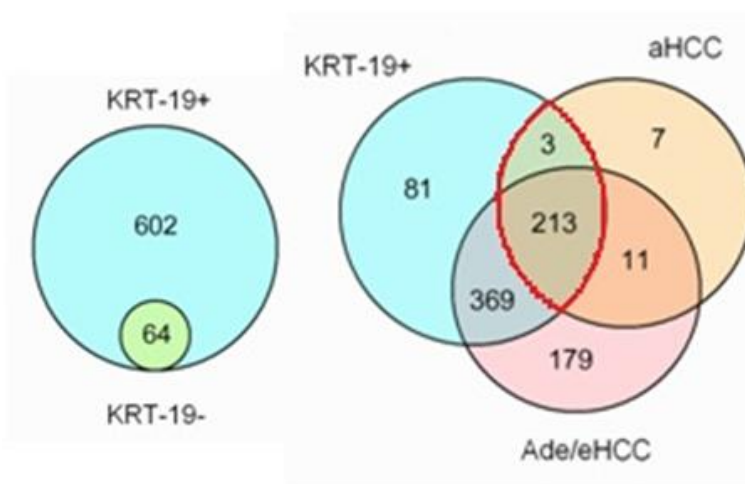


Fig.12: i diagrammi di Venn mostrano il numero di geni differenzialmente espressi in ogni fase rispetto ai relativi controlli.

relativi controlli (aventi la stessa età), è stato applicato il pacchetto per l'analisi LIMMA (Linear Models for MicroArray data). Come mostrato nel diagramma di Venn, da quest'analisi è emerso che le lesioni pre-neoplastiche precoci KRT-19- e KRT-19+, pur essendo istologicamente molto simili, mostrano un elevato

numero di geni differenzialmente espressi: infatti sono 602 i geni alterati in modo specifico nelle lesioni KRT-19+ suggerendo la loro importanza nella progressione tumorale [Fig.12 sx].

Dall'analisi effettuata con LIMMA è inoltre emerso che dei 234 geni trovati deregolati negli HCC tardivi, 216 lo sono già a partire dalle fasi precoci KRT-19+ e, tra questi, 213 geni sono differenzialmente espressi in tutte le fasi della progressione neoplastica [Fig.12 dx].

E' stato inoltre interessante notare che la selezione dei geni maggiormente deregolati negli HCC tardivi ha mostrato come l'80% di questi fosse anormalmente espresso già nelle lesioni pre-neoplastiche precoci positive per la KRT-19; in particolare, 33 dei 39 geni maggiormente iper-espressi (aventi un FC >5 rispetto ai relativi controlli) e 12 dei 15 geni maggiormente ipo-espressi (aventi un FC <-5 rispetto ai relativi controlli) negli HCC tardivi sono risultati rispettivamente i più iper e ipo-espressi anche nelle lesioni KRT-19+ [Tab.3].

Geni maggiormente deregolati (FC >5, <-5) negli HCC tardivi (aHCC)			
GENI	FC aHCC/ctr	GENI	FC aHCC/ctr
geni maggiormente iper-espressi		Ccnb2	6,39
Akr1b8	69,8	Npdc1	6,34
Defb1	59,73	Bzrp	6,12
Gstp1	51,91	Pir	5,93
Gstp2	46,60	Gclc	5,91
Gpx2	30,62	Anxa1	5,76
Ca2	28,32	Ica1	5,74
Yc2	25,61	Esm1	5,54
Nqo1	20,54	Phgdh	5,26
Ddit4l	19,51	Traf4af1	5,16
Akr7a3	18,40	Txnrd1	5,07
Krt1-19	17,09	Serpinb1a	5
Pcp4	13,79	geni maggiormente ipo-espressi	
Cryab	12,34	Cyp2c	-69,57
Abcc3	11,53	Obp3	-49,07
Fabp4	11,25	Ca3	-29,79
Slc25a4	10,78	Dhrs7	-22,8
Anxa2	10,05	Hao2	-10,86
Tubb6	9,25	Cdh17	-10,8
Lbp	9,08	Olr59	-9,86
S100a11	9,07	Avpr1a	-8,75
Abcb1	7,75	Sult1c1	-8,55
Scd2	7,54	Aox3	-8,47
Ugt1a6	7,12	Cyp3a3	-7,03
Ltb4dh	7,09	Ust5r	-6,56
Cdc2a	6,96	Cyp2c37	-5,81
Cd24	6,77	Akr1c18	-5,5
Rhbg	6,42	Gnmt	-5,42

Tab.3: geni maggiormente deregolati negli aHCC (FC>5; FC<-5) rispetto ai relativi controlli. In **rosso** sono segnati i geni deregolati anche nelle lesioni pre-neoplastiche precoci KRT-19+.

I risultati ottenuti dall'analisi trascrittomiche nelle varie fasi del processo multifasico della cancerogenesi epatica, hanno quindi suggerito che le maggiori modificazioni nell'espressione genica che portano allo sviluppo dell'HCC avanzato, si verificano già nelle fasi molto precoci della progressione tumorale.

Analisi delle vie del segnale e analisi funzionale dei geni deregolati nelle varie fasi dell'epatocancerogenesi

Una volta identificati i geni aventi un'alterata espressione nelle diverse fasi del processo di cancerogenesi epatica, ci siamo occupati di capire in quali pathway fossero coinvolti.

Per farlo è stato utilizzato il software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) il quale, mediante l'integrazione dei risultati ottenuti dall'analisi trascrittomica con quelli provenienti da una varietà di piattaforme sperimentali, è stato in grado di rivelare un coinvolgimento della maggior parte dei geni da noi trovati deregolati in pathway metaboliche. Tra queste troviamo vie del segnale coinvolte nel metabolismo degli xenobiotici, degli acidi grassi, degli acidi arachidonico e linoleico, dell'inibizione delle funzioni degli RXR (recettori dell'acido retinoico) mediata da LPS (lipopolisaccaridi)/IL-1 (interleuchina-1), dell'interconversione dei pentosi e dei glucuronidi, e dell'attivazione dei PXR (recettori del pregnano) /RXR.

In particolare, le differenze più importanti sono state osservate tra le lesioni pre-neoplastiche precoci KRT-19- e KRT-19+ [Fig.13 A].

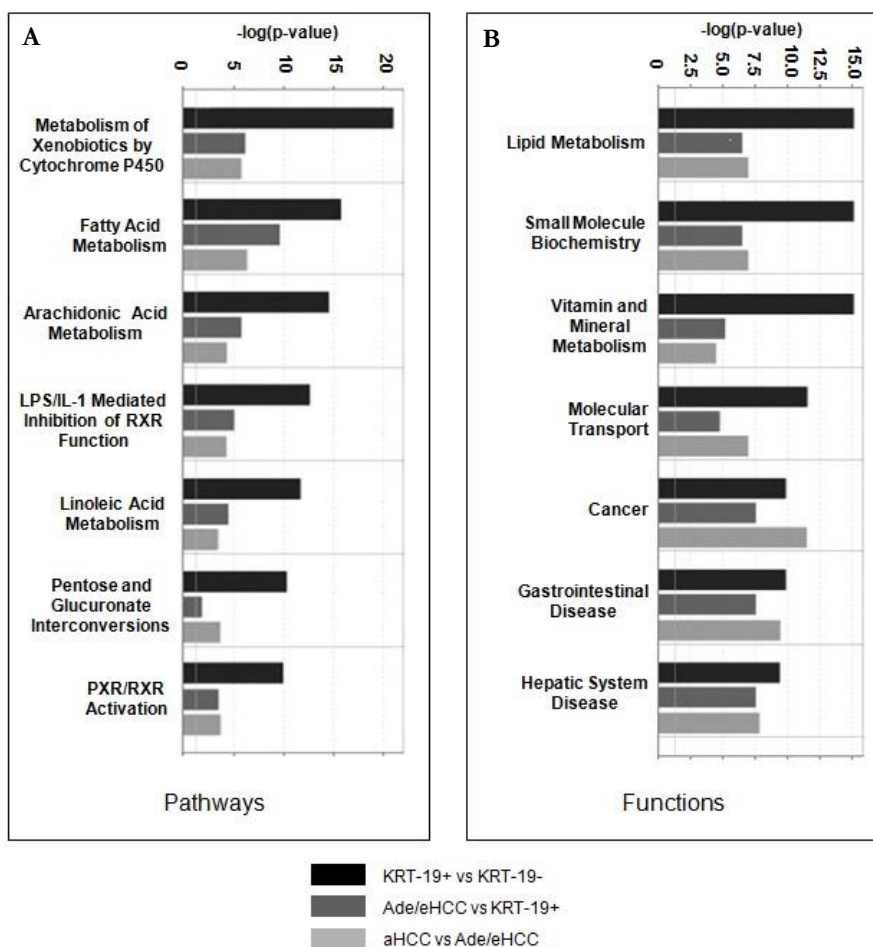


Fig.13: analisi, effettuata con IPA, delle pathways (A) e funzionale (B) durante lo sviluppo e la progressione dell'HCC in ratti sottoposti al modello RH. Per ogni pathway e funzione, le barre rappresentano la progressiva attivazione della pathway in una determinata fase del processo rispetto alla fase precedente.

E' stata inoltre effettuata l'analisi funzionale che ha similmente mostrato come le differenze più rilevanti nella modificazione delle funzioni metaboliche si osservino tra le lesioni KRT-19- e quelle KRT-19+; è stata invece osservata un'alterazione uniforme in tutte le fasi del processo per quanto riguarda le funzioni correlate a patologie quali il cancro, i disturbi gastrointestinali e le patologie del sistema epatico [Fig.13 B].

Mediante l'utilizzo di IPA è stato inoltre possibile effettuare l'analisi dei fattori di trascrizione (TF) che controllano l'espressione dei geni deregolati; questa ha rivelato un'alterazione di varie pathways trascrizionali nelle diverse fasi del processo [Fig.14]. In particolare, nel primo step del processo (lesioni pre-neoplastiche KRT-19+ rispetto ai controlli) sono risultate maggiormente deregolate le seguenti pathways: PPARA, NR1I2, RXRA, NFE2L2 (NRF2) e NR1I3; nella fase di transizione da lesioni KRT-19- a lesioni KRT-19+ sono state trovate significativamente attivate le pathway regolate da MYC, MYC-N, FOS e JUN; il passaggio da lesioni KRT-19+ ad Ade/eHCC è stato associato a modificazioni di pathway regolate da fattori quali MYC, MXD4, NR2F1, RXRA e CTNNB1. Tra le pathway trovate alterate negli HCC tardivi rispetto alla fase Ade/eHCC sono emersi: MAFF, MAFG, NFE2L2, HMGA1 e TP53.

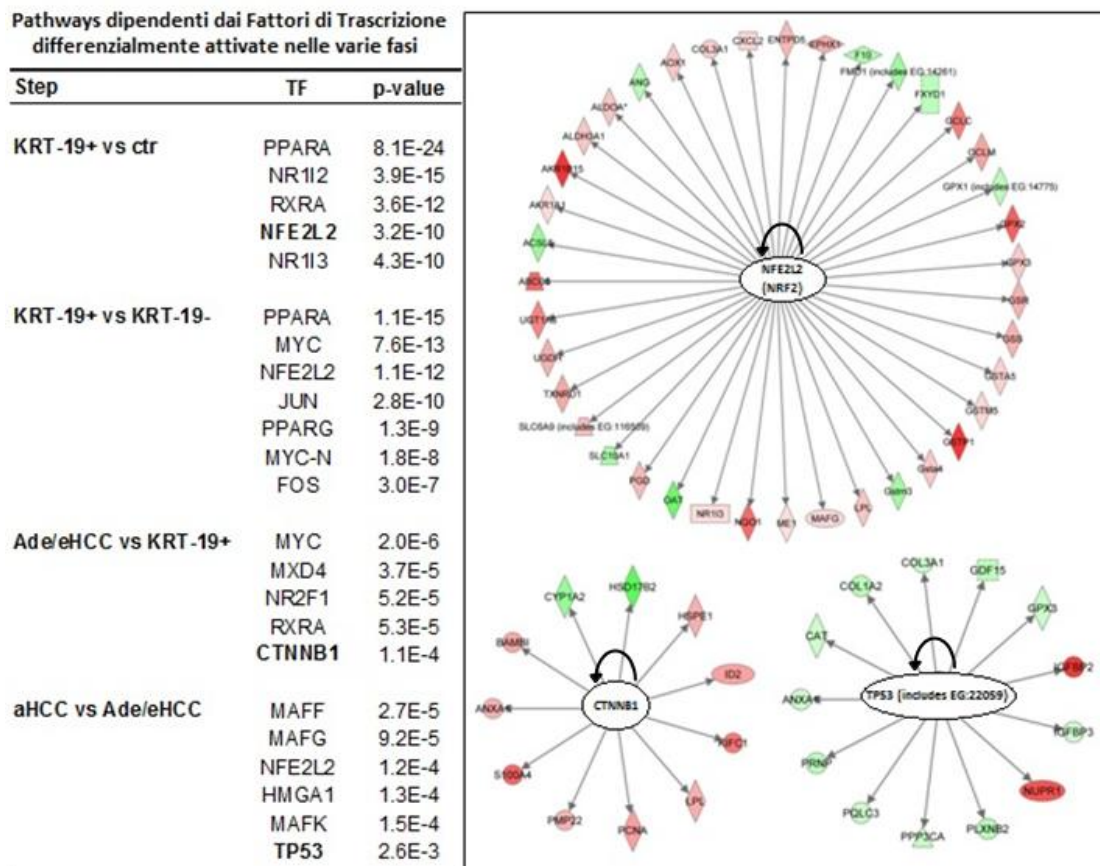


Fig.14: analisi delle pathways dipendenti dai TF durante le varie fasi dell'epatocancerogenesi. A **sx** vi è l'elenco delle pathway dipendenti dai TF durante lo sviluppo dell'HCC, ordinate in base ai valori di p. A **dx** sono rappresentati 3 diversi network (TF → gene target). In **rosso** e **verde** sono rappresentati rispettivamente i geni iper e ipo-espressi.

Identificazione delle signature molecolari attraverso il software GSEA (Gene Set Enrichment Analysis)

Come ulteriore conferma del fatto che importanti eventi molecolari associati ad una prognosi infausta possano verificarsi già nelle fasi iniziali del processo di epatocancerogenesi, abbiamo utilizzato l'algoritmo GSEA che, come spiegato nei Materiali e Metodi, è stato necessario per determinare quanto il gruppo di geni trovato deregolato nel nostro studio fosse "arricchito" di termini presenti nel database Gene Ontology.

Mediante quest'analisi è stato possibile scoprire come la "signature" genica associata allo sviluppo e alla ricorrenza del carcinoma epatocellulare fosse già presente nelle fasi precoci (lesioni pre-neoplastiche KRT-19+) del processo di epatocancerogenesi sperimentale da noi studiato [Fig.15].

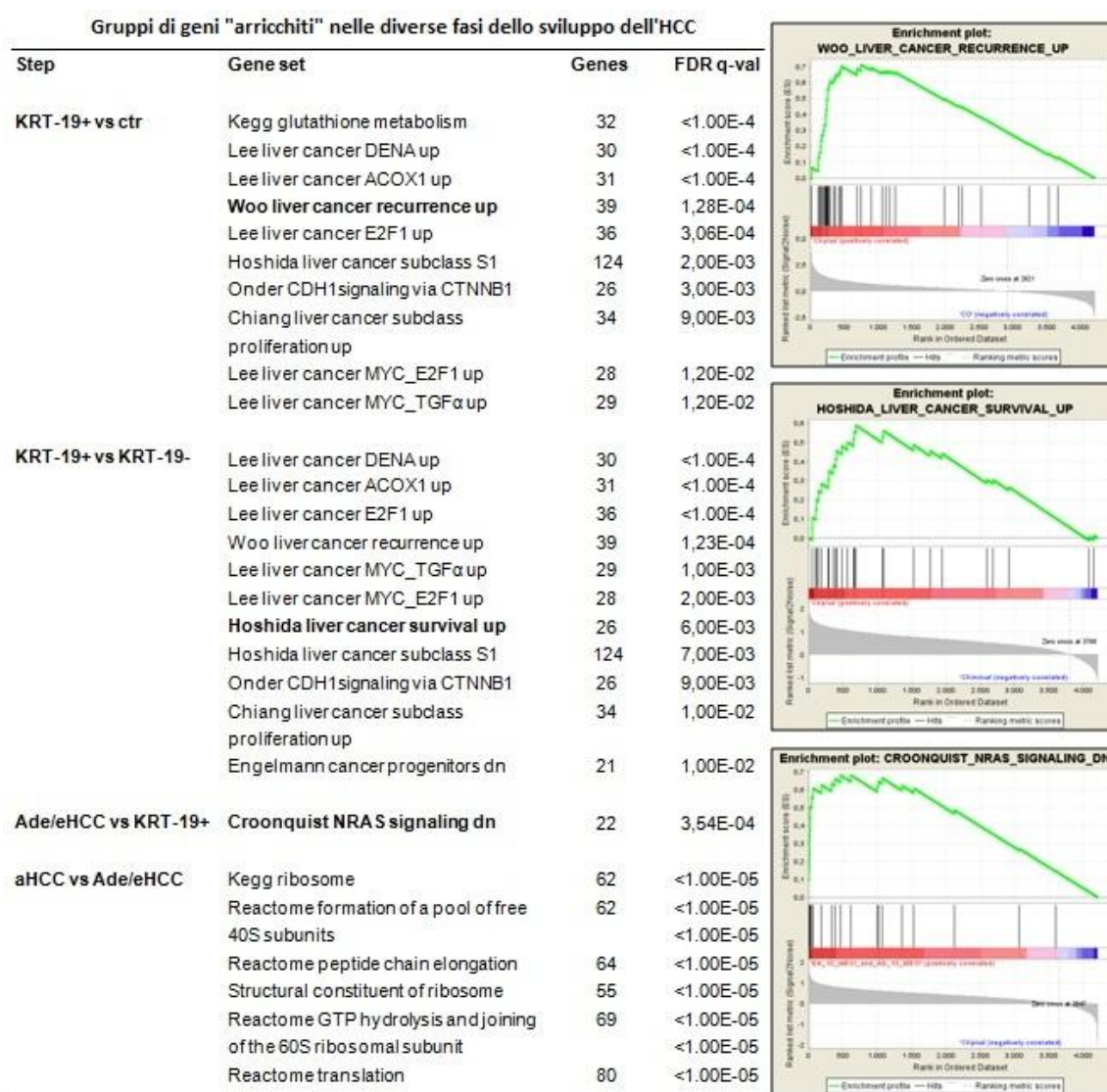


Fig.15: analisi effettuata con GSEA; a **sx** sono indicate le signature geniche arricchite nel processo multifasico di epatocancerogenesi. Nella colonna "geni" è indicato il numero di geni arricchiti in ogni pathway. A **dx** sono rappresentati i grafici di arricchimento rappresentanti le pathways in grassetto nell'elenco a dx.

Questo risultato è quindi indice del fatto che fondamentali eventi molecolari associati a una prognosi infausta potrebbero verificarsi già a partire dalle fasi iniziali del processo.

Per quanto riguarda le vie del segnale, sono state trovate significativamente attivate le pathways della β -catenina/Wnt e MYC, già identificate nell'HCC di diverse specie (*de La Coste A et al., 1998; Kawate S et al., 1999*). La pathway di NRAS è stata trovata arricchita nella transizione da lesioni KRT-19+ ad Ade/eHCC; è interessante dire che recentemente è stato riportato che un'attivazione di NRAS causa iperplasia epatica e tumorigenesi (*Keng VW et al., 2011*). L'ultimo step, al contrario, è significativamente arricchito in pathway correlate alla sintesi proteica.

Profilo di espressione dei microRNA nelle varie fasi dell'epatocancerogenesi

I microRNA sono delle piccole molecole di RNA non codificante capaci di classificare con precisione le diverse tipologie tumorali e le varie fasi della progressione che portano allo sviluppo del cancro.

Nella nostra ricerca abbiamo quindi deciso di analizzare il profilo di espressione dei microRNA nelle stesse lesioni pre-neoplastiche e neoplastiche per le quali è già stata effettuata l'analisi del profilo di espressione genica; per farlo è stata utilizzata la tecnologia delle Taqman Low Density Array (TLDA) che hanno permesso di effettuare fino a 384 reazioni contemporanee di Real Time-PCR. Tra i 375 microRNA maturi inclusi in ciascuna card, ne sono stati selezionati 200 [Tab. suppl.2] sulla base dei criteri informatici descritti nei Materiali e Metodi. A questi è stato applicato un approccio gerarchico di tipo non supervisionato basato sui livelli di espressione relativa dei microRNA, che ha rivelato l'esistenza di 2 clusters principali [Fig.16 A]:

- 1) il cluster delle lesioni pre-neoplastiche precoci, comprendente noduli KRT-19- e KRT-19+;
- 2) il cluster delle fasi tardive, comprendente Ade/eHCC e aHCC.

All'interno di ciascun cluster, l'analisi effettuata sul miRNoma è stata in grado di classificare separatamente le differenti fasi dell'epatocancerogenesi.

Inoltre, una selezione maggiormente stringente nella quale sono stati selezionati 116 microRNA ha permesso una quasi completa separazione tra il sotto-cluster degli adenomi e quello dei carcinomi precoci [Fig.16 B].

Quest'analisi ha permesso di far emergere un'importante differenza tra il profilo di espressione dei microRNA e quello dei geni: il miRNoma ha infatti, diversamente dal trascrittoma, la capacità di separare nettamente le lesioni pre-neoplastiche da quelle neoplastiche pur mantenendo, all'interno del cluster pre-neoplastico, le differenze tra le lesioni KRT-19- e le lesioni KRT-19+.

Queste osservazioni hanno quindi suggerito che la stratificazione basata sui microRNA può fornire maggiori spiegazioni rispetto alla classificazione basata sull'RNA messaggero per l'identificazione di modificazioni molecolari che guidano la progressione verso l'HCC.

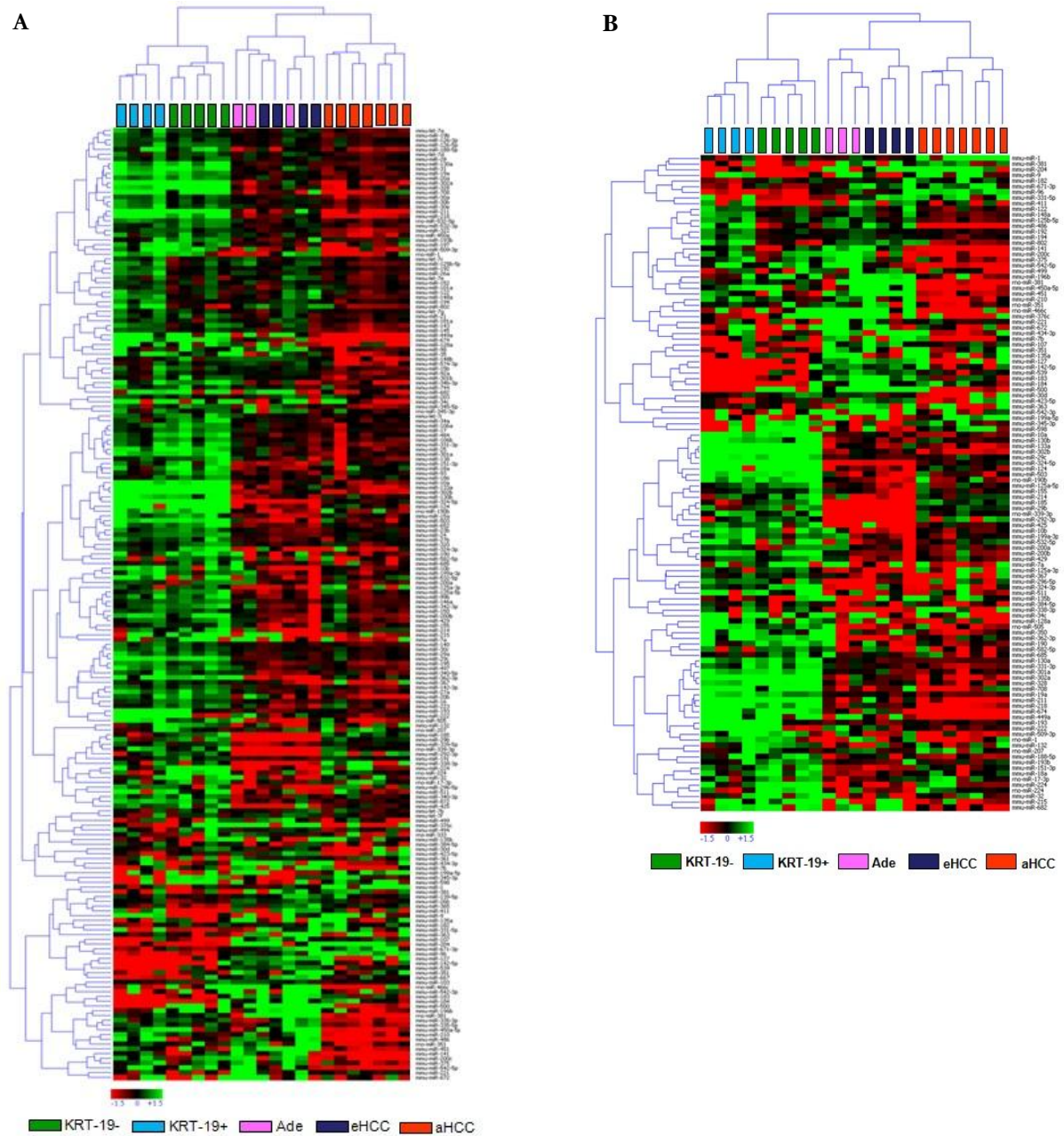


Fig.16: profilo dei microRNA nelle diverse fasi dell'epatocarcinogenesi.

A: Raggruppamento gerarchico del profilo di espressione dei miRNA in cui l'espressione relativa è rappresentata da un'heat map dove ogni riga rappresenta il profilo di espressione di uno dei 200 miRNA selezionati e ogni colonna rappresenta un campione

B: Cluster gerarchico dei microRNA che presentano una modificazione dei livelli di espressione superiore a 4 volte in un minimo di 2 campioni in almeno uno dei gruppi sperimentali considerati. L'espressione relativa è rappresentata da un'heat map dove ogni riga rappresenta l'espressione di uno dei 116 microRNA selezionati e ogni colonna rappresenta un campione. In entrambe le rappresentazioni i livelli di espressione sono espressi in $\Delta\Delta C_t$ calcolati rispetto ai relativi controlli.

I colori **rosso** e **verde** rappresentano rispettivamente alti e bassi livelli di espressione del microRNA in questione.

I risultati ottenuti dalle TLDA sono stati, anche in questo caso, validati per 10 microRNA selezionati casualmente; l'analisi dell'espressione dei singoli microRNA è stata effettuata mediante Real Time PCR quantitativa sulle singole lesioni ottenute dalle varie fasi del processo di cancerogenesi. Come mostrato dagli istogrammi [Fig.17] i livelli di espressione sono stati confermati nell'80% dei casi.

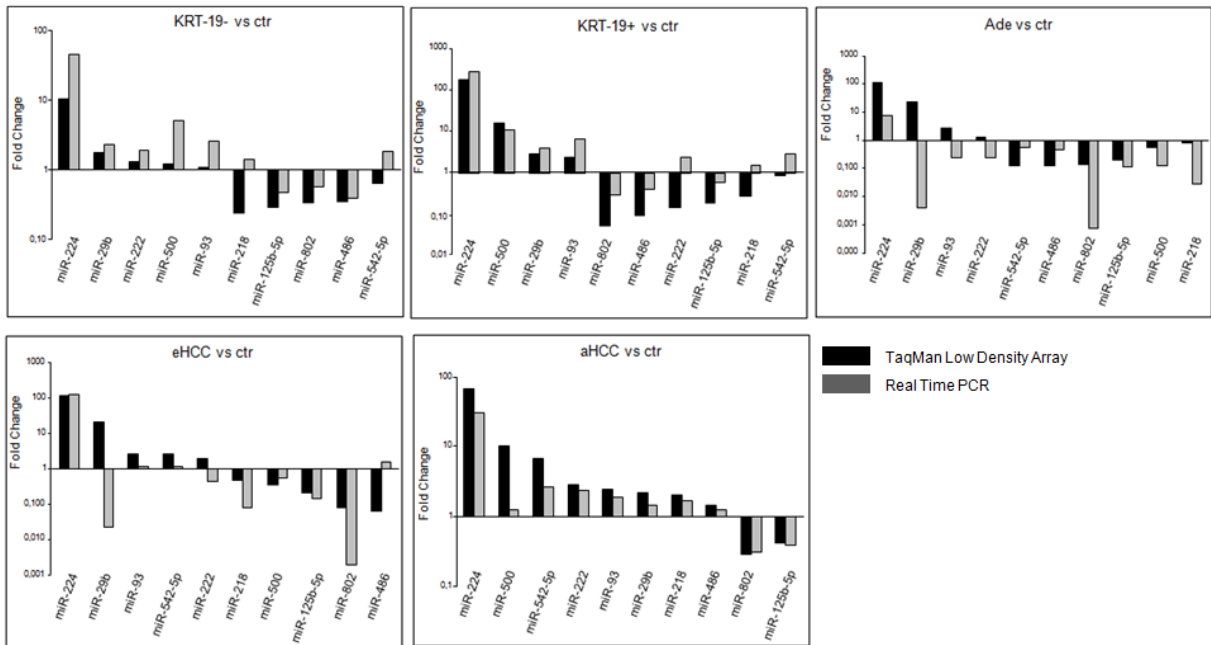


Fig.17: validazione, mediante RT-qPCR, di 10 microRNA selezionati casualmente: miR-224, miR-29b, miR-93, miR-542-5p, miR-222, miR-218, miR-500, miR-125b-5p, miR-802 e miR-486. L'espressione dei microRNA è stata valutata in: lesioni KRT-19-, KRT-19+, Ade, eHCC e aHCC

	KRT-19-	KRT-19+	Ade/eHCC	aHCC
Num tot	27	41	45	46
Iper	7	15	26	37
Ipo	20	26	19	9

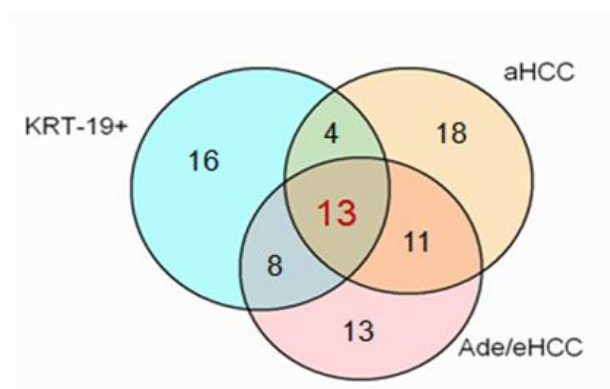


Fig.18: il diagramma di Venn e la relativa tabella mostrano il numero di microRNA differenzialmente espressi in ogni fase della progressione rispetto ai relativi controlli.

Così come per il trascrittoma, anche per il miRNoma è stato applicato il pacchetto per l'analisi LIMMA (*Smyth GK, 2005*) con l'obiettivo di identificare dei gruppi di microRNA differenzialmente espressi nelle varie fasi del processo di cancerogenesi epatica rispetto ai relativi controlli sani (aventi la stessa età).

Come mostrato a lato nel diagramma di Venn e nella relativa tabella [Fig.18], sono stati identificati dei miRNA specificamente deregolati in ogni fase del processo.

Il miRNoma mostra quindi delle modificazioni graduali nell'espressione dei microRNA, essendo ogni fase caratterizzata dall'alterazione di specifici microRNA [Tab. suppl. 3A e 3B]. Questo è un altro punto in contrasto con il trascrittoma dove la maggior parte dei geni associati allo sviluppo del tumore sono stati trovati alterati anche nelle fasi precoci del processo [heat map Fig.10].

In ogni caso, come mostrato dal diagramma di Venn e dalle tabelle [Fig. 18 e Tab. suppl. 4A, 4B e 4C], sono anche stati osservati dei miRNA comunemente deregolati nelle varie fasi del processo di epatocancerogenesi ed è interessante notare come 13 microRNA modificati già nelle lesioni pre-neoplastiche precoci KRT-19+ (miR-224, miR-122, miR-375 e altri), sono risultati deregolati

in tutte le fasi del processo [Fig.18 e Tab.4], suggerendo l'importanza del loro ruolo nello sviluppo del cancro. Come ulteriore conferma dell'importanza di questi microRNA nell'epatocancerogenesi, è stato osservato che 7 dei 13 microRNA deregolati in tutte le fasi del processo sono similmente deregolati anche negli HCC umani (Borel F et al., 2012).

Quando è stata effettuata l'analisi dei microRNA differenzialmente espressi tra le 2 popolazioni di lesioni pre-neoplastiche precoci (lesioni KRT-19- e KRT-19+), nessun miRNA ha superato il "test" del FDR al valore soglia selezionato di $p < 0.05$. E' stato quindi necessario utilizzare il t-test a un campione (one sample t-test) che ha permesso di identificare 23 microRNA aventi un $p < 0.05$ [Tab. suppl. 5] i quali potrebbero svolgere un ruolo importante per la progressione delle lesioni pre-neoplastiche KRT-19+ verso il carcinoma epatocellulare conclamato.

microRNA comunemente deregolati nelle lesioni preneoplastiche KRT-19+, negli Ade/eHCC e negli aHCC

miR-802
miR-224
miR-125b-5p
miR-194
miR-192
miR-185
miR-200b
miR-429
miR-499
miR-93
miR-214
miR-375
miR-122

Tab.4: microRNA comunemente deregolati in tutte le fasi dell'epatocancerogenesi. In rosso sono indicati i miRNA deregolati anche negli HCC umani

Analisi integrata mRNA/microRNA

Dopo aver effettuato entrambe le analisi di trascrittomica e miRNomica, ci siamo posti come ulteriore obiettivo quello di identificare una possibile correlazione tra i microRNA e i geni trovati differenzialmente espressi nelle diverse fasi del processo di cancerogenesi epatica.

Per farlo, è stato utilizzato l'algoritmo TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) mediante il quale è stato possibile identificare, per il ratto, i presunti target molecolari dei microRNA deregolati nella nostra ricerca. Sono poi stati estrapolati i microRNA bersaglianti ciascuno dei geni trovati differenzialmente espressi nelle varie fasi della progressione (noduli KRT-19+, Ade/eHCC e

aHCC); a questo punto è stato possibile effettuare l'intersezione tra i microRNA estrapolati e quelli trovati differenzialmente espressi nei corrispondenti gruppi sperimentali. In questo modo sono state identificate coppie interagenti di geni/microRNA differenzialmente espressi nello stesso step del processo di epatocancerogenesi. Mediante l'utilizzo del software Cytoscape è stato possibile rappresentare le interazioni geni/microRNA identificate. Ciò che è emerso è stato l'esistenza di networks nei quali un'elevata percentuale dei geni trovati modificati nel nostro modello sperimentale sono bersagliati da microRNA ugualmente deregolati. In particolare sono state esaminate nel dettaglio le differenze esistenti tra il tessuto epatico sano utilizzato come controllo e le lesioni pre-neoplastiche precoci KRT-19+; come mostrato in figura [Fig.19], sono emersi 2 nodi principali dove la famiglia del miR-30 e la famiglia del miR-200 esercitano il controllo sull'espressione di molti tra i geni trovati modificati.

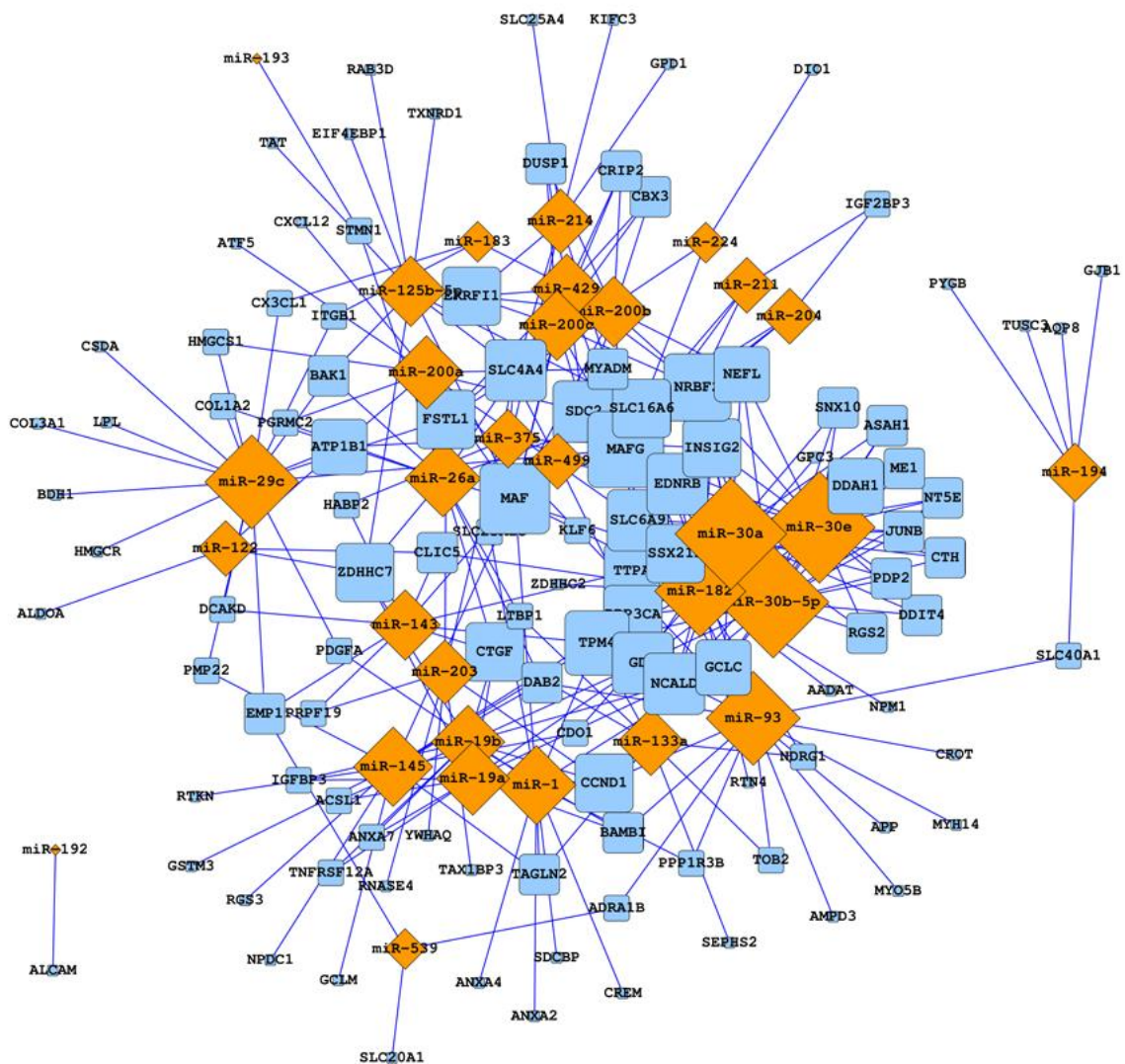


Fig.19: rappresentazione grafica delle interazioni geni/microRNA nella fase precoce (lesioni KRT-19+ rispetto ai controlli) dell'epatocancerogenesi. I rombi arancioni rappresentano i miRNA e i quadrati azzurri i geni. La grandezza delle figure riflette il grado di connettività tra geni e miRNA. Le frecce collegano i geni e i miRNA interagenti e differenzialmente espressi nella fase considerata.

Per quanto riguarda la famiglia del miR-30 è stato osservato, in accordo con TargetScan, che questa potrebbe regolare 23 tra i geni trovati deregolati nella popolazione pre-neoplastica positiva alla KRT-19.

Il profilo di espressione degli HCC di ratto rispecchia quello degli HCC umani

Come obiettivo finale ci siamo posti quello di stabilire quanti dei geni differenzialmente espressi negli HCC di ratto fossero deregolati anche nell'HCC umano in modo tale da scoprire se le modificazioni di espressione dell'RNA messaggero e dei microRNA trovate negli HCC di ratto fossero specie-specifiche o rispecchiassero il carcinoma epatocellulare umano.

Come prima cosa sono stati rimossi dall'elenco proveniente dai microarray tutti i geni aventi caratteristiche non riconosciute dal Rat Genome Database. In questo modo sono stati selezionati 159 geni provenienti dalla lista originale dei 234 geni deregolati negli HCC di ratto.

A questo punto è stato importante determinare quanti tra i 159 geni selezionati fossero ortologhi tra ratto e uomo, ed è stato così utilizzato Ensembl (<http://www.ensembl.org>) (Flicke P et al., 2012), uno dei principali database pubblici a livello mondiale che contiene informazioni sulle sequenze genomiche e i relativi dati biologici delle principali specie oggetto di studio.

Ensembl ha permesso di identificare 110 geni ortologhi tra le 2 specie prese in considerazione.

Al fine di identificare quanti geni, tra quelli ortologhi, fossero deregolati negli HCC di entrambe le specie, è stato poi utilizzato Liverome (Lee L et al., 2011), un database che si occupa delle "signatures" correlate ai tumori epatici essendo composto da 143 signatures prese da 98 studi riguardanti HCC umani. Grazie a Liverome è stato possibile scoprire che il 78% (86 su 110) dei geni ortologhi identificati sono deregolati nell'HCC di entrambe le specie [Tab. suppl. 6]. Quest'importante osservazione indica che le informazioni fornite dal modello sperimentale dell'Epatocita resistente da noi utilizzato, possono essere estese anche all'essere umano.

Con l'obiettivo di determinare se tra gli 86 geni identificati ve ne fossero alcuni deregolati già a partire dalle fasi iniziali del processo di epatocancerogenesi, è stato effettuato un incrocio tra la lista degli 86 geni deregolati negli HCC di entrambe le specie e i geni trovati deregolati nelle lesioni pre-neoplastiche precoci KRT-19+ di ratto. E' stato interessante trovare che, tra gli 86 geni identificati, 65 sono deregolati anche nelle lesioni pre-neoplastiche [grassetto in Tab. suppl. 6].

Per quanto riguarda i microRNA, ne sono stati identificati 46 come ortologhi tra le 2 specie. Mediante un'analisi basata su dati presenti in letteratura è stato possibile determinare che 26 dei 46 microRNA ortologhi sono comunemente alterati negli HCC di ratto così come in quelli umani

[Tab. suppl 7]. In particolare, in accordo con dati pubblicati da studi effettuati su HCC umani (*Borel F et al., 2012; Imbeaud S et al., 2012*), i miR-224, -93, -182, -183, -222, -324-5p e 151-3p sono stati trovati iper-espressi negli HCC di entrambe le specie e, allo stesso modo, i miR-1, -125-5p, -122, -194 sono stati trovati ipo-espressi sia negli HCC umani che in quelli di ratto.

Presi assieme, questi risultati supportano fortemente la potenziale utilità del modello dell'Epatocita Resistente per l'identificazione di alterazioni molecolari che si verificano durante lo sviluppo del carcinoma epatocellulare umano.

Discussione

L'epatocancerogenesi è un lento processo multifasico causato da un iniziale accumolo di alterazioni genetiche ed epigenetiche le quali portano alla comparsa e all'espansione di popolazioni clonali di epatociti trasformati che progrediscono a carcinoma epatocellulare.

Nonostante le modificazioni cellulari che conducono all'HCC siano abbastanza note, nell'uomo non è stato ancora possibile definire l'esatta sequenza delle alterazioni dei meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo e nella progressione tumorale, a causa dell'obiettivo difficoltà nel diagnosticare clinicamente le fasi precoci del processo tumorale. La maggior parte degli studi condotti finora si è quindi dovuta necessariamente focalizzare sullo studio dell'HCC conclamato, determinando un gap di conoscenze riguardo le alterazioni molecolari delle lesioni pre-neoplastiche precoci. Dal momento che la patogenesi molecolare dell'HCC non può essere compresa a fondo senza una più completa conoscenza delle alterazioni molecolari che si verificano durante le fasi precoci, si rivela necessario focalizzare l'attenzione sui precursori istologici dell'HCC, ovvero i noduli di epatociti fenotipicamente alterati e diaplasi (Thorgeirsson SS and Grisham JW, 2002) e, considerate le suddette difficoltà, si rivela necessario l'utilizzo di modelli di epatocancerogenesi sperimentale che aiutino a studiare più approfonditamente il processo di epatocancerogenesi.

Nella presente ricerca ci siamo quindi occupati di effettuare l'analisi del profilo di espressione globale dell'RNA messaggero e dei microRNA nel modello sperimentale dell'Epatocita Resistente, rivolgendo in particolar modo la nostra attenzione alle fasi molto precoci del processo caratterizzate dalla presenza di lesioni pre-neoplastiche fenotipicamente alterate.

Uno dei punti più interessanti che origina dal lavoro svolto, è la scoperta che il profilo di espressione dei microRNA è capace di caratterizzare in modo molto preciso la transizione tra una fase dell'epatocancerogenesi e la precedente. Infatti, l'analisi gerarchica non supervisionata dei microRNA ha permesso non solo di raggruppare le lesioni pre-neoplastiche KRT-19+ maggiormente "aggressive" da quelle KRT-19-, ma un'analisi più stringente ha anche separato gli adenomi dai carcinomi epatocellulari precoci.

La scoperta più rilevante è stata però osservare che un gruppo di 13 microRNA è deregolato già a partire dalle lesioni pre-neoplastiche precoci KRT-19+ e si mantiene alterato attraverso tutto il processo multifasico fino all'HCC avanzato. Se si considera il fatto che queste lesioni sono considerate i precursori dell'HCC, questa scoperta suggerisce che anche i microRNA hanno la capacità di prendere parte all'insieme di eventi iniziali che portano allo sviluppo dell'HCC, e che

possono quindi svolgere un ruolo molto importante nello sviluppo del carcinoma epatocellulare. Ciò potrebbe avere un'elevata rilevanza dal punto di vista clinico in quanto una delle sfide principali della diagnostica è quella di riuscire ad effettuare una diagnosi differenziale tra le lesioni pre-neoplastiche "borderline" al fine di separare i noduli completamente rigeneranti da quelli che progrediranno ad HCC.

L'identificazione di microRNA deregolati all'inizio del processo di cancerogenesi riportata in questo studio è una scoperta originale, dal momento che finora sono pochi gli studi che si sono incentrati sull'importanza della deregolazione dei microRNA nelle fasi molto precoci del processo di cancerogenesi epatica (*Imbeaud S et al., 2012; Varnholt H et al., 2008*). Nello specifico, gli studi precedenti hanno valutato l'espressione dei miRNA solo nel fegato intero di topi sottoposti al regime carcinogenico della dieta deficiente in metionina e colina (caratterizzata da un accumulo epatico di grassi e da una risposta infiammatoria) prima della comparsa delle lesioni pre-neoplastiche piuttosto che in noduli isolati (*Wang B et al., 2009; Wang B et al., 2010*).

Per quanto riguarda i microRNA deregolati nel nostro studio, alcuni tra questi sono stati trovati deregolati anche nell'HCC umano (*Borel F et al., 2012; Imbeaud S et al., 2012*): i miR-224, -93, -182, -183, -222, -324-5p e -151-3p sono stati trovati iper-espressi negli HCC di entrambe le specie e, allo stesso modo, i miR-1, -125b-5p, -122, -194 sono stati trovati ipo-espressi sia negli HCC umani che in quelli di ratto.

Ma la scoperta più interessante è stata osservare che 7 dei 13 microRNA alterati dall'inizio del processo, ovvero i miR: -224, -125b, -194, -185, -93, -357 e -122, erano stati precedentemente identificati alterati negli HCC umani (*Jiang J et al., 2008; Ladeiro Y et al., 2008; Budhu A et al., 2008; Giordano S and Columbano A, 2012*).

Sono sicuramente necessari ulteriori studi al fine di poter definire al meglio il ruolo di questi microRNA e dei loro geni target, ma i risultati ottenuti fanno ben sperare in un loro possibile ruolo come "giocatori" fondamentali per lo sviluppo e la progressione dell'HCC.

Una seconda importante scoperta emersa dallo studio svolto è stata mostrare che il 78% dei geni maggiormente iper-espressi (aventi un FC>5 rispetto ai relativi controlli) e l'83% dei geni maggiormente ipo-espressi (FC <-5) negli HCC tardivi di ratto, sono tra i più iper e ipo-espressi anche nelle lesioni pre-neoplastiche KRT-19+ e che la maggior parte di questi sono coinvolti in pathway del metabolismo. Ciò è molto importante in quanto suggerisce che le modificazioni metaboliche sono probabilmente necessarie, anche se non sufficienti, per consentire un incremento delle lesioni pre-neoplastiche e sostenere la loro progressione verso la condizione maligna.

In particolare è stato possibile osservare che un impressionante numero di geni coinvolti nel metabolismo degli xenobiotici e nella pathway attivata dallo stress ossidativo mediata dal fattore di trascrizione NFE2L2 (NRF2), sono modificati già nelle fasi iniziali del processo tumorigenico. Inoltre NRF2 è stato trovato attivato, già a partire dalle fasi precoci, anche nell'analisi delle pathways dipendenti da fattori di trascrizione. NRF2 appartiene alla via del segnale Keap1-NRF2-ARE la quale ha la capacità di regolare dall'1% al 10% dei geni umani (*Li J et al., 2002*). In seguito all'esposizione delle cellule a sostanze elettrofile o a stress ossidativo, questo fattore è in grado di sfuggire alla degradazione mediata da Keap1, traslocare nel nucleo, legarsi agli Antioxidant Responsive Elements (ARE) e attivare l'espressione di una serie di geni che porteranno alla sintesi di proteine con azione antiossidante e citoprotettiva. Tra i geni attivati troviamo: NQO1, GCLC, GPXx e alcuni componenti della famiglia GST (*Baird L and nkova-Kostova AT, 2011*). È stato interessante osservare che i geni target appena menzionati sono risultati differenzialmente espressi nella nostra ricerca e che molti di questi sono tra i più iper-espressi; quest'osservazione suggerisce che il fattore NRF2 può svolgere un ruolo importante in tutte le fasi che portano allo sviluppo dell'HCC. A tal proposito, è bene ricordare il lavoro di Wang (*Wang XJ et al., 2008*), nel quale è stata riscontrata un'iper-attivazione di NFE2L2 nella progressione di tumori umani non epatici così come nei meccanismi di resistenza farmacologica alla chemioterapia.

Il riassetto dei geni coinvolti nelle vie del segnale metaboliche deriva probabilmente da una risposta sincronizzata e tesa alla sopravvivenza, cui vanno incontro le cellule epatiche in seguito al danno indotto dai processi di iniziazione e promozione. Tuttavia, dal momento che simili modificazioni metaboliche sono state osservate anche in un modello di topi transgenici in assenza di trattamenti chimici (*Coulouarn C et al., 2011*) e in HCC umani, sembra che la risposta allo stress ossidativo sia una caratteristica generale che insorge successivamente a condizioni ostili quali virus, alcool, o sostanze chimiche.

Presi insieme, questi dati suggeriscono che la risposta antiossidativa è, inizialmente, un meccanismo adattativo che viene innescato per assicurare una migliore sopravvivenza alle cellule epatiche iniziate, ma che successivamente questa risposta diventa costitutiva favorendo la successiva evoluzione ad HCC delle cellule iniziate dal cancerogeno.

Più in generale, nel modello RH da noi utilizzato il riassetto metabolico persiste anche una volta che lo stimolo stressante è cessato (ovvero dopo le prime 4 settimane di trattamento) e osservare che la maggior parte dei geni alterati è similmente deregolata anche nelle fasi più avanzate del processo (ovvero negli HCC tardivi maligni), indica che le modificazioni metaboliche iniziali svolgono un ruolo molto più importante rispetto a quanto era stato precedentemente dimostrato. Tuttavia, nonostante le modificazioni metaboliche rappresentino

uno degli eventi più precoci nell'epatocancerogenesi, sono comunque necessarie altre alterazioni geniche al fine di garantire la progressione delle lesioni pre-neoplastiche verso l'HCC avanzato. Come ulteriore supporto dell'importante ruolo svolto dalle modificazioni che prendono atto nelle fasi precoci del processo tumorigenico, vi è il fatto che vie del segnale precedentemente identificate negli HCC di diverse specie, come la pathway della β -catenina/Wnt e quella del MYC, sono alterate già a partire dalle lesioni precoci (*de La Coste A et al., 1998; Kawate S et al., 1999*). Inoltre, dall'analisi effettuata con il software GSEA è emerso come le fasi precoci del nostro modello sperimentale siano arricchite di geni presenti in signature correlate con lo sviluppo e la ricorrenza dell'HCC e ciò suggerisce che gli eventi molecolari critici associati a una prognosi infausta potrebbero verificarsi già nelle fasi iniziali del processo.

Un'altra osservazione interessante derivata dal confronto tra geni e microRNA deregolati in ogni fase della progressione è l'esistenza di networks dove un'elevata percentuale dei geni modificati è target di microRNA anch'essi deregolati.

In particolare, l'analisi della fase di transizione da fegato sano di controllo a noduli precoci KRT-19+, ha permesso di identificare 2 gruppi principali di microRNA, ovvero la famiglia del miR-30 (miR-30a, -30d, 30e) e quella del miR-200 (miR-200a, 200b e -429), che controllano l'espressione di molti tra i geni modificati. Per quanto riguarda la famiglia del miR-30, questa potrebbe regolare (in accordo con TargetScan) circa 23 tra i geni deregolati in questa popolazione pre-neoplastica; oltre a questo, sembrerebbe svolgere un ruolo importante anche nelle successive fasi della progressione.

Per quanto riguarda invece la famiglia del miR-200, è degno di nota il fatto che il miR-200a, appartenente a questa famiglia, ha come gene target il KEAP1 ovvero il regolatore negativo della pathway KEAP1-NRF2-ARE alla quale appartiene il fattore di trascrizione NRF2 che già aveva suscitato il nostro interesse.

Con il nostro studio siamo quindi stati in grado di mostrare che la maggior parte dei geni (86%) e dei miRNA (57%) trovati deregolati negli HCC di ratto, sono ugualmente deregolati negli HCC umani. Una somiglianza così elevata nelle alterazioni dei geni e dei microRNA tra gli HCC appartenenti a specie diverse ed aventi diversa eziologia dimostra che il modello dell'Epatocita Resistente da noi utilizzato è in grado di rispecchiare, in parte, la situazione clinica che si verifica nell'HCC umano.

Conclusioni

In conclusione, la nostra analisi del profilo di espressione genica globale e del profilo di espressione dei microRNA, ha dimostrato che:

- la maggior parte dei geni e dei miRNA trovati deregolati negli HCC di ratto, sono ugualmente deregolati nella patologia umana;
- la maggior parte dei geni maggiormente deregolati negli HCC di ratto e uomo sono tra i più deregolati anche nelle lesioni pre-neoplastiche di ratto positive per il marcatore KRT-19;
- i microRNA hanno la capacità di prendere parte all'insieme di eventi iniziali che portano allo sviluppo dell'HCC in quanto alcuni di essi trovati deregolati nell'HCC di ratto e uomo sono stati identificati alterati già a partire dalle fasi pre-neoplastiche precoci di ratto del processo di cancerogenesi.

Il nostro lavoro ha quindi mostrato che la signature genica del modello di epatocancerogenesi sperimentale dell'Epatocita Resistente utilizzato è in grado di rispecchiare abbondantemente la signature dell'HCC umano e ha inoltre focalizzato l'attenzione sulle modificazioni geniche e dei microRNA che si verificano nelle fasi precoci del processo di epatocancerogenesi e che potrebbero svolgere un ruolo causale nel promuovere la progressione di questa patologia.

Il nostro studio può quindi fornire delle basi solide per analizzare in modo approfondito le modificazioni molecolari che si verificano durante le diverse fasi del processo multifasico dell'epatocancerogenesi e identificare nuovi potenziali geni e microRNA coinvolti nello sviluppo e nella progressione dell'HCC i quali, in ultima analisi, potrebbero consentire lo sviluppo di nuove terapie.

Bibliografia

- **Acquati F., Malgaretti N., Hauptschein R., Rao P., Gaidano G., Taramelli R.** (1994) *Genomics*; 22:664–666.
- **Alter M.J.** (2003) *Semin. Liver Dis.*; 23:39–46.
- **Andersen J.B., Loi R., Perra A., Factor V.M., Ledda-Columbano G.M., Columbano A., Thorgeirsson S.S.** (2010) *Hepatology*; 51(4):1401-9.
- **Aravalli R.N., Steer C.J., Cressman E.N.K.** (2008) *Hepatology*; 48:2047-2063.
- **Azechi H., Nishida N., Fukuda Y., Nishimura T., Minata M., Katsuma H., Kuno M., Ito T., Komeda T., Kita R., Takahashi R., Nakao K.** (2001) *Oncology*; 60:346–354.
- **Baffy G., Brunt E.M., Caldwell S.H.** (2012) *Journal of Hepatology*; 56:1384–1391.
- **Baird L. & nkova-Kostova A.T.** (2011) *Arch. Toxicol.*; 85:241-27231.
- **Bataller R. & Brenner D.A.** (2005) *J. Clin. Invest.*; 115:209–218.
- **Benjamini Y. and Hochberg Y.** (1995) *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*; 57:289-300.
- **Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A., Murchison E.P., Alcorn H., Li M.Z., Mills A.A., Elledge S.J., Anderson K.V., Hannon G.J.** (2003) *Nat. Genet.*; 35:215–217.
- **Blumberg R.S., Chopra S., Ibrahim R., Crawford J., Farraye F.A., Zeldis J.B., Berman M.D.** (1988) *Gastroenterology*; 95:1399-1402.
- **Borel F., Han R., Visser A., Petry H., van Deventer S.J., Jansen P.L., Konstantinova P.** (2012) *Hepatology*; 55(3):821-32.
- **Borel F., Konstantinova P., Jansen P.L.** (2012) *J. Hepatol.*; 56:1371-1383.
- **Bosch X., Ribes J., Borràs J.** (1999) *Semin. Liver Dis.*; 19:271–85.
- **Bottoni A., Piccin D., Tagliati F., Luchin A., Zatelli M.C., degli Uberti E.C.** (2005) *J. Cell. Physiol.*; 204:280–5.
- **Braconi C. & Patel T.** (2008) *Hepatology*; 47(6):1807-9.
- **Bressac B., Kew M., Wands J., Ozturk M.** (1991) *Nature*; 350:429–431.
- **Budhu A., Jia H.L., Forgues M., Liu C.G., Goldstein D., Lam A., Zanetti K.A., Ye Q.H., Qin L.X., Croce C.M., Tanq Z.Y., Wang X.W.** (2008) *Hepatology*; 47:897-907.
- **Calin G. A. & Croce C. M.** (2006) *Cancer Res.*; 66:7390–7394.

- **Calin, G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C.M.** (2002) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*; 99:15524–15529.
- **Calle E.E., Rodriguez C., Walker-Thurmond K., Thun M.J.** (2003) *N. Engl. J. Med.*; 348:1625–1638.
- **Callegari E., Elamin B.K., Giannone F., Milazzo M., Altavilla G., Fornari F., Giacomelli L., D'Abundo L., Ferracin M., Bassi C., Zagatti B., Corrà F., Miotto E., Lupini L., Bolondi L., Gramantieri L., Croce C.M., Sabbioni S., Negrini M.** (2012) *Hepatology*; 56(3):1025-33.
- **Chan D.W., Chan C.Y., Yam J.W., Ching Y.P., Ng I.O.** (2006) *Gastroenterology*; 131:1218–1227.
- **Chen R.X., Kia Y.H., Xue T.C., Ye S.L.** (2012) *Mol. Med. Report.*; 5:800-804.
- **Chen X.M.** (2009) *World J. Gastroenterol.*; 15(14):1665-1672.
- **Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M.** (1989) *Science*; 244:359-64.
- **Chuang S.C., La Vecchia C., Boffetta P.** (2009) *Cancer Letters*; 286:9-14.
- **Colombo M.** in: **Berr F., Bruix J., Hauss J., Wands J., Wittekind Ch.** (2003) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers BV and Falk Foundation; 67–74.
- **Cougot D., Neuveut C., Buendia M.A.** (2005) *J. Clin. Virol.*; 34:S75-8.
- **Coulouarn C., Factor V.M., Andersen J.B., Durkin M.E., Thorgeirsson S.S.** (2009) *Oncogene*; 28:3526-3536.
- **Coulouarn C., Factor V.M., Conner E.A., Thorgeirsson S.S.** (2011) *Carcinogenesis*; 32:1434-1440.
- **d'Adda di Fagagna F., Reaper P.M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., Von Zglinicki T., Saretzki G., Carter P., Jackson S.P.** (2003) *Nature*; 426:194–198.
- **De B.V., Welsh J.A., Yu M.C., Bennett W.P.** (1996) *Carcinogenesis*; 17:145–149.
- **de La Coste A., Romagnolo B., Billuart P., Renard C.A., Buendia M.A., Soubrane O., Fabre M., Chelly J., Beldjord C., Kahn A., Perret C.** (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 95:8847-8851.
- **Dennis P.A. & Rifkin D.B.** (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 88:580–584.
- **Di Micco R., Fumagalli M., Cicalese A., Piccinin S., Gasparini P., Luise C., Schurra C., Garrè M., Nuciforo P.G., Bensimon A., Maestro R., Pelicci P.G., d'Adda di Fagnana F.** (2006) *Nature*; 444:638–642.

- **Donato F., Tagger A., Gelatti U., Parrinello G., Boffetta P., Albertini A., Decarli A., Trevisi P., Ribero M.L., Martelli C., Porru S., Nardi G.** (2002) *Am. J. Epidemiol.*; 155:323– 331.
- **El-Serag H.B. & Rudolph K.L.** (2007) *Gastroenterology*; 132:2557-2576.
- **El-Serag H.B., Hampel H., Javadi F.** (2006) *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*; 4:369–380.
- **Fattovich G. and Llovet J.M.** (2006) *J. Hepatol.*; 44, 1013-6.
- **Flicek P., Amode M.R., Barrell D., Beal K., Brent S., Carvalho-Silva D., Clapham P., Coates G., Fairley S., Fitzgerald S., Gil L., Gordon L., Hendrix M., Hourlier T., Johnson N., Kähäri A.K., Keefe D., Keenan S., Kinsella R., Komorowska M., Koscielny G., Kulesha E., Larsson P., Longden I., McLaren W., Muffato M., Overduin B., Pignatelli M., Pritchard B., Riat H.S., Ritchie G.R., Ruffier M., Schuster M., Sobral D., Tang Y.A., Taylor K., Trevanion S., Vandrovcova J., White S., Wilson M., Wilder S.P., Aken B.L., Birney E., Cunningham F., Dunham I., Durbin R., Fernández-Suarez X.M., Harrow J., Herrero J., Hubbard T.J., Parker A., Proctor G., Spudich G., Vogel J., Yates A., Zadissa A., Searle S.M.** (2012) *Nucleic Acid Res.*; 40 (Database issue):D84-90.
- **Fu L. & Medico E.** (2007) *BMC Bioinformatics*; 8:3.
- **Gao J., Xie L., Yang W.S., Zhang W., Gao S., Wang J., Xiang Y.B.** (2012) *Asian Pacific J. Cancer Prev.*; 13:743-752.
- **Garner R.C., Miller E.C., Miller J.A.** (1972) *Cancer Res.*; 32:2058–2066.
- **Giordano S. & Columbano A.** (2012) *Hepatology*; 57(2):840-7.
- **Giovannucci E., Harlan D.M., Archer M.C., Bergenstal R.M., Gapstur S.M., Habel L.A., Pollak M., Regensteiner J.G., Yee D.** (2010) *Diabetes Care*; 33:1674–1685.
- **Gomaa A.I., Khan S.A., Toledano M.B., Waked I., Taylor-Robinson S.D.** (2008) *World J. Gastroenterol.*; 14, 4300-8.
- **Gyorffy E.J., Bredfeldt J.E., Black W.C.** (1989) *Ann. Intern. Med.*; 110:489-90.
- **Hashem B. El-Serag and K. Lenhard Rudolph** (2007) *Gastroenterology*; 132:2557-2576.
- **He H., Jazdzewski K., Li W., Liyanarachchi S., Nagy R., Volinia S., Calin G.A., Liu C.G., Franssila K., Suster S., Kloos R.T., Croce C.M., de la Chapelle A.** (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 102:19075–80.
- **Herbst A. & Kolligs F.T.** (2007). *Methods Mol. Biol.*; 361:63-91.
- **Hickman E.S., Moroni M.C., Helin K.** (2002) *Curr. Opin. Genet. Dev.*; 12:60-66.

- Higashitsuji H., Itoh K., Nagao T., Dowson S., Nonoguchi K., Kido T., Mayer R.J., Arii S., Fujita J. (2000) *Nat. Med.*; 6:96–99.
- Higgins G.M. & Anderson R.M. (1931) *Arch. Pathol.*; 12:186-202.
- Hu T.H., Huang C.C., Lin P.R., Chang H.W., Ger L.P., Lin Y.W., Changchien C.S., Lee C.M., Tai M.H. (2003) *Cancer*; 97:1929–1940.
- Huang S. & He X. (2011) *British Journal of Cancer*; 104:235–240.
- IARC (2008) Lyon: IARC Press.
- Imbeaud S., Ladeiro Y., Zucman-Rossi J. (2010) *Semin. Liver Dis.*; 30:75-86.
- Ji J., Shi J., Budhu A., Yu Z., Forgues M., Roessler S., Ambs S., Chen Y., Meltzer P.S., Croce C.M., Qin L.X., Man K., Lo C.M., Lee J., Ng I.O., Fan J., Tang Z.Y., Sun H.C., Wang X.W. (2009) *N. Engl. J. Med.*; 361(15):1437-47.
- Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler T.A., Nagorney D.M., Brackett D.J., Roberts L.R., Schmittgen T.D. (2008) *Clin. Cancer Res.*; 14:419-427.
- Kaposi-Novak P., Lee J.S., Gomez-Quiroz L., Coulouarn C., Factor V.M., Thorgeirsson S.S. (2006) *J. Clin. Invest.*; 116:1582–1595.
- Kawate S., Fukusato T., Ohwada S., Watanuki A., Morishita Y. (1999) *Oncology*; 57:157-163.
- Keng V.W., Tschida B.R., Bell J.B., Largaespada D.A. (2011) *Hepatology*; 53:781-790.23.
- Kenya P.R. (1990) *East. Afr. Med. J.*; 67:146-53.
- Kew M.C. (2009) *Cancer Letters*; 286:38-43.
- Korula J., Yellin A., Kanel G., Campofiori G., Nichols P. (1991) *Western J. Med.*; 155:416-8.
- Kota J., Chivukula R.R., O'Donnell K.A., Wentzel E.A., Montgomery C.L., Hwang H.W., Chang T.C., Vivekanandan P., Torbenson M., Clark K.R., Mendell J.R., Mendell J.T. (2009) *Cell*; 137: 1005–1017.
- Kowdley K.V. (2004) *Gastroenterology*; 127:S79-86.
- Kudo M. (2012) *World J. Gastroenterol.*; 18(42): 6005-6017.
- Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C. Bioulac-Sage P., Pelletier R., Rebouissou S., Zucmann-Rossi J. (2008) *Hepatology*; 47:1955-1963.
- Laudadio I, Manfroid I, Achouri Y, Schmidt D, Wilson MD, Cordi S, Thorrez L., Knoops L., Jacquemin P., Schuit F., Pierreux C.E., Odom D.T., Peers B., Lemaigre F.P. (2012) *Gastroenterology*; 142(1):119-29.

- Lechel A., Holstege H., Begus Y., Schienke A., Kamino K., Lehmann U., Kubicka S., Schirmacher P., Jonkers J., Rudolph K.L. (2007) *Gastroenterology*; 132:1465–1475.
- Lee J.S., Heo J., Libbrecht L., Chu I.S., Kaposi-Novak P., Calvisi D.F., Mikaelyan A., Roberts L.R., Demetris A.J., Sun Z., Nevens F., Roskams T., Thorgeirsson S.S. (2006) *Nat. Med.*; 12:410-416.
- Lee L., Wang K., Li G., Xie Z., Wang Y., Xu J., Sun S., Poalyko D., Bhak J., Kim C., Lee K.H., Jang Y.J., Yeom Y.I., Yoo H.S., Hwang S. (2011) *BMC Genomics*; 12 Suppl 3:S3.
- Lee R.C., Feinbaum, R.L., Ambros V. (1993) *Cell*; 75:843–854.
- Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. (2005) *Cell*; 120:15-20.
- Li J., Lee J.M., Johnson J.A. (2002) *J. Biol. Chem.*; 277:388-394.
- Lin C.J., Gong H.Y., Tseng H.C., Wang W.L., Wu J.L. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 375:315–320.
- Livak K.J. & Schmittgen T.D. (2001) *Methods*; 25:402-408.
- London W.T., McGlynn K.A. Liver cancer in: Schottenfield D., Fraumeni J.F. (1996) Oxford University Press; 772–93.
- McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, Devesa SS, Fraumeni JF Jr. (2001) *Int. J. Cancer*; 94:290–296.
- Melo S.A., Esteller M. (2011) *FEBS Letters*; 585:2087–2099.
- Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H., Ghoshal K., Jacob S.T., Patel T. (2007) *Gastroenterology*; 133: 647–658.
- Michael M.Z., O'Connor S.M., van Holst Pellekaan N.G., Young G.P., James R.J. (2003) *Mol. Cancer Res.*; 1:882–91.
- Micsenyi A., Tan X., Sneddon T., Luo J.H., Michalopoulos G.K., Monga S.P. (2004) *Gastroenterology*; 126:1134–1146.
- Milazzo M., Fornari F., Gramantieri L. (2011) *Minerva Gastroenterol. Dietol.*; 57:257-71.
- Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. (2006) *Oncogene*; 25:2537-2545.
- Muralidhar B., Goldstein L.D., Ng G., Winder D.M., Palmer R.D., Gooding E.L., Barbosa-Morais N.L., Mukherjee G., Thorne N.P., Roberts I., Pett M.R., Coleman N. (2007) *J. Pathol.*; 212:368–377.
- Nanji A.A., French S.W. (1985) *Cancer*; 56:2711-2.

- **PaRaskevi A.F., DePinho R.A.** (2006) *Nature*; 6:674-687.
- **Park J.K., Kogure T., Nuovo G.J., Jiang J., He L., Kim J.H., Phelps M.A., Papenfuss T.L., Croce C.M., Patel T., Schmittgen T.D.** (2011) *Cancer Res.*; 71(24):7608-16.
- **Park J.K., Kogure T., Nuovo G.J., Jiang J., He L., Kim J.H., Phelps M.A., Papenfuss T.L., Croce C.M., Patel T., Schmittgen T.D.** (2011) *Cancer Res.*; 71(24):7608-16.
- **Parkin D.M.** (2001) *Lancet Oncol.*; 2:533-543.
- **Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** (2001) *Int. J. Cancer*; 94:153-56.
- **Parkin DM.** (2002) IARC scientific publications volume VIII [No. 155]; Lyon: IARCPress.
- **Plentz R.R., Park Y.N., Lechel A., Kim H., Nellessen F., Langkopf B.H., Wilkens L., Destro A., Fiamengo B., Manns M.P., Roncalli M., Rudolph K.L.** (2007) *Hepatology*; 45:968-976.
- **Qian G.S., Ross R.K., Yu M.C., Wogan G.N., Tu J.T., Yuan G.M.,** (1994) *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*; 3:3-10.
- **Raza S.A., Clifford G.M., Franceschi S.** (2007) *Br. J. Cancer*; 96:1127-34.
- **Rudolph K.L., Chang S., Millard M., Schreiber-Agus N., DePinho R.A.** (2000) *Science*; 287:1253-1258.
- **Schottenfeld D, Joseph F, Fraumeni Jr** (2006) *Cancer Epidemiology and Prevention*, Third Edition. New York, NY: Oxford University Press, Inc.
- **Shimizu S., Takehara T., Hikita H., Kodama T., Miyagi T., Hosui A., Tatsumi T., Ishida H., Noda T., Nagano H., Doki Y., Mori M., Hayashi N.** (2010) *J. Hepatol.*; 52:698-704.
- **Sicklick JK, Li YX, Jayaraman A, Kannangai R., Qi Y., Vivekanandan P., Ludlow J.W., Owzar K., Chen W., Torberson M.S., Diehl A.M.** (2006) *Carcinogenesis*; 27:748-757.
- **Singal A.K., Anand B.S.** (2007) *J. Clin. Gastroenterol.*; 41:761-72.
- **Smoot M.E., Ono K., Ruscheinski J., Wang P.L., Ideker T.** (2011) *Bioinformatics*; 27:431-432.
- **Smyth G.K.** (2005) New York: Springer; 397-420.
- **Solt D.B., Medline A., Farber E.** (1977) *Am. J. Pathol.*; 88:595-618.
- **Stewart H.L.W., Keysser G., Lombard C.H., Montali L.S.** (1980) *Journal of National Cancer Institute*; 64:179-206.

- **Su Q., Fu Y., Liu Y.F., Zhang W., Liu J., Wang C.M.** (2003) *World J. Gastroenterol.*; 9:921-929.
- **Subramanian A., Tamayo P., Mootha V.K., Mukherjee S., Ebert B.L., Gillette M.A., Paulovich A., Pomeroy S.L., Golub T.R., Lander E.S., Mesirov J.P.** (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 102:15545-15550.
- **Thorgeirsson S.S. & Grisham J.W.** (2002) *Nat. Genet.*; 31:339–346.
- **Tomokuni A., Eguchi H., Tomimaru Y., Wada H., Kawamoto K., Kobayashi S.** (2011) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 414(4):675-80.
- **Trevisani F., Cantarini M.C., Wands J.R., Bernardi M.** (2008) *Carcinogenesis*; 29(7):1299-1305.
- **Turner P.C., Sylla A., Diallo M.S., Castegnaro J.J., Hall A.J., Wild C.P.** (2002) *J. Gastroenterol. Hepatol.*; 17(Suppl):S441–S448.
- **Van Gijssel H.E., Maassen C.B., Mulder G.J., Meerman J.H.** (1997) *Carcinogenesis*; 18:1027–1033.
- **Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, Odenthal M.** (2008) *Hepatology*; 47:1223-1232-28.
- **Villanueva A., Newell P., Chiang D.Y., Friedman S.L., Llovet J.M.** (2007) *Semin. Liver Dis.*; 27:55-76.
- **Wang B., Hsu S.H., Majumder S., Kutay H., Huang W., Jacob S.T., Ghoshal K.** (2010) *Oncogene*; 29:1787-1797.
- **Wang B., Majumder S., Nuovo G., Kutay H., Volinia S., Patel T., Schmittgen T.D., Croce C., Ghoshal K., Jacob S.T.** (2009) *Hepatology*; 50:1152-1161.
- **Wang L.Y., You S.L., Lu S.N., Ho H.C., Wu M.H., Sun C.A., Yang H.I., Chien-Jen C.** (2003) *Cancer Causes Control*; 14:241-50.
- **Wang X.J., Sun Z., Villeneuve N.F., Zhang S., Zhao F., Li Y., Chen W., Yi X., Zheng W., Wondrak G.T., Wong P.K., Zhang D.D.** (2008) *Carcinogenesis*; 29:1235-1243.
- **Wege H., Chui M.S., Le H.T., Strom S.C., Zern M.A.** (2003) *Cell Transplant*; 12:897–906.
- **Weston A.D. & Hood L.** (2004) *J. Proteome Res.*; 3:179-196.
- **White D.L., Ratziu V., El-Serag H.B.** (2008) *J. Hepatol.*; 49:831-44.
- **WHO** (2002) Available at www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf.
- **Wong C.M., Wong C.C., Lee J.M., Fan D.N., Au S.L., Ng I.O.** (2012) *Hepatology*; 55:1453-1461.

- **Xu Y., Xia F., Ma L., Shan J., Shen J., Yang Z., Liu J., Cui Y., Bian X., Bie P., Qian C.** (2011) *Cancer Lett.*; 310(2):160-9.
- **Yamada T., De Souza A.T., Finkelstein S., Jirtle R.L.** (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 94:10351–10355.
- **Yuan J.M., Govindarajan S., Arakawa K., Yu M.C.** (2004) *Cancer*, 101, 1009-17.
- **Zhu Q., Wang Z., Hu Y., Li J., Li X., Zhou L., Huang Y.** (2012) *Oncol. Rep.*; 27:1660-1668.

Tabelle supplementari

Tab. suppl.1: 1144 geni selezionati in seguito ad analisi informatica (p≤0.01; sottoposti a FDR)						
Unique ID	GENE	FC KRT-19-/CTR	FC KRT-19+/CTR	FC Ade/CTR	FC eHCC/CTR	FC aHCC/CTR
ILMN_1376479	Gstp1	40,92	91,93	80,37	80,59	45,38
ILMN_1366294	Gstp2	15,93	44,44	38,74	38,14	26,22
ILMN_1354910	Akr1b8	5,14	40,75	48,33	53,08	28,47
ILMN_1373177	Defb1	3,62	35,67	30,09	35,92	21,74
ILMN_1371516	Akr7a3	15,35	28,94	30,03	27,02	13,31
ILMN_1364348	Ca2	7,02	25,21	47,31	48,21	13,91
ILMN_1361065	Nefl	1,29	18,87	4,39	17,19	1,68
ILMN_2039396	Nqo1	5,63	18,24	23,96	23,65	12,95
ILMN_1357041	Pcp4	3,97	17,18	11,42	15,38	6,19
ILMN_1359516	Gclc	5,25	15,85	10,23	9,90	5,45
ILMN_1368948	Abcb1	2,29	15,35	9,63	9,10	4,43
ILMN_1357069	Cyp2c40	3,19	15,29	14,70	21,16	7,00
ILMN_1359094	Yc2	6,12	15,27	23,14	26,92	11,70
ILMN_1367475	Aldh1a1	7,20	15,15	6,86	7,04	2,87
ILMN_1368854	Gpx2	3,86	14,96	21,16	20,67	13,15
ILMN_1351428	Abcc3	6,66	13,47	12,94	13,54	5,61
ILMN_1373199	Krt1-19	1,94	12,66	13,09	15,21	8,36
ILMN_1349635	Ltb4dh	3,36	11,79	13,45	12,92	6,22
ILMN_1360900	Wbp5_predicted	2,35	11,09	10,23	9,79	4,86
ILMN_1356188	RGD1562954_predicted	1,99	9,61	14,81	10,76	5,93
ILMN_1358247	Slc25a4	2,21	9,28	14,09	14,56	7,05
ILMN_1375780	Maf	2,05	8,79	12,38	12,31	4,23
ILMN_1376258	Ddit4l	2,71	8,65	10,08	10,24	7,44
ILMN_1373883	S100a11	1,63	8,60	7,86	8,71	5,66
ILMN_1351679	LOC500040	2,28	8,26	11,94	11,11	5,84
ILMN_1364569	Cd24	1,84	7,62	5,01	5,13	3,55
ILMN_1374114	Gclm	2,28	7,51	11,02	12,28	4,53
ILMN_1363547	Ctse	1,31	7,26	6,37	6,52	2,80
ILMN_1365959	Cryl1	3,62	7,25	5,39	5,51	1,95
ILMN_1360780	Ugt1a6	3,01	7,12	6,44	6,39	3,38
ILMN_1358531	Tubb6	1,93	7,10	7,82	7,70	4,29
ILMN_1372232	Cyp2c55_predicted	4,16	6,60	4,34	4,06	4,55
ILMN_1373230	Slc17a3	3,34	6,56	6,06	5,46	3,66
ILMN_1364260	Anxa2	1,72	6,51	6,46	7,76	5,39
ILMN_1351186	Ephx1	3,60	6,07	5,15	5,04	2,45
ILMN_1361879	Cidea_predicted	3,03	5,95	4,20	3,93	2,06

ILMN_1376588	G6pdx	1,14	5,77	9,32	8,86	3,21
ILMN_1349787	Bzrp	1,65	5,59	8,52	7,34	4,39
ILMN_1360736	Ugdh	2,47	5,45	6,56	6,35	3,53
ILMN_1370818	Akr1c12_predicted	1,64	5,39	5,62	5,39	2,81
ILMN_1369938	Slc20a1	3,11	5,27	4,58	4,71	2,77
ILMN_1351917	Mgp	1,80	5,24	7,11	10,62	3,21
ILMN_1375039	Dscr11	1,67	5,04	4,64	4,66	1,82
ILMN_1372695	RGD1559604_predicted	1,42	5,02	5,32	5,07	2,91
ILMN_1360221	Tacstd1	2,00	5,01	3,61	3,25	1,89
ILMN_1356186	Rtn4	2,74	4,98	3,74	4,73	2,22
ILMN_1351237	Txnrd1	1,95	4,87	5,18	5,86	3,18
ILMN_1352580	Gsr	1,78	4,83	4,99	5,61	2,40
ILMN_1375028	Htatip2_predicted	2,66	4,82	5,20	4,77	4,11
ILMN_1365385	Igmn	1,22	4,76	3,52	4,26	1,85
ILMN_1374391	Rhoc_predicted	2,70	4,75	4,82	4,93	2,78
ILMN_1353729	Pgd	1,71	4,54	5,92	5,42	2,58
ILMN_2040432	Ngfrap1	1,75	4,50	3,22	3,50	2,51
ILMN_1366506	Pla2g7	1,12	4,45	5,95	7,09	2,07
ILMN_1373210	Entpd5	2,08	4,40	4,93	5,10	2,62
ILMN_1350180	Emp1	1,72	4,29	4,92	6,52	2,53
ILMN_1368460	LOC497706	1,25	4,27	3,17	3,81	1,54
ILMN_1359586	Scd2	1,39	4,27	5,96	5,74	3,84
ILMN_2039089	Adh1	2,00	4,16	2,41	2,58	1,61
ILMN_1357664	Sema6a_predicted	1,11	4,12	5,66	5,99	1,66
ILMN_1354712	Col1a2	1,83	4,03	4,67	6,31	1,72
ILMN_1365447	Cryab	1,62	3,97	13,25	21,18	6,16
ILMN_1354661	Rcn1_predicted	1,47	3,95	4,56	5,69	2,39
ILMN_1373523	Igfbp3	1,10	3,95	4,36	5,49	2,10
ILMN_1362377	Dap	2,32	3,94	4,44	4,56	3,53
ILMN_1370963	Anxa5	1,82	3,94	3,32	3,81	2,79
ILMN_1359191	Tspan3	1,33	3,93	6,70	6,20	2,76
ILMN_1358074	Npdc1	2,14	3,91	4,44	4,38	3,67
ILMN_1371225	Reep6	3,05	3,90	4,49	3,65	1,86
ILMN_1371122	Scpep1	2,38	3,83	5,40	5,60	3,05
ILMN_1375198	Ugt1a7	1,86	3,82	3,26	3,41	1,50
ILMN_1357890	Mmp12	1,49	3,74	3,09	2,99	2,78
ILMN_1376344	Fabp4	1,96	3,72	2,55	2,55	5,29
ILMN_1361328	Cd36	1,82	3,67	4,12	4,71	2,07
ILMN_1353924	Anxa1	1,29	3,67	7,84	10,54	3,25
ILMN_1371389	Myc	2,06	3,66	1,74	1,97	2,62
ILMN_1359052	Rhbg	2,77	3,65	3,92	3,59	3,44
ILMN_1368529	L3mbtl2	1,73	3,64	4,22	4,15	3,47

ILMN_1369735	Odc1	2,48	3,64	2,54	2,62	2,26
ILMN_1363873	Akr1b4	1,33	3,61	6,05	5,82	3,52
ILMN_1374546	Krt2-8	2,02	3,60	3,02	3,30	2,56
ILMN_1367509	Igfbp1	2,88	3,59	0,81	0,74	3,45
ILMN_1370454	Aox1	2,15	3,58	3,91	3,88	2,31
ILMN_1372377	Slc3a2	1,87	3,55	2,49	2,75	1,94
ILMN_1360909	Ednrb	1,66	3,51	2,43	2,36	1,49
ILMN_1366820	LOC499985	1,89	3,51	5,08	5,62	2,16
ILMN_1358691	Myadm	2,04	3,47	1,70	1,79	1,33
ILMN_1348976	Gss	2,27	3,44	2,53	2,08	2,01
ILMN_1351859	LOC365960	1,44	3,39	5,94	5,69	2,72
ILMN_1366721	Cxcl16	1,40	3,34	3,01	3,41	1,73
ILMN_1374412	RGD1563547_predicted	1,81	3,31	2,40	2,52	2,63
ILMN_1369072	Pir	1,86	3,31	5,90	6,03	3,26
ILMN_1362463	Tusc3	1,55	3,27	4,83	5,07	2,70
ILMN_1358976	Taldo1	1,25	3,27	4,00	4,10	2,46
ILMN_1355503	Slc17a1	1,34	3,23	3,48	3,22	1,81
ILMN_1370230	RGD1560513_predicted	1,93	3,23	1,97	2,00	1,59
ILMN_1358080	Por	2,36	3,19	2,36	1,98	1,15
ILMN_1357122	Ddah1	1,92	3,19	2,57	2,52	1,39
ILMN_1352285	Serpib1a	1,26	3,18	4,59	3,91	2,80
ILMN_1357047	Ces2	2,00	3,11	3,10	3,40	1,61
ILMN_1349466	Plp2_mapped	1,60	3,07	3,54	3,43	3,17
ILMN_1360376	App	1,79	3,06	2,88	3,16	1,60
ILMN_1369070	LOC286989	1,38	3,05	8,76	4,88	8,37
ILMN_1351282	Hmgcr	1,14	3,03	4,22	4,17	2,00
ILMN_1366349	Spint1	1,37	2,99	2,46	2,52	1,63
ILMN_1359113	Kifc3	2,17	2,98	2,38	2,34	1,54
ILMN_1357015	Slc6a9	1,31	2,95	2,58	2,64	1,58
ILMN_1352246	Igals3bp	1,74	2,95	2,71	3,12	2,04
ILMN_1371164	Pcyox1	1,64	2,94	4,15	2,93	2,43
ILMN_1650063	Tacc2	1,37	2,94	3,07	3,29	1,51
ILMN_1530347	LOC290651	1,64	2,92	2,62	2,45	2,43
ILMN_1365012	Impdh1_predicted	1,45	2,91	2,51	2,49	2,23
ILMN_1359893	Gsta2	1,59	2,91	3,80	3,91	1,93
ILMN_1368086	Igfbp7	1,61	2,88	3,19	3,80	1,86
ILMN_1352039	Gsta4	1,18	2,86	3,81	3,60	2,26
ILMN_1363139	LOC364048	1,80	2,86	1,68	1,87	1,65
ILMN_1354802	LOC686548	1,92	2,86	1,78	1,87	1,70
ILMN_1355287	Ctrc	1,14	2,85	5,05	5,03	1,53
ILMN_1650399	Tagln2	1,26	2,84	2,61	2,81	2,03
ILMN_1350480	S100a6	1,25	2,82	4,95	8,43	4,40

ILMN_1366337	RGD1560687_predicted	1,90	2,82	2,98	2,98	2,06
ILMN_1353912	Ubd	2,02	2,77	2,33	2,00	1,46
ILMN_1366266	Rtkn	1,52	2,77	2,70	2,47	2,44
ILMN_1351855	RGD1564762_predicted	1,68	2,76	2,43	2,69	1,65
ILMN_1361153	Serinc2	1,31	2,76	1,91	2,00	1,48
ILMN_1365802	Gpx3	1,19	2,74	4,43	6,16	2,01
ILMN_1357452	Gda	1,46	2,70	3,42	3,12	2,22
ILMN_1368780	Clic2	1,74	2,67	4,26	4,75	2,87
ILMN_1365239	Tmem55a	1,52	2,65	4,06	4,44	2,50
ILMN_1362080	Klf6	1,53	2,63	1,58	1,71	1,63
ILMN_1353436	LOC497719	1,31	2,63	2,51	2,44	1,76
ILMN_1364005	Rnd1	1,38	2,63	1,62	1,68	1,63
ILMN_1651185	RGD1310819_predicted	2,31	2,62	4,02	3,58	2,63
ILMN_1373609	Tnfrsf12a	1,23	2,60	2,36	2,63	2,59
ILMN_1363017	Mybl1_predicted	1,31	2,58	2,90	2,87	0,96
ILMN_1367581	RGD1560687_predicted	1,89	2,57	2,22	2,10	2,02
ILMN_1368759	Rexo2	1,52	2,57	2,66	2,32	1,93
ILMN_1351485	Slc40a1	1,12	2,57	3,16	3,45	1,88
ILMN_1367380	Aldoa	1,31	2,56	2,70	2,82	2,14
ILMN_1366203	Selenbp1	1,69	2,56	2,40	2,38	1,62
ILMN_1355794	RGD1562323_predicted	1,51	2,56	3,98	4,77	1,95
ILMN_1362167	LOC290651	1,50	2,55	2,72	2,48	2,41
ILMN_1376569	Abcc2	1,70	2,54	2,00	2,06	1,50
ILMN_1352889	Tctex1	1,35	2,54	2,76	2,85	2,37
ILMN_1370027	LOC302640	1,28	2,51	3,56	3,28	2,29
ILMN_1376798	Tacc2	1,25	2,51	3,33	3,24	1,52
ILMN_1369539	Ica1	1,72	2,49	2,54	2,55	2,94
ILMN_1354512	Ranbp1_predicted	2,16	2,48	2,18	2,09	2,04
ILMN_1370709	Mgst2_predicted	1,68	2,48	3,00	3,31	2,30
ILMN_1366996	Epdrr2	1,21	2,46	3,76	4,30	2,02
ILMN_1370821	RGD1565002_predicted	1,23	2,46	3,59	3,15	1,92
ILMN_1370995	Thnsl1	1,41	2,46	1,88	1,71	1,40
ILMN_1361838	Pdlim1	1,59	2,46	2,05	2,07	1,45
ILMN_1649741	Samd4_predicted	1,76	2,44	2,24	2,20	1,63
ILMN_1371313	Pla2g12a_predicted	1,74	2,44	2,48	2,54	2,19
ILMN_1650508	LOC503110	1,43	2,44	2,25	2,77	2,52
ILMN_1376441	Prnp	1,20	2,44	4,18	5,42	2,00
ILMN_1375110	Tmbim1	1,27	2,42	2,16	2,24	1,61
ILMN_1354490	LOC246263	1,90	2,42	4,24	4,31	3,02
ILMN_1361660	Pqlc3	1,21	2,42	3,40	3,84	2,16
ILMN_1354941	Col3a1	1,56	2,42	2,20	2,40	1,10
ILMN_1370665	Zfand2a	1,11	2,41	4,37	4,04	2,85

ILMN_1373829	Fxna	1,51	2,41	2,92	2,77	2,42
ILMN_1364113	Ctgf	1,33	2,41	1,39	2,04	2,18
ILMN_1355695	RGD1562617_predicted	1,12	2,40	2,30	2,31	1,58
ILMN_1372724	RGD1562136_predicted	1,43	2,40	2,18	2,15	1,90
ILMN_1373487	RGD1562373_predicted	1,44	2,39	2,80	2,36	1,54
ILMN_1369934	Ampd3	1,10	2,39	3,14	2,37	1,68
ILMN_1371544	Heph	1,15	2,39	5,61	5,34	1,60
ILMN_1374866	Hibch	1,54	2,39	3,19	2,88	1,61
ILMN_1350138	Plscr1	1,32	2,38	2,60	3,07	2,35
ILMN_1370869	RGD1308059	1,43	2,37	1,39	1,59	1,50
ILMN_1360686	LOC300191	1,28	2,37	2,91	3,13	2,29
ILMN_1369745	Avpi1	1,45	2,37	1,70	1,85	1,34
ILMN_1367585	RGD1307315	1,21	2,36	3,08	3,10	1,96
ILMN_1370644	Ckap4_predicted	1,26	2,35	2,47	2,50	1,94
ILMN_1360110	Afg3l2	1,24	2,34	3,11	2,98	1,42
ILMN_1351142	LOC502302	1,48	2,34	2,03	2,27	2,32
ILMN_1370840	Lgals3	0,99	2,34	3,22	2,88	2,39
ILMN_1358087	Synj2	1,54	2,33	2,31	2,53	1,71
ILMN_1363621	MGC94010	1,27	2,33	2,46	2,37	1,87
ILMN_1352516	LOC361417	1,83	2,33	1,70	1,71	4,88
ILMN_1359200	Timp1	1,33	2,33	1,75	1,98	1,59
ILMN_1354864	Prpf19	1,78	2,32	1,51	1,58	1,56
ILMN_1363839	Mfge8	1,08	2,32	2,50	2,25	1,81
ILMN_1352608	Tax1bp3	1,24	2,31	2,04	2,16	1,62
ILMN_1356539	Mif	1,65	2,31	2,01	2,19	1,70
ILMN_1361299	Itgb1	1,39	2,29	1,65	1,96	1,47
ILMN_1357053	Lpl	1,37	2,29	4,53	5,22	2,70
ILMN_1650907	LOC680876	1,30	2,28	3,12	3,16	2,47
ILMN_1357600	Acaa2	1,36	2,27	2,37	2,31	1,01
ILMN_1353069	Cox17	1,49	2,26	2,35	2,22	2,24
ILMN_1372999	Sdcbp	1,15	2,26	2,93	3,13	1,85
ILMN_1367325	Deakd	1,40	2,25	2,74	2,53	1,56
ILMN_1357709	Nola2_predicted	1,66	2,25	2,03	1,90	2,42
ILMN_1366787	Cbx3	1,43	2,24	2,30	2,48	2,30
ILMN_1375135	Ctps_predicted	1,66	2,24	1,87	1,99	1,91
ILMN_1367107	Aqp8	1,41	2,23	2,53	2,55	2,16
ILMN_1370390	Nme2	1,47	2,23	2,50	2,96	2,23
ILMN_1371962	Ier3	1,67	2,23	1,58	1,83	1,60
ILMN_1366443	LOC363418	1,62	2,23	1,64	1,81	1,72
ILMN_1364522	Dnajc17_predicted	1,31	2,23	2,68	2,42	1,97
ILMN_1373346	Myo5b	1,16	2,22	2,48	2,46	1,31
ILMN_1365861	LOC687298	1,46	2,22	1,94	2,11	2,25

ILMN_1349205	RGD1562905_predicted	1,51	2,22	2,02	2,40	1,74
ILMN_1373953	Cd74	1,07	2,22	2,83	3,03	1,33
ILMN_1353239	Eif4ebp1	1,62	2,22	1,93	1,90	1,76
ILMN_1365485	Pdgfa	1,42	2,21	2,07	2,77	1,97
ILMN_1356726	Tmem34	1,40	2,20	2,32	2,36	1,79
ILMN_1363374	RGD1566189_predicted	1,66	2,20	1,96	1,86	1,50
ILMN_1351674	Gdf15	1,08	2,20	2,35	2,37	1,28
ILMN_1649970	Trim54	2,96	2,20	3,58	2,04	1,74
ILMN_1357966	Phgdh	1,40	2,20	2,12	1,98	2,61
ILMN_1361558	Pspla1	1,80	2,20	1,38	1,51	2,45
ILMN_1352772	Tubb2c	1,57	2,20	1,97	1,89	1,86
ILMN_1356608	LOC499201	1,46	2,19	2,20	2,34	2,71
ILMN_1376459	RT1-Db1	1,05	2,19	2,87	2,98	1,44
ILMN_1355383	Dab2	0,96	2,19	3,76	3,29	1,34
ILMN_1374022	Bdh2_predicted	1,75	2,19	2,73	2,43	1,66
ILMN_1372040	RGD1307982	1,42	2,19	2,46	2,35	1,74
ILMN_1376661	Lbp	1,39	2,19	3,55	5,12	5,75
ILMN_1649846	LOC364236	1,40	2,19	2,12	2,63	2,31
ILMN_1364920	Snx10	1,62	2,19	2,17	2,28	2,16
ILMN_1365716	Gstm1	2,02	2,18	2,70	2,61	2,22
ILMN_1367708	Hprt	1,33	2,18	2,90	3,20	1,61
ILMN_1366981	Ftl1	1,65	2,18	1,99	2,00	1,55
ILMN_1354735	RGD1563956_predicted	1,53	2,15	1,65	1,66	1,80
ILMN_1375690	38231,00	1,32	2,15	1,68	1,91	1,71
ILMN_1361928	Zdhhc2	1,43	2,15	2,22	2,43	1,79
ILMN_1357303	Aldh3a1	1,06	2,15	2,66	4,70	2,14
ILMN_1368380	Asah1	1,30	2,15	2,32	2,55	1,67
ILMN_1651088	Anxa7	1,28	2,13	2,51	2,76	1,91
ILMN_1351656	Dcn	1,38	2,12	4,08	5,25	1,88
ILMN_1366115	Cd151	1,28	2,12	2,08	2,23	1,53
ILMN_1354206	Tuba1	1,24	2,12	3,09	4,44	2,00
ILMN_1360286	Slpi	0,95	2,12	3,01	3,43	1,22
ILMN_1352355	LOC497920	1,51	2,11	1,84	1,98	1,92
ILMN_1358443	Eif2b2	1,49	2,11	2,17	2,13	1,86
ILMN_1364637	Mafg	1,48	2,10	2,48	2,39	1,59
ILMN_1376819	38231,00	1,27	2,10	1,73	1,96	1,51
ILMN_1351677	Ccl19_predicted	1,34	2,10	1,60	1,76	1,67
ILMN_1349705	Anxa4	1,52	2,10	2,24	2,34	2,04
ILMN_1370001	Rpl17	1,48	2,10	1,89	2,27	1,93
ILMN_1357093	Tpm4	1,11	2,09	1,82	2,27	1,51
ILMN_1376935	RT1-Da	1,00	2,08	3,66	4,09	1,50
ILMN_1348931	Capn2	1,30	2,08	2,84	3,12	1,65

ILMN_1366201	Aldoa	1,24	2,08	2,43	2,72	2,33
ILMN_1365484	Ncf2_predicted	1,33	2,07	2,85	2,86	2,74
ILMN_1371046	LOC688103	1,52	2,07	2,53	2,92	1,49
ILMN_1370719	Fbln1_predicted	1,15	2,07	4,91	5,49	1,83
ILMN_2039472	LOC364582	1,35	2,06	2,16	2,13	2,20
ILMN_1357560	RGD1308696	1,20	2,05	2,26	2,39	1,75
ILMN_1363431	Ltbp1	1,35	2,05	1,57	1,74	1,33
ILMN_1371113	Cx3cl1	1,35	2,04	1,71	1,86	1,75
ILMN_1361269	Atp6v1d	1,14	2,04	2,30	2,42	1,86
ILMN_1352450	RGD1565950_predicted	1,28	2,04	1,93	1,92	1,66
ILMN_1373876	Pmp22	1,27	2,04	3,16	3,94	1,33
ILMN_1362242	LOC501280	1,00	2,03	2,61	2,80	1,54
ILMN_1355549	Cct2	1,44	2,02	1,99	2,13	1,85
ILMN_1357518	Ppap2c	1,87	2,02	1,88	1,74	2,12
ILMN_1368116	LOC367398	1,42	2,01	2,08	2,51	1,80
ILMN_1350446	Ropn1	1,55	2,01	2,05	2,22	1,61
ILMN_1373719	Zdhhc7	1,33	2,01	2,34	2,40	1,62
ILMN_1351960	LOC500506	1,01	2,00	2,47	2,47	1,24
ILMN_1360345	Clic5	1,08	2,00	2,17	2,17	1,25
ILMN_1371772	PVR	1,21	2,00	1,81	1,81	2,05
ILMN_1350174	Rab3d	1,20	1,99	2,42	2,15	2,18
ILMN_1376607	Slc16a6	1,37	1,99	2,36	2,32	1,47
ILMN_1359358	Smp2a	3,29	1,98	0,95	1,11	1,22
ILMN_1359346	Aph1b	1,18	1,98	2,22	2,38	1,51
ILMN_1357747	Ddit4	1,25	1,98	1,87	2,06	1,84
ILMN_1373157	Wfdc2	1,15	1,98	1,23	1,27	1,03
ILMN_1360299	Thyn1	1,20	1,98	1,85	1,85	1,49
ILMN_1365751	Kpnb3_predicted	1,26	1,98	2,60	2,64	1,43
ILMN_1373866	Rps5	1,36	1,97	2,00	2,25	2,15
ILMN_1349198	Itm2c	1,39	1,97	1,50	1,49	1,46
ILMN_1372583	Pabpc4_predicted	1,56	1,96	1,99	1,97	1,95
ILMN_1360317	Smoc2_predicted	1,32	1,96	3,96	4,50	1,47
ILMN_1372419	LOC316326	1,54	1,96	1,52	1,46	2,06
ILMN_1363490	Npm1	1,20	1,96	1,94	2,40	1,40
ILMN_1374672	Nol5	1,26	1,95	2,29	2,53	2,76
ILMN_1360587	Ccnb2	1,28	1,95	4,12	3,85	3,22
ILMN_1364180	RGD1564883_predicted	1,44	1,94	1,32	1,56	1,91
ILMN_1356682	RGD1565429_predicted	1,24	1,93	2,02	2,15	3,05
ILMN_1363448	Slc39a4_predicted	0,92	1,92	2,41	1,54	1,33
ILMN_1348787	Ugt2b4	1,42	1,92	1,99	2,01	1,18
ILMN_1350349	Sox4_predicted	1,09	1,92	2,33	2,39	1,16
ILMN_1349419	Stmn1	1,20	1,92	2,54	2,60	2,11
ILMN_1370316	Atp1b1	1,28	1,91	1,36	1,68	1,72

ILMN_1354884	Fstl1	1,50	1,91	1,91	2,46	1,48
ILMN_1351016	RGD1562153_predicted	1,28	1,91	2,04	2,30	1,94
ILMN_1351117	Ctsl	1,32	1,91	2,21	2,07	1,65
ILMN_1374380	Col14a1_predicted	1,34	1,90	1,25	1,33	1,01
ILMN_1367456	C1qbp	1,37	1,90	2,14	1,97	1,61
ILMN_1351805	Prdx6	1,22	1,90	2,34	2,45	1,73
ILMN_1363337	RGD1564370_predicted	1,32	1,89	1,38	1,64	1,51
ILMN_1361603	Vil2	1,28	1,89	1,97	2,23	1,71
ILMN_1354493	Ninj1	1,24	1,88	2,13	1,84	1,49
ILMN_1361650	RGD1563988_predicted	1,30	1,88	2,17	2,09	1,78
ILMN_1353763	LOC501203	1,12	1,88	2,03	2,20	1,69
ILMN_1351180	LOC367047	1,27	1,87	1,55	1,79	1,67
ILMN_1374713	Gnb2l1	1,22	1,87	2,07	2,53	1,77
ILMN_1357241	Pmm1	1,27	1,87	2,13	2,18	1,89
ILMN_1362335	LOC316130	1,64	1,86	1,98	1,94	1,55
ILMN_1361943	LOC362290	1,31	1,86	1,55	1,74	1,44
ILMN_1351431	RGD1559938_predicted	1,17	1,86	2,01	2,55	1,68
ILMN_1368304	Nipsnap3a	1,39	1,85	2,05	1,86	1,42
ILMN_1356716	Prkcdbp	1,71	1,85	2,02	2,06	1,79
ILMN_1349114	Serpnb6a	1,11	1,85	2,97	2,82	1,75
ILMN_1369091	RGD1564876_predicted	1,28	1,84	1,90	1,96	1,80
ILMN_1650594	Rps7	1,25	1,84	1,77	2,26	1,64
ILMN_1367964	Gnai2	1,23	1,84	2,30	2,39	1,96
ILMN_1355811	Gjb2	1,56	1,83	2,45	2,25	1,21
ILMN_1358097	Ppp2ca	1,06	1,83	1,99	2,06	1,31
ILMN_1355756	Csda	1,19	1,83	2,45	2,50	2,27
ILMN_1370366	Dpp7	1,17	1,83	1,92	2,09	1,91
ILMN_1355773	Col6a3_predicted	1,13	1,82	1,73	2,03	0,95
ILMN_1354702	LOC362934	0,93	1,82	3,26	3,82	1,72
ILMN_1350699	RGD1562404_predicted	1,54	1,81	1,49	1,51	1,76
ILMN_1368901	Tsx	1,57	1,81	1,28	1,67	2,05
ILMN_1350494	Ubc	1,86	1,80	0,90	0,88	0,77
ILMN_1370544	Tubb5	1,22	1,80	1,92	2,09	1,79
ILMN_1362763	LOC691966	1,30	1,80	1,40	1,93	1,23
ILMN_1359735	Snrp70_predicted	1,72	1,79	1,30	1,24	1,26
ILMN_1370211	Lrrc50	1,23	1,79	2,21	2,26	1,58
ILMN_1364814	LOC361841	1,07	1,78	1,67	1,79	1,35
ILMN_1354013	Gpc3	1,40	1,78	2,50	2,78	2,17
ILMN_1354948	LOC497816	1,30	1,78	2,17	2,08	1,84
ILMN_1356892	Bnip3	1,59	1,78	1,31	1,28	1,40
ILMN_1373337	Pik4ca	1,14	1,78	2,02	1,87	1,34
ILMN_1368821	Flna_predicted	1,04	1,78	1,80	2,00	1,77

ILMN_1376669	RT1-Ba	0,93	1,78	2,68	3,22	1,44
ILMN_1350372	Ccnd1	1,17	1,78	2,39	2,89	1,58
ILMN_1373706	Fabp2	1,21	1,77	2,01	2,09	1,84
ILMN_1376983	Ces3	1,41	1,77	2,17	2,13	1,05
ILMN_1367577	Slc4a4	1,33	1,76	1,34	1,47	1,06
ILMN_1349797	Sepw1	1,25	1,76	2,06	2,29	2,11
ILMN_1358631	Abcg5	2,26	1,76	1,05	0,85	1,73
ILMN_1353990	Bok	1,43	1,76	2,47	2,67	2,41
ILMN_1353251	Tep1	1,22	1,76	2,01	1,96	1,26
ILMN_1355039	Actb	0,98	1,75	2,08	2,25	1,36
ILMN_1364343	Nr1i3	1,91	1,75	1,90	1,83	1,03
ILMN_1366328	RGD1564315_predicted	1,67	1,75	1,82	1,82	1,96
ILMN_1376434	Pgrmc1	1,18	1,75	2,42	2,28	1,47
ILMN_1376765	Lcp1	0,94	1,74	2,98	2,65	1,66
ILMN_1363944	Sms	1,18	1,74	1,89	2,35	1,67
ILMN_1372029	LOC497766	1,31	1,74	2,20	2,44	1,21
ILMN_1355682	Cd63	1,08	1,74	2,88	2,48	2,88
ILMN_1362179	Pygb	1,04	1,74	2,88	3,02	1,65
ILMN_1364467	RGD1561886_predicted	1,23	1,74	1,50	1,76	1,79
ILMN_1362054	Cfl1	0,95	1,74	2,32	2,34	2,18
ILMN_1372795	Arpp19	1,69	1,73	1,73	1,65	1,66
ILMN_1363762	Ear11	1,37	1,73	1,71	1,29	2,63
ILMN_1365841	Myh14	1,41	1,73	3,20	2,86	1,59
ILMN_1650758	Ugt2b4	1,40	1,72	1,89	1,93	1,29
ILMN_1364291	Spbc24_predicted	1,21	1,72	2,73	2,39	2,20
ILMN_1358829	Ugp2	1,64	1,70	2,22	2,52	1,70
ILMN_1370154	Alcam	1,26	1,70	1,19	1,34	1,21
ILMN_1367600	RGD1565540_predicted	0,91	1,70	2,55	2,82	1,76
ILMN_1372512	RGD1559877_predicted	1,14	1,70	1,53	1,89	1,61
ILMN_1352924	Gstm5	1,02	1,69	2,05	1,95	1,56
ILMN_1370798	Plxdc2_predicted	1,09	1,69	3,41	3,44	1,76
ILMN_1358082	Cd83_predicted	1,06	1,68	1,69	1,76	1,31
ILMN_1350340	Hrmt111	1,07	1,68	2,03	2,17	1,67
ILMN_1364929	Bambi	1,19	1,68	2,76	2,78	1,65
ILMN_1350784	Junb	1,74	1,68	1,35	1,58	1,45
ILMN_1362729	MGC112727	1,19	1,67	2,02	2,28	1,67
ILMN_1368003	Cct6a_predicted	1,30	1,67	1,81	2,08	1,67
ILMN_1352448	RGD1565054_predicted	1,34	1,66	1,44	1,44	1,89
ILMN_1364500	Hspcal3_predicted	1,27	1,66	1,50	1,62	1,51
ILMN_1368533	RGD1564423_predicted	1,29	1,65	1,22	1,41	1,38
ILMN_1353589	Sult1b1	1,10	1,65	1,96	1,86	1,07
ILMN_1367207	LOC303471	1,12	1,65	2,22	2,22	1,95

ILMN_1351536	F11r	1,24	1,64	1,19	1,31	0,95
ILMN_1365429	Fdx1	1,21	1,64	1,46	1,42	1,25
ILMN_2040754	Ran	1,19	1,64	2,01	2,18	1,65
ILMN_1360786	Fkbp8	1,35	1,63	1,73	1,60	1,16
ILMN_1369116	RGD1565372_predicted	1,27	1,63	1,90	1,86	1,80
ILMN_1354937	Rpl13	1,27	1,62	1,82	2,03	1,94
ILMN_1365045	Snrpn	0,95	1,61	2,25	1,90	1,26
ILMN_1371503	RGD1561694_predicted	1,30	1,61	2,20	2,43	2,45
ILMN_1363917	Pbef1	1,45	1,60	0,82	0,81	1,32
ILMN_1367242	RGD1563476_predicted	1,32	1,60	1,43	1,27	1,85
ILMN_1369274	Akr1c1_predicted	1,08	1,60	4,49	2,96	1,92
ILMN_1370760	Wdr1	0,96	1,60	1,99	1,94	1,59
ILMN_1356759	RGD1566282_predicted	1,17	1,60	2,16	2,35	1,43
ILMN_1358347	Pls3	1,10	1,60	1,73	2,17	1,04
ILMN_1376672	Dync1h1	1,25	1,60	1,53	1,49	1,48
ILMN_1365334	Ywhaq	1,05	1,59	2,34	2,57	1,50
ILMN_1376748	Hexb	1,09	1,59	2,16	2,33	1,57
ILMN_1650633	LOC499793	1,36	1,59	1,11	1,09	1,85
ILMN_1362121	Dmbt1	1,31	1,58	1,01	0,98	1,31
ILMN_1364684	RGD1562168_predicted	1,19	1,58	1,98	1,66	2,00
ILMN_1362269	Actg_predicted	0,95	1,58	1,79	2,03	1,61
ILMN_1374027	Ppt1	1,03	1,58	2,08	2,40	1,22
ILMN_1376530	RT1-A3	0,89	1,57	1,60	1,69	1,13
ILMN_1372846	Bak1	0,94	1,57	2,44	2,86	1,58
ILMN_1650302	RGD1565844_predicted	1,07	1,56	3,19	2,41	1,64
ILMN_1369573	LOC688712	1,21	1,56	2,45	2,53	1,30
ILMN_1372414	Ppp3ca	1,17	1,55	1,09	1,17	1,04
ILMN_1350896	Gstm2	1,12	1,55	1,03	1,06	0,64
ILMN_1367523	Lgals1	1,17	1,55	2,13	2,64	1,78
ILMN_1368179	LOC689820	1,08	1,55	2,06	1,86	1,94
ILMN_1370927	MGC72957	1,32	1,55	1,42	1,55	1,31
ILMN_1353248	LOC361596	1,19	1,54	2,23	2,62	1,16
ILMN_1365669	Mark2	1,22	1,54	1,89	1,74	1,31
ILMN_1364908	Tmepai_predicted	1,12	1,53	2,02	2,27	1,55
ILMN_1365946	Me1	1,40	1,53	2,00	1,88	1,14
ILMN_1352014	Ogn_predicted	1,21	1,53	2,69	3,33	1,23
ILMN_1650062	RGD1563903_predicted	1,11	1,52	2,02	2,13	1,54
ILMN_1366276	Cyba	0,94	1,52	1,74	1,87	1,77
ILMN_1649963	Tpm3	1,05	1,51	2,00	2,21	1,43
ILMN_1368619	Anxa3	0,77	1,51	1,40	1,47	1,36
ILMN_1358144	Hspca	1,20	1,51	1,63	1,78	1,30
ILMN_1353346	Ltbp4	1,29	1,51	1,71	1,96	1,02

ILMN_1355237	Cxcl1	1,23	1,51	0,98	1,25	1,89
ILMN_1376328	Cd59	0,88	1,50	1,07	1,59	1,45
ILMN_1362451	Rgs2	1,12	1,50	1,92	2,16	2,00
ILMN_1361472	LOC500959	1,12	1,50	1,30	1,34	1,21
ILMN_1357012	LOC680847	1,05	1,49	2,22	2,24	1,70
ILMN_1360726	D1bwg1363e	1,28	1,48	1,92	2,09	2,02
ILMN_1354728	RGD1564698_predicted	1,22	1,48	1,63	1,89	1,52
ILMN_1363443	RGD1564087_predicted	1,02	1,47	1,81	2,03	1,48
ILMN_1349268	Rhoa	1,38	1,47	1,26	1,08	1,03
ILMN_1349202	Dhcr7	1,00	1,46	2,43	2,43	1,28
ILMN_1353445	Cttnbp2nl_predicted	1,00	1,46	1,99	2,13	1,60
ILMN_1364203	Pcna	1,05	1,45	2,75	2,77	1,88
ILMN_1649783	LOC680847	1,05	1,45	2,05	2,24	1,72
ILMN_1375078	RGD1561154_predicted	1,18	1,45	1,38	1,27	1,51
ILMN_1372614	Ncald	1,59	1,45	1,95	2,21	2,01
ILMN_1356828	Arg1	1,81	1,44	0,82	0,80	0,67
ILMN_1358888	Psmb10	1,07	1,44	1,82	1,76	1,69
ILMN_1351487	RT1-A1	0,91	1,43	1,56	1,73	0,98
ILMN_1361441	Pltp_predicted	0,96	1,43	1,62	1,70	0,93
ILMN_1349681	Rps2	1,18	1,43	1,11	1,18	0,90
ILMN_1359739	C1qg	0,87	1,43	1,10	1,24	1,23
ILMN_1366852	Ifi47	0,70	1,42	2,23	2,07	1,84
ILMN_1353774	Rpl24	1,19	1,41	1,07	1,06	1,40
ILMN_1364468	Coro1a	1,01	1,41	1,85	1,74	1,26
ILMN_1358490	Cdc2a	1,08	1,40	3,58	3,27	3,51
ILMN_1350418	LOC498736	0,96	1,40	1,18	1,14	1,63
ILMN_1364508	Cdkn3_predicted	1,04	1,40	1,93	2,00	1,83
ILMN_1354107	Rpl37	1,04	1,40	1,77	2,03	1,63
ILMN_1352957	Reln	0,75	1,40	0,86	0,72	1,09
ILMN_1364377	Vim	0,88	1,40	2,38	3,09	1,98
ILMN_1351035	H2afz	1,03	1,40	1,77	2,15	1,51
ILMN_1353280	LOC363861	1,03	1,39	1,38	1,43	1,35
ILMN_1353170	RGD1309107	1,05	1,39	2,94	2,76	2,43
ILMN_1352142	C1qb	0,83	1,39	1,00	1,13	1,27
ILMN_1363095	RGD1563135_predicted	1,20	1,38	0,97	0,95	1,39
ILMN_1361113	Hspe1	1,06	1,38	1,80	1,83	1,62
ILMN_1358580	LOC299740	1,04	1,38	2,16	2,77	1,63
ILMN_1369103	Rps26	0,99	1,38	1,52	1,76	1,54
ILMN_1374010	RGD1561310_predicted	1,18	1,38	1,24	1,47	1,45
ILMN_1376723	Rnf10	1,08	1,37	1,75	1,60	1,23
ILMN_1360804	LOC364105	1,22	1,37	0,98	0,97	1,54
ILMN_1355401	RGD1563543_predicted	1,01	1,37	1,51	1,67	1,58

ILMN_1359632	LOC295452	0,87	1,37	1,95	1,94	1,35
ILMN_1374464	Orm1	0,98	1,36	1,17	1,49	0,83
ILMN_1353157	Ces1	1,53	1,36	1,25	1,13	1,09
ILMN_2040297	Ndrp1	1,01	1,35	3,12	3,04	1,78
ILMN_1350533	RGD1563551_predicted	1,02	1,35	1,67	1,86	1,77
ILMN_1351139	LOC498279	0,77	1,35	1,55	1,76	1,40
ILMN_1368291	RGD1565286_predicted	1,19	1,34	1,06	1,27	1,51
ILMN_1351648	Mrpl13	0,93	1,34	2,03	2,11	1,76
ILMN_1353532	Pex13_predicted	1,25	1,34	1,63	1,89	1,09
ILMN_1371186	Pfn1	0,87	1,33	2,08	2,10	1,45
ILMN_1351488	Pnrc1	0,91	1,33	1,18	1,18	1,18
ILMN_1351286	LOC679886	1,03	1,33	1,40	1,37	1,28
ILMN_1356995	Rps12	0,94	1,33	1,92	2,30	1,76
ILMN_1367467	Per2	1,61	1,33	0,70	0,68	0,75
ILMN_1359126	Prc1_predicted	1,11	1,32	2,50	2,30	2,22
ILMN_1371160	Traf4af1	1,09	1,32	2,68	2,59	2,54
ILMN_1358109	Tomm22	1,09	1,32	1,34	1,47	1,25
ILMN_1353644	Atox1	1,43	1,31	0,78	0,60	0,94
ILMN_1365054	LOC289401	1,12	1,31	1,31	1,49	1,72
ILMN_1360676	RGD1565542_predicted	1,07	1,31	1,43	1,51	1,06
ILMN_1363496	Tspan8	1,21	1,30	1,12	1,80	2,63
ILMN_1355654	Agrn	0,97	1,30	1,13	1,38	1,02
ILMN_1362820	Ssg1	0,95	1,29	1,36	1,57	0,69
ILMN_1352362	Snrpd2_predicted	0,92	1,29	1,55	1,57	1,23
ILMN_1361214	Ncor2_predicted	1,15	1,28	1,25	1,26	0,97
ILMN_1650001	Ociad1	1,41	1,28	0,85	0,74	0,99
ILMN_1376581	Eif3s6	1,08	1,28	1,35	1,51	1,28
ILMN_2038798	Actb	0,85	1,28	2,01	2,33	1,17
ILMN_1360269	Sfrs5	1,02	1,28	1,64	1,71	1,42
ILMN_1371898	LOC313658	1,17	1,27	1,25	1,15	1,05
ILMN_1363266	Rpl13a	0,99	1,27	1,42	1,62	1,70
ILMN_1360723	Copa_predicted	1,01	1,27	1,70	1,80	1,04
ILMN_1367740	Mt1a	1,40	1,27	1,85	2,48	1,37
ILMN_1361731	Pabpn1	1,36	1,27	1,17	1,06	1,09
ILMN_1352209	Cd14	1,88	1,27	0,39	0,44	0,87
ILMN_1366645	RGD1562315_predicted	1,16	1,26	1,26	1,37	1,51
ILMN_1368038	RGD1560242_predicted	1,12	1,26	1,13	1,39	0,84
ILMN_1375974	Cdca1_predicted	1,10	1,26	2,54	2,42	2,36
ILMN_1360048	Igfbp2	1,48	1,26	1,05	0,94	1,51
ILMN_1353855	Hsd17b2	1,64	1,25	1,04	1,02	0,34
ILMN_1357226	LOC498342	1,17	1,25	1,66	1,45	1,13
ILMN_1350517	LOC502603	1,11	1,25	1,28	1,33	0,98

ILMN_1365417	Rala	0,90	1,24	1,82	1,84	1,44
ILMN_1353637	Csad	1,02	1,24	2,83	2,64	1,24
ILMN_1376838	Dcir3	0,92	1,24	1,39	1,67	1,43
ILMN_1651060	RGD1565900_predicted	1,03	1,23	1,46	1,56	1,32
ILMN_1353540	Cyp4b1	1,09	1,23	1,56	1,98	1,26
ILMN_1376280	Mknk2	1,15	1,23	1,41	1,52	1,05
ILMN_1372753	RGD1562060_predicted	2,45	1,21	0,61	0,48	1,66
ILMN_1361143	Suv420h2_predicted	1,30	1,21	1,04	0,87	0,95
ILMN_1362105	Dstn_predicted	0,78	1,20	1,46	1,86	1,09
ILMN_1356384	Sparc	0,92	1,19	2,12	2,78	1,56
ILMN_1373595	Cdc20	1,09	1,18	2,21	1,93	1,70
ILMN_1348883	Trem2_predicted	1,01	1,18	1,89	2,31	1,42
ILMN_1357175	RGD1563705_predicted	0,86	1,17	1,79	1,94	1,64
ILMN_1365457	Spbc25	1,07	1,17	1,87	1,90	1,76
ILMN_1354419	Bel2a1	0,83	1,17	1,45	1,37	1,31
ILMN_1349615	Gbe1	0,94	1,17	1,19	1,14	0,70
ILMN_1371109	RGD1561135_predicted	1,24	1,16	0,83	0,75	1,23
ILMN_1373783	LOC360228	1,09	1,16	0,94	1,07	1,48
ILMN_1360134	Esm1	1,08	1,16	2,44	2,99	2,63
ILMN_1370795	Ifitm1_predicted	0,79	1,15	1,30	1,20	1,23
ILMN_1367003	Cox7a2L_predicted	0,95	1,15	1,12	1,38	1,17
ILMN_1357221	Taf15_predicted	1,24	1,15	0,85	0,88	0,84
ILMN_1349048	Ucp2	0,71	1,15	2,59	2,57	1,78
ILMN_1374916	Rpl23	0,88	1,15	1,43	1,68	1,34
ILMN_2039948	Eef1a1	0,94	1,15	1,43	1,61	1,28
ILMN_1349276	RGD1564677_predicted	1,24	1,14	0,81	0,94	1,06
ILMN_1355544	LOC498276	0,76	1,14	1,10	1,12	1,67
ILMN_1352382	C1qa	0,82	1,13	1,03	1,16	1,22
ILMN_1358226	Usp2	1,44	1,13	0,81	0,83	0,71
ILMN_1359219	Aif1	0,71	1,12	1,35	1,55	1,22
ILMN_1530410	Tm7sf2	1,25	1,12	0,91	0,98	0,65
ILMN_1363514	RGD1563124_predicted	1,01	1,12	1,25	1,33	1,40
ILMN_1360727	LOC292088	1,07	1,12	0,93	1,02	1,33
ILMN_1362582	RGD1564290_predicted	1,08	1,11	1,01	1,06	1,28
ILMN_1355582	Kifc1	0,98	1,11	1,91	1,83	1,76
ILMN_1352987	Dhrs8	0,78	1,11	1,62	1,51	0,88
ILMN_1359571	LOC503325	1,16	1,10	0,85	0,55	0,90
ILMN_1351402	LOC498954	1,11	1,10	0,91	0,98	1,19
ILMN_1363056	Camta2_predicted	1,23	1,09	1,01	0,85	0,88
ILMN_1366430	LOC498363	0,98	1,09	1,25	1,19	1,49
ILMN_1368234	Psap	0,83	1,09	1,36	1,26	1,03
ILMN_1352915	Sds	3,34	1,08	0,10	0,09	0,61

ILMN_1371556	Apoc1	1,26	1,08	0,49	0,41	0,71
ILMN_1351728	LOC259246	1,21	1,08	1,02	0,15	0,37
ILMN_1351629	RGD1562259_predicted	0,95	1,07	1,09	1,15	1,41
ILMN_1367453	Gadd45g	1,87	1,07	0,32	0,38	0,70
ILMN_1369530	Cat	1,02	1,06	0,87	0,75	0,65
ILMN_1365004	RGD1562047_predicted	0,98	1,06	1,74	1,66	1,54
ILMN_1353553	Emcn	1,16	1,06	2,04	2,42	1,57
ILMN_1350797	LOC300731	0,87	1,05	1,46	1,66	1,18
ILMN_1358038	LOC364773	0,97	1,04	0,80	1,20	0,87
ILMN_1351040	RGD1560903_predicted	1,11	1,04	0,93	0,81	1,28
ILMN_1351983	RGD1564560_predicted	1,10	1,04	1,13	1,11	0,99
ILMN_1353357	RGD1564980_predicted	0,83	1,04	1,65	2,10	1,28
ILMN_1373875	Sparcl1	1,05	1,04	1,53	2,86	1,33
ILMN_1349593	Srrm2_predicted	1,11	1,04	0,97	0,89	0,91
ILMN_1363753	Nr1d1	1,49	1,03	0,91	1,02	0,53
ILMN_1356281	Cnih_predicted	0,84	1,03	1,73	1,84	1,26
ILMN_1371120	LOC501637	0,97	1,02	0,89	0,98	0,68
ILMN_1362070	Lrp10	0,86	1,02	1,37	1,49	1,02
ILMN_1371300	Hebp2_predicted	0,59	1,01	2,29	2,49	1,85
ILMN_1355543	Gja1	0,90	1,00	1,16	1,83	1,34
ILMN_1351199	Syvn1	1,33	1,00	0,64	0,57	0,94
ILMN_1376835	Gcgr	1,12	1,00	0,88	0,86	0,80
ILMN_1372187	LOC499708	0,98	0,99	1,27	1,46	1,39
ILMN_1362281	RGD1311078_predicted	0,95	0,99	0,59	0,57	0,86
ILMN_1358854	RGD1560186_predicted	0,91	0,99	1,16	1,28	1,43
ILMN_1374014	Slc2a5	1,30	0,99	0,55	0,44	0,43
ILMN_1376893	Foxa2	1,20	0,98	0,73	0,83	0,83
ILMN_1365192	S100a4	0,96	0,98	3,17	5,33	1,80
ILMN_1351222	RGD1562929_predicted	0,94	0,97	1,14	1,15	1,30
ILMN_1369675	RGD1310433_predicted	0,98	0,97	1,09	1,05	1,10
ILMN_1374571	LOC297568	1,26	0,96	0,67	0,47	0,31
ILMN_1650285	Hmox1	0,68	0,96	1,05	1,00	1,83
ILMN_1358743	LOC367874	0,88	0,96	1,59	1,92	1,26
ILMN_1370118	Rpl7	0,81	0,96	1,46	1,76	1,26
ILMN_1370979	Serpina7	1,25	0,95	0,88	0,92	0,91
ILMN_1362603	LOC499531	0,94	0,94	0,83	0,85	0,70
ILMN_1354780	LOC360975	0,87	0,94	1,56	1,42	1,02
ILMN_1356548	LOC501548	0,93	0,94	0,90	0,93	0,63
ILMN_2039341	Tspan4	1,11	0,94	0,78	0,81	1,04
ILMN_1354048	Nupr1	1,52	0,94	0,40	0,37	1,01
ILMN_1351823	Pbsn	1,42	0,94	1,07	1,05	2,14
ILMN_1357588	Bat2	0,95	0,93	1,04	1,11	1,03

ILMN_1650107	LOC499564	0,92	0,91	0,84	0,88	0,75
ILMN_1367519	Idi1	0,93	0,91	1,32	1,37	0,89
ILMN_1376460	Aldh3a2	0,85	0,91	0,89	0,77	0,49
ILMN_1374332	Hspb1	0,99	0,91	1,92	1,86	1,62
ILMN_1370678	Slc20a2	1,25	0,90	0,47	0,46	0,57
ILMN_1374191	Scd1	1,02	0,90	0,64	0,64	0,30
ILMN_1366973	LOC364139	0,80	0,89	1,63	1,70	1,48
ILMN_1371645	Lsr	1,02	0,89	0,49	0,49	0,86
ILMN_1360162	Hpn	1,19	0,88	0,78	0,83	0,60
ILMN_1352236	Ctss	0,63	0,88	1,39	1,61	0,92
ILMN_1355639	Mup5	1,14	0,88	0,74	0,10	0,25
ILMN_1363292	Slc2a2	1,10	0,87	0,55	0,58	0,40
ILMN_1366343	Aldh9a1	1,02	0,87	0,69	0,64	0,51
ILMN_1359752	Resp18	0,79	0,87	0,81	0,64	0,60
ILMN_1370868	Herpud1	1,38	0,86	0,56	0,58	0,49
ILMN_1359727	Ctnnd1_predicted	0,80	0,86	1,31	1,47	1,03
ILMN_1354034	Plxnb2	0,81	0,86	0,82	0,86	0,63
ILMN_1370613	Zbtb7a	0,89	0,86	1,21	1,38	1,20
ILMN_1365663	Bcl6_predicted	1,05	0,85	1,01	1,01	0,43
ILMN_1650298	LOC498076	0,90	0,85	0,76	0,75	0,94
ILMN_1366545	Tegt	0,92	0,85	0,72	0,64	0,68
ILMN_1356683	Zfp598_predicted	1,15	0,85	0,58	0,58	0,86
ILMN_1358103	Tars	1,18	0,85	0,38	0,39	0,88
ILMN_1349207	Id2	0,68	0,85	2,12	2,20	0,84
ILMN_1376810	Enpp2	1,17	0,84	0,86	0,77	0,42
ILMN_1355746	RGD1559617_predicted	0,86	0,84	0,94	1,01	0,89
ILMN_1374993	LOC259246	1,21	0,84	0,63	0,08	0,20
ILMN_1356731	LOC499131	0,78	0,83	1,08	1,08	0,83
ILMN_1361625	LOC361885	0,88	0,83	0,84	0,83	0,77
ILMN_1371641	LOC500916	0,87	0,83	0,77	0,76	0,78
ILMN_1373694	LOC362315	0,91	0,83	0,68	0,67	0,58
ILMN_1366485	RGD1359529	0,86	0,83	0,73	0,70	0,69
ILMN_1373017	Xbp1	1,28	0,82	0,43	0,48	0,89
ILMN_1355694	LOC363492	0,99	0,82	0,56	0,57	0,47
ILMN_1364944	LOC498745	0,93	0,82	0,62	0,68	0,86
ILMN_1360473	Jund	0,65	0,82	1,15	1,23	1,24
ILMN_1375194	LOC500867	1,02	0,82	0,60	0,58	0,62
ILMN_1355860	Gstk1	1,16	0,81	0,52	0,47	0,73
ILMN_1360769	Zyg11bl	1,00	0,81	0,69	0,65	0,85
ILMN_1650543	RGD1310552_predicted	1,05	0,81	0,66	0,59	0,60
ILMN_1369276	Igh-1a_predicted	1,04	0,81	0,45	0,54	0,50
ILMN_1352873	Scand1_predicted	1,15	0,81	0,69	0,59	0,83

ILMN_1364575	Pfkfb1	1,42	0,80	0,25	0,25	0,39
ILMN_1362918	LOC361912	0,94	0,80	0,61	0,59	0,63
ILMN_1350522	Nfix	1,04	0,80	0,68	0,69	0,74
ILMN_1361781	Srpr	0,90	0,80	0,82	0,84	0,77
ILMN_1649842	Cps1	1,03	0,80	0,43	0,38	0,51
ILMN_1364204	C5	1,04	0,79	0,45	0,46	0,74
ILMN_1350067	RGD1565798_predicted	0,77	0,79	0,88	1,03	0,95
ILMN_1366897	Klfb	0,96	0,78	0,63	0,63	0,57
ILMN_1362561	LOC498378	0,87	0,78	0,73	0,73	0,81
ILMN_1368158	RGD1560592_predicted	0,92	0,78	0,46	0,51	0,63
ILMN_1350385	Tm6p1	1,00	0,78	0,74	0,73	0,87
ILMN_1348956	Fn1	0,96	0,78	0,52	0,47	0,73
ILMN_1355207	Lztr2	1,12	0,77	0,60	0,58	0,46
ILMN_1352254	LOC499854	0,85	0,77	0,65	0,66	0,86
ILMN_1365707	LOC498799	0,81	0,77	0,71	0,71	0,80
ILMN_1351079	Rpp14_predicted	0,87	0,77	0,81	0,76	1,06
ILMN_1352762	Ifitm3	0,97	0,76	0,62	0,75	1,10
ILMN_1364277	Gpt1	1,04	0,76	0,58	0,43	0,63
ILMN_1650964	RGD1563670_predicted	1,10	0,76	0,29	0,32	0,54
ILMN_1357468	Scly	1,10	0,76	0,76	0,80	0,67
ILMN_1349772	Ftcd	1,18	0,76	0,44	0,36	0,51
ILMN_1650840	Ccnl2_predicted	0,87	0,75	0,70	0,70	0,66
ILMN_1354242	Nucb2	1,12	0,74	0,52	0,53	0,79
ILMN_1356573	RGD1563739_predicted	0,74	0,74	0,99	1,10	1,13
ILMN_1348794	Aadac	0,70	0,74	1,06	1,50	0,84
ILMN_1349412	Dock11	0,82	0,74	0,61	0,73	0,62
ILMN_1373215	Aass_predicted	1,35	0,74	0,30	0,24	0,51
ILMN_1355495	Hebp1_predicted	0,90	0,73	0,51	0,51	0,75
ILMN_1364899	Col18a1	0,98	0,73	0,60	0,66	0,81
ILMN_1349816	RGD1559600_predicted	1,03	0,73	0,43	0,43	0,49
ILMN_1350619	Pdia5	1,01	0,73	0,45	0,44	0,63
ILMN_1352809	Mapk14	0,99	0,73	0,68	0,64	0,85
ILMN_1530422	Mrvldc1_predicted	0,72	0,73	0,61	0,61	0,76
ILMN_1351948	Pthr1	0,85	0,72	0,54	0,52	0,65
ILMN_1374314	Serping1	0,98	0,72	0,50	0,50	0,66
ILMN_1362081	LOC361117	0,77	0,72	0,76	0,81	0,80
ILMN_1362553	Hadh2	0,99	0,72	0,48	0,46	0,59
ILMN_1360519	Polg2_predicted	0,95	0,72	0,42	0,43	0,61
ILMN_1357717	Sar1b	1,02	0,72	0,55	0,57	0,58
ILMN_1350345	LOC499638	0,77	0,72	0,74	0,83	0,79
ILMN_1351420	RGD1305807	0,91	0,71	0,40	0,35	0,52
ILMN_1354227	Plg	0,86	0,71	0,57	0,53	0,42

ILMN_2039861	LOC498245	0,81	0,71	0,72	0,80	0,88
ILMN_1371003	Mpv17L_predicted	1,07	0,71	0,57	0,50	0,46
ILMN_1348866	Qdpr	0,86	0,71	0,57	0,56	0,44
ILMN_1649797	LOC499560	0,86	0,71	0,66	0,67	0,75
ILMN_1365502	RGD1562836_predicted	0,98	0,71	0,50	0,43	0,40
ILMN_1354272	LOC310926	0,82	0,70	0,66	1,09	0,99
ILMN_1374141	Vtn	1,11	0,70	0,29	0,19	0,37
ILMN_1368015	Cyp4f4	1,14	0,70	0,45	0,39	0,41
ILMN_1367864	Ctsh	0,81	0,69	0,56	0,56	0,70
ILMN_1373381	LOC498105	0,78	0,69	0,77	0,86	0,87
ILMN_1369859	Xpnp2	0,93	0,69	0,53	0,47	0,52
ILMN_1373251	LOC500285	0,83	0,69	0,60	0,64	0,84
ILMN_1651040	C9	0,91	0,69	0,70	0,64	0,82
ILMN_1363413	LOC259244	1,22	0,68	0,49	0,06	0,14
ILMN_1650805	LOC364253	0,79	0,68	0,51	0,56	0,57
ILMN_1376576	Nfa	0,91	0,68	0,61	0,63	0,45
ILMN_1352230	LOC362543	0,94	0,68	0,54	0,53	0,44
ILMN_1363160	Plac8_predicted	0,65	0,68	1,41	2,12	1,34
ILMN_1369994	LOC288913	0,94	0,68	0,52	0,49	0,83
ILMN_1350697	Slc25a15	0,99	0,67	0,51	0,48	0,47
ILMN_1372451	RGD1311381_predicted	0,90	0,67	0,51	0,52	0,79
ILMN_1352004	Lass2_predicted	0,79	0,67	0,54	0,55	0,59
ILMN_1362634	RGD1303232	0,93	0,67	0,95	0,69	0,68
ILMN_1363130	Udpgr2	2,01	0,67	0,30	0,19	0,46
ILMN_1361123	Klkb1	1,07	0,67	0,37	0,42	0,58
ILMN_1358232	Tm7sf2	1,02	0,67	0,46	0,47	0,63
ILMN_1365396	Anpep	0,90	0,66	0,51	0,47	0,48
ILMN_1369444	LOC361942	0,91	0,66	0,49	0,49	0,40
ILMN_1359345	RGD1307915_predicted	0,85	0,66	0,64	0,62	0,82
ILMN_1358592	Cyp2e1	1,00	0,66	0,42	0,19	0,49
ILMN_1371196	Spp2	1,01	0,66	0,42	0,49	0,62
ILMN_1349253	Commd5	1,05	0,66	0,54	0,53	0,69
ILMN_1360660	Pim3	0,93	0,65	0,81	0,76	0,99
ILMN_1365557	Cyb5r3	0,78	0,65	0,61	0,59	0,63
ILMN_1364379	LOC316085	0,92	0,65	0,64	0,62	0,70
ILMN_1373396	Nat8	1,27	0,65	0,80	0,78	0,78
ILMN_1374184	Dao1	0,67	0,65	0,77	0,90	0,67
ILMN_1366281	MGC108747	1,12	0,65	0,32	0,32	1,34
ILMN_2039269	Mbl1	0,86	0,65	0,57	0,58	0,62
ILMN_1350232	Phyh2	1,32	0,65	0,47	0,40	0,40
ILMN_1650454	LOC312102	0,62	0,64	0,56	0,46	0,89
ILMN_1362743	RGD1309350_predicted	0,92	0,64	0,51	0,52	0,61

ILMN_1372241	Asl	1,07	0,64	0,39	0,36	0,53
ILMN_1374966	LOC683474	0,78	0,64	0,64	0,60	0,66
ILMN_1363999	Gys2	0,94	0,64	0,61	0,68	0,63
ILMN_1650883	RGD1561956_predicted	0,75	0,64	0,50	0,51	0,60
ILMN_1369708	LOC500586	0,71	0,64	0,80	0,81	0,81
ILMN_1350613	Acox3	0,76	0,63	0,54	0,54	0,60
ILMN_1356861	Upb1	0,93	0,63	0,59	0,47	0,36
ILMN_1371362	RGD1563438_predicted	0,95	0,63	0,51	0,45	0,68
ILMN_1356126	Got1	1,17	0,63	0,35	0,34	0,71
ILMN_1349175	Il6ra	1,03	0,63	0,54	0,53	0,72
ILMN_1353193	Glde_predicted	0,75	0,63	0,31	0,31	0,57
ILMN_1366649	LOC501087	0,80	0,63	0,59	0,54	0,55
ILMN_1356389	Xylb	0,88	0,62	0,60	0,59	0,87
ILMN_1369462	Tdo2	0,98	0,62	0,19	0,18	0,25
ILMN_1362943	Pah	0,89	0,62	0,49	0,47	0,41
ILMN_1359507	Acaa1	0,84	0,62	0,54	0,47	0,58
ILMN_1363886	RGD1311307	0,94	0,62	0,40	0,42	0,67
ILMN_1348991	RGD1564372_predicted	0,80	0,61	0,44	0,48	0,58
ILMN_1355873	RGD1308251_predicted	0,86	0,61	0,51	0,49	0,79
ILMN_1356434	Amdhd1_predicted	0,83	0,61	0,68	0,77	0,65
ILMN_1370339	Rarres2	0,88	0,61	0,43	0,41	0,42
ILMN_1358542	Fdft1	0,81	0,61	0,57	0,59	0,55
ILMN_1368887	Ebp	0,79	0,61	0,54	0,46	0,72
ILMN_1362913	LOC287996	0,67	0,61	1,32	1,47	1,07
ILMN_1368406	RGD1310450	0,95	0,61	0,48	0,45	0,61
ILMN_1367822	Pigr	0,72	0,61	0,60	0,54	0,55
ILMN_1362266	Ecm1	0,72	0,61	0,54	0,54	0,61
ILMN_1370140	Mup4	1,14	0,61	0,44	0,06	0,12
ILMN_1352233	Abat	1,00	0,61	0,51	0,46	0,41
ILMN_1360881	MGC112899	0,93	0,60	0,62	0,52	0,66
ILMN_1358848	Slc38a3	1,31	0,60	0,35	0,35	0,57
ILMN_1362088	Hnrpab	1,05	0,60	0,41	0,39	0,54
ILMN_1376356	LOC191574	0,77	0,60	0,56	0,56	0,57
ILMN_1358269	LOC305633	0,79	0,60	0,50	0,53	0,59
ILMN_2039252	LOC688887	0,75	0,60	0,50	0,56	0,54
ILMN_1349280	Gcs1	0,93	0,60	0,57	0,61	0,78
ILMN_1368797	Klf15	1,07	0,60	0,41	0,39	0,52
ILMN_1352492	Serpind1	0,89	0,59	0,39	0,37	0,42
ILMN_1352258	Os-9	0,65	0,59	0,79	0,82	1,04
ILMN_1365968	Proc	1,07	0,59	0,39	0,39	0,58
ILMN_1369168	Ccl6	0,62	0,59	0,56	0,45	0,70
ILMN_1366152	Cyp4f6	0,94	0,59	0,50	0,51	0,60

ILMN_1348782	Etfldh	0,88	0,59	0,56	0,49	0,60
ILMN_1357474	Ahcy	0,85	0,59	0,47	0,43	0,52
ILMN_1376433	Pex16	0,93	0,58	0,57	0,49	0,64
ILMN_1363054	Etnk2_predicted	0,81	0,58	0,57	0,61	0,48
ILMN_1371535	Cxcl11	0,86	0,58	0,43	0,35	0,49
ILMN_1358646	Fbp1	1,01	0,58	0,61	0,46	0,42
ILMN_1371124	LOC500960	0,81	0,58	0,51	0,51	0,53
ILMN_1363488	Tsc22d3	0,61	0,58	0,78	0,78	0,94
ILMN_1376592	Ptprf	0,73	0,58	0,57	0,57	0,62
ILMN_1366910	Acly	0,87	0,57	0,41	0,39	0,40
ILMN_1376412	Gphn	0,88	0,57	0,51	0,49	0,58
ILMN_1354502	Suox	0,92	0,57	0,48	0,44	0,51
ILMN_1368486	Pc	0,79	0,57	0,50	0,51	0,59
ILMN_1362443	LOC497733	0,76	0,57	0,73	0,73	0,76
ILMN_1368626	RGD1564865_predicted	0,73	0,57	0,45	0,49	0,45
ILMN_1354927	Ethe1_predicted	0,79	0,57	0,40	0,41	0,35
ILMN_1354635	C4bpa	0,84	0,57	0,47	0,53	0,66
ILMN_1355386	LOC246266	1,38	0,57	0,25	0,25	0,46
ILMN_1375109	Cyp2d26	0,99	0,57	0,40	0,31	0,38
ILMN_1368927	LOC497689	0,90	0,57	0,24	0,23	0,41
ILMN_1365135	Acy3	0,83	0,57	0,49	0,39	0,32
ILMN_1373152	B4galnt1	0,91	0,57	0,48	0,45	0,62
ILMN_1366519	RGD1310686	0,83	0,56	0,57	0,57	0,56
ILMN_1368643	Thrsp	0,90	0,56	0,35	0,35	0,22
ILMN_1376205	Lpin1_predicted	0,81	0,56	0,41	0,41	0,64
ILMN_1649782	RGD1309948	0,75	0,56	0,49	0,52	0,54
ILMN_1371063	LOC498048	0,78	0,56	0,47	0,46	0,42
ILMN_1364121	Dmgdh	0,86	0,56	0,41	0,36	0,46
ILMN_1371682	Nme3	0,88	0,56	0,49	0,54	0,59
ILMN_1353517	Hagh	1,03	0,56	0,33	0,28	0,39
ILMN_1354747	LOC498241	0,77	0,56	0,49	0,51	0,64
ILMN_1353895	Bbox1	0,66	0,56	0,61	0,61	0,43
ILMN_1353442	Sema4g_predicted	0,81	0,56	0,62	0,55	0,60
ILMN_1366832	Slc17a2_predicted	0,78	0,56	0,50	0,53	0,64
ILMN_1361057	Ung	0,92	0,56	0,52	0,49	0,53
ILMN_1360812	Ppp2r5e_predicted	0,76	0,56	0,52	0,46	0,48
ILMN_1350394	Sel1h	0,89	0,56	0,49	0,48	0,67
ILMN_1370835	Ghr	0,76	0,56	0,47	0,49	0,57
ILMN_1360615	LOC503409	0,69	0,55	0,74	1,08	1,02
ILMN_1357376	RGD1308481_predicted	0,97	0,55	0,51	0,54	0,52
ILMN_1371344	Cebpb	0,72	0,55	0,83	1,02	1,08
ILMN_1363851	Uox	0,82	0,55	0,29	0,29	0,39

ILMN_1364151	Srd5a1	0,67	0,55	0,46	0,46	0,60
ILMN_1376554	Mat1a	1,06	0,55	0,23	0,24	0,40
ILMN_1363480	Srebf1	1,07	0,55	0,46	0,45	0,44
ILMN_1363232	Me3_predicted	0,74	0,55	0,46	0,46	0,49
ILMN_1651057	St3gal6	0,75	0,55	0,42	0,42	0,52
ILMN_1356332	RGD1565350_predicted	0,80	0,55	0,48	0,44	0,57
ILMN_1374405	Fabp1	0,84	0,55	0,52	0,30	0,39
ILMN_1376916	Hfe2	0,74	0,54	0,93	0,77	0,58
ILMN_2039973	Bhmt	0,86	0,54	0,40	0,31	0,32
ILMN_1376483	Serpinc1	0,81	0,54	0,47	0,44	0,56
ILMN_1371070	Tgfb1	0,85	0,54	0,43	0,41	0,56
ILMN_1349101	As3mt	0,95	0,54	0,41	0,36	0,45
ILMN_1356527	Rnd2	0,80	0,54	0,55	0,50	0,56
ILMN_1368692	C8b_mapped	1,05	0,54	0,28	0,28	0,56
ILMN_1366573	LOC500300	0,65	0,54	0,61	0,57	0,60
ILMN_1363200	Hpd	0,78	0,54	0,43	0,33	0,49
ILMN_1356551	Ndrp2	0,86	0,54	0,37	0,33	0,42
ILMN_1356675	Pank1_predicted	0,80	0,54	0,52	0,51	0,54
ILMN_1368181	Naprt1	0,83	0,54	0,47	0,43	0,77
ILMN_1376422	Slc34a2	0,69	0,53	0,31	0,29	0,60
ILMN_1361155	LOC682605	1,01	0,53	0,42	0,05	0,11
ILMN_1365830	Gamt	0,78	0,53	0,52	0,51	0,46
ILMN_1359576	Tmem63b_predicted	0,69	0,53	0,65	0,61	0,67
ILMN_1376694	Crem	0,76	0,53	0,39	0,38	0,63
ILMN_1360427	Slc38a4	0,79	0,53	0,28	0,21	0,36
ILMN_1373225	Cyp2b15	1,31	0,53	0,61	0,47	0,54
ILMN_1367559	RGD1559960_predicted	0,90	0,53	0,47	0,46	0,52
ILMN_1351404	Cfb	0,79	0,53	0,53	0,49	0,53
ILMN_1376805	Serpinf2	0,82	0,53	0,40	0,39	0,52
ILMN_1357689	Mlycd	0,85	0,53	0,57	0,55	0,67
ILMN_1376496	Kng1	0,87	0,52	0,31	0,30	1,02
ILMN_1364889	Gls2	1,16	0,52	0,16	0,14	0,31
ILMN_1360188	Nfil3	0,73	0,52	0,34	0,31	1,04
ILMN_1350983	Fdps	0,73	0,52	0,55	0,61	0,60
ILMN_1350030	Cideb_predicted	0,74	0,52	0,58	0,52	0,54
ILMN_1362410	Rnase4	0,78	0,52	0,45	0,43	0,54
ILMN_1352005	Mig12	0,68	0,52	1,30	1,43	0,68
ILMN_1357522	Lrp1	0,77	0,52	0,49	0,52	0,56
ILMN_1349377	Pik3c3	0,56	0,52	0,48	0,48	0,46
ILMN_1530233	LOC362774	0,86	0,52	0,37	0,39	0,53
ILMN_1372782	Serpina3n	0,84	0,51	0,41	0,43	0,70
ILMN_1371942	Rxrg	0,84	0,51	0,44	0,45	0,50

ILMN_1374373	Apcs	0,70	0,51	0,39	0,42	0,40
ILMN_2038910	Trfr2_predicted	0,85	0,51	0,39	0,37	0,62
ILMN_1366743	Hes6	0,90	0,51	0,37	0,33	0,28
ILMN_1367779	RGD1311155	0,84	0,51	0,35	0,40	0,66
ILMN_1370307	Saa4	1,08	0,51	0,15	0,13	0,52
ILMN_1370903	LOC683694	0,85	0,51	0,49	0,39	0,51
ILMN_1359983	Hist1h2bm_predicted	0,90	0,50	0,30	0,28	0,36
ILMN_1371815	Agpat2_predicted	0,73	0,50	0,55	0,52	0,81
ILMN_1363504	Sult1c2	0,86	0,50	0,61	0,56	0,52
ILMN_1369904	F9	0,69	0,50	0,47	0,51	0,61
ILMN_1372735	Cyp4f2	0,83	0,50	0,42	0,41	0,44
ILMN_1375002	LOC313840	0,67	0,50	0,63	0,62	0,55
ILMN_1365622	Pcyt2	0,77	0,50	0,55	0,48	0,54
ILMN_1369575	Itih4	0,92	0,50	0,34	0,30	0,55
ILMN_1367561	LOC497794	0,69	0,50	0,27	0,31	0,30
ILMN_1373862	Sephs2	0,90	0,50	0,48	0,38	0,54
ILMN_1364112	Ldha	0,66	0,50	0,46	0,41	0,59
ILMN_1374229	Gjb1	0,82	0,50	0,49	0,49	0,66
ILMN_1361919	Alad	0,83	0,49	0,45	0,49	0,52
ILMN_1358106	Pxmp2	0,84	0,49	0,40	0,43	0,54
ILMN_1369067	LOC288174	0,82	0,49	0,34	0,31	0,44
ILMN_1356523	Nt5e	0,68	0,49	0,59	0,65	0,77
ILMN_1350537	Slc26a1	0,92	0,49	0,36	0,35	0,42
ILMN_1361027	Mafb	0,73	0,49	0,39	0,40	0,61
ILMN_1363440	Tmem53_predicted	0,79	0,49	0,54	0,48	0,56
ILMN_1369589	RGD1310587	0,76	0,49	0,50	0,49	0,57
ILMN_1361887	F12	0,79	0,49	0,42	0,43	0,46
ILMN_1367695	Tmem37	0,73	0,49	0,60	0,63	0,66
ILMN_1370510	Gne	1,00	0,49	0,33	0,33	0,50
ILMN_1373818	RGD1308742_predicted	0,72	0,49	0,40	0,38	0,56
ILMN_1368407	RGD1310111	0,92	0,49	0,53	0,46	0,48
ILMN_1359078	Slc37a4	0,95	0,48	0,37	0,31	0,47
ILMN_1363871	LOC501979	0,78	0,48	0,56	0,52	0,49
ILMN_1367288	Pqlc1	0,82	0,48	0,48	0,48	0,66
ILMN_1352630	Sigirr	0,73	0,48	0,58	0,51	0,60
ILMN_1355235	Fads1	0,69	0,48	0,38	0,39	0,35
ILMN_1362261	Nsdhl	0,69	0,48	0,48	0,50	0,54
ILMN_1362620	Pdp2	0,66	0,48	0,58	0,59	0,66
ILMN_1350381	Slc29a1	0,70	0,48	0,44	0,42	0,64
ILMN_1361745	Cyp2a1	0,90	0,48	0,32	0,30	0,44
ILMN_1366876	C8g_predicted	0,86	0,48	0,30	0,27	0,40
ILMN_1369010	Pros1	0,75	0,48	0,36	0,41	0,50

ILMN_1362185	Hsd17b13	0,61	0,48	0,36	0,33	0,37
ILMN_1371224	Egf	0,81	0,48	0,43	0,43	0,50
ILMN_1364530	P2ry2	0,79	0,48	0,42	0,44	0,70
ILMN_1352810	Arhgef19_predicted	0,64	0,48	0,61	0,60	0,66
ILMN_1351412	Sat2_predicted	0,65	0,47	0,56	0,54	0,60
ILMN_1374598	Tm4sf12	0,74	0,47	0,46	0,47	0,60
ILMN_1361612	LOC362774	0,88	0,47	0,31	0,29	0,62
ILMN_1369433	Aadat	0,75	0,47	0,42	0,37	0,44
ILMN_1376967	Ecgf1	0,68	0,47	0,50	0,49	0,47
ILMN_1374140	Ptms	0,59	0,47	0,50	0,50	0,67
ILMN_1367313	Nr1h4	0,69	0,47	0,52	0,49	0,51
ILMN_1363949	Arl6ip2	0,77	0,47	0,53	0,53	0,50
ILMN_2040898	Aqp9	0,79	0,47	0,33	0,34	0,50
ILMN_1651073	Pemt	0,76	0,47	0,24	0,27	0,39
ILMN_1368851	MGC95155	0,90	0,46	0,38	0,32	0,42
ILMN_1372510	Gpx1	0,71	0,46	0,37	0,37	0,41
ILMN_1372940	Fxyd1	0,75	0,46	0,43	0,42	0,44
ILMN_1363465	F11	0,81	0,46	0,35	0,34	0,45
ILMN_1368297	RGD1305679	0,70	0,46	0,51	0,45	0,44
ILMN_1351902	LOC498327	0,86	0,46	0,27	0,27	0,48
ILMN_1371533	Maob	0,64	0,46	0,66	0,58	0,49
ILMN_1349873	Cd302	0,70	0,46	0,41	0,44	0,55
ILMN_1353571	Gpd1	0,87	0,46	0,52	0,45	0,53
ILMN_1357759	Galt	0,72	0,46	0,46	0,40	0,52
ILMN_1350958	LOC498644	0,71	0,46	0,55	0,58	0,50
ILMN_1364435	RGD1307119	0,79	0,46	0,40	0,32	0,38
ILMN_1354144	Rbp4	0,72	0,46	0,56	0,52	0,59
ILMN_1363258	Cyp2d9	0,82	0,46	0,39	0,33	0,54
ILMN_1371776	Hao	0,84	0,46	0,40	0,40	0,49
ILMN_1373119	Dnase2b	0,48	0,45	0,30	0,30	0,36
ILMN_1365165	Brp44l	0,68	0,45	0,47	0,40	0,51
ILMN_1367184	Lipc	0,67	0,45	0,40	0,38	0,31
ILMN_1357981	Tmem7_predicted	0,70	0,45	0,49	0,46	0,65
ILMN_1354758	Agmat	0,74	0,45	0,59	0,55	0,51
ILMN_1358086	LOC497764	0,74	0,45	0,48	0,48	0,48
ILMN_1356474	Retsat	0,84	0,45	0,56	0,40	0,45
ILMN_1351292	LOC500761	1,00	0,45	0,22	0,21	0,44
ILMN_1366742	Tm4sf4	0,96	0,45	0,16	0,16	0,43
ILMN_1355038	RGD1560459_predicted	0,87	0,45	0,40	0,34	0,42
ILMN_1367659	Tat	0,79	0,45	0,20	0,18	0,57
ILMN_1351618	Rpp21	0,84	0,45	0,26	0,24	0,51
ILMN_1358602	RGD1307696_predicted	0,66	0,45	0,57	0,54	0,70

ILMN_1364607	RGD1308734	0,69	0,44	0,38	0,36	0,55
ILMN_1355709	Rcbtb2	0,64	0,44	0,43	0,47	0,50
ILMN_1371879	Cyp2f2	0,66	0,44	0,45	0,43	0,49
ILMN_1364554	Ech1	0,69	0,44	0,51	0,46	0,54
ILMN_1349755	RGD1560263_predicted	0,56	0,44	0,46	0,42	0,77
ILMN_1376411	Ppp1r3c	0,54	0,44	1,11	1,08	0,68
ILMN_2038974	Hao1_mapped	0,73	0,44	0,26	0,26	0,35
ILMN_1364972	Agtr1a	0,64	0,44	0,29	0,28	0,38
ILMN_1354341	MGC112883	0,91	0,44	0,33	0,32	0,51
ILMN_1371674	Zfp354a	0,60	0,44	0,57	0,58	0,57
ILMN_1357234	Nrep	0,60	0,44	0,42	0,42	0,47
ILMN_1372260	MGC109491	0,57	0,44	0,50	0,43	0,70
ILMN_1360328	Pgrmc2	0,65	0,43	0,41	0,37	0,57
ILMN_1375583	Crem	0,62	0,43	0,40	0,40	0,64
ILMN_1361837	C4-2	0,90	0,43	0,43	0,42	0,60
ILMN_1371209	Sectm1	0,61	0,43	0,53	0,50	0,57
ILMN_1353182	Cyp2c13	1,01	0,43	0,23	0,12	0,25
ILMN_1355259	LOC362732	0,64	0,43	0,50	0,47	0,43
ILMN_1376726	Dgat2	0,85	0,43	0,40	0,34	0,41
ILMN_1371797	Itih1_predicted	0,64	0,43	0,43	0,47	0,37
ILMN_1361950	Sdc2	0,72	0,43	0,37	0,36	0,49
ILMN_1376480	Hmgcs1	0,61	0,43	0,39	0,39	0,53
ILMN_1374388	RGD1563825_predicted	0,73	0,42	0,55	0,65	0,89
ILMN_1349734	Ssx2ip	0,58	0,42	0,34	0,33	0,51
ILMN_1353461	Lect2_predicted	0,68	0,42	0,49	0,47	0,94
ILMN_1357757	Bdh1	0,75	0,42	0,50	0,54	0,44
ILMN_1366386	Tob2	0,42	0,42	0,94	0,98	0,92
ILMN_1361589	RGD1561090_predicted	0,74	0,42	0,32	0,34	0,45
ILMN_1365331	Scp2	0,57	0,42	0,46	0,42	0,40
ILMN_1365626	Oprs1	0,65	0,42	0,44	0,40	0,61
ILMN_1367486	Dusp1	0,73	0,42	0,31	0,32	0,62
ILMN_1359627	LOC360919	0,95	0,42	0,21	0,17	0,42
ILMN_1366212	Errfi1	0,78	0,42	0,20	0,17	0,50
ILMN_1359213	Pklr	0,84	0,42	0,25	0,21	0,26
ILMN_1362925	Prodh2	1,01	0,42	0,26	0,23	0,37
ILMN_1368060	LOC307731	0,50	0,41	0,56	0,46	0,60
ILMN_1375024	Slc23a1	0,76	0,41	0,38	0,39	0,47
ILMN_1374215	Gpr89_predicted	0,74	0,41	0,44	0,37	0,48
ILMN_1373082	F10	0,79	0,41	0,37	0,34	0,51
ILMN_1363277	Sc5d	0,57	0,41	0,46	0,51	0,52
ILMN_1370455	Rgs3	0,44	0,41	0,20	0,17	0,38
ILMN_1371428	RT1-S3	0,68	0,41	0,41	0,40	0,40
ILMN_1376323	Ang1	0,74	0,41	0,32	0,30	0,35

ILMN_1530390	MGC109491	0,57	0,41	0,49	0,44	0,66
ILMN_1353874	Cbs	0,81	0,41	0,25	0,19	0,36
ILMN_1370739	Cyp7a1	1,06	0,41	0,25	0,27	0,37
ILMN_1358053	LOC502970	0,65	0,41	0,39	0,35	0,41
ILMN_1361016	Agt	0,85	0,40	0,23	0,20	0,41
ILMN_1369483	Habp2	0,86	0,40	0,19	0,13	0,43
ILMN_1359577	Ttpa	0,73	0,40	0,27	0,26	0,33
ILMN_1365002	Abhd1	0,69	0,40	0,44	0,38	0,41
ILMN_1354116	LOC301444	0,61	0,40	0,36	0,33	0,39
ILMN_1358687	Pgcp	0,59	0,40	0,54	0,47	0,47
ILMN_1349991	Cyp2d10	0,86	0,40	0,30	0,25	0,43
ILMN_1530358	MGC95155	0,76	0,40	0,42	0,40	0,40
ILMN_1350834	Phyh	0,84	0,39	0,32	0,22	0,52
ILMN_1365208	LOC500541	0,52	0,39	0,61	0,61	0,60
ILMN_1356300	Nrbf2	0,54	0,39	0,38	0,39	0,76
ILMN_1352223	Adra1b	0,69	0,39	0,47	0,46	0,47
ILMN_1364209	Hal	0,60	0,39	0,29	0,25	0,40
ILMN_1362319	Ca5a	0,81	0,39	0,25	0,21	0,35
ILMN_1352994	RGD1565988_predicted	0,60	0,39	0,24	0,20	0,25
ILMN_1650663	Aim1l_predicted	0,69	0,39	0,48	0,48	0,48
ILMN_1361584	RGD1565889_predicted	0,74	0,38	0,35	0,30	0,42
ILMN_1370112	Azgp1	0,78	0,38	0,18	0,09	0,38
ILMN_1363497	Onecut1	0,86	0,38	0,11	0,11	0,65
ILMN_1363196	Gpld1	0,79	0,38	0,26	0,23	0,39
ILMN_1366070	Hadhsc	0,66	0,38	0,43	0,40	0,46
ILMN_1351089	Cpt1a	0,73	0,38	0,44	0,46	0,36
ILMN_1350285	Adhfe1	0,74	0,37	0,29	0,29	0,35
ILMN_1361474	Abcc6	0,85	0,37	0,29	0,23	0,34
ILMN_1358836	Slco2b1	0,72	0,37	0,35	0,37	0,46
ILMN_1370828	Cth	0,80	0,37	0,21	0,15	0,29
ILMN_1374047	Yeats4_predicted	0,66	0,37	0,37	0,39	0,72
ILMN_1369773	LOC499880	0,55	0,37	0,31	0,35	0,58
ILMN_1368262	Fahd1	0,65	0,37	0,38	0,34	0,28
ILMN_1372884	Rgn	0,60	0,37	0,43	0,42	0,42
ILMN_1356447	Amy1	0,76	0,37	0,22	0,25	0,39
ILMN_1362567	Slc10a1	0,76	0,37	0,27	0,26	0,36
ILMN_1363791	LOC498989	0,46	0,36	0,35	0,29	0,51
ILMN_1350828	RGD1305890	0,73	0,36	0,31	0,32	0,40
ILMN_1355025	Dpys	0,75	0,36	0,23	0,22	0,36
ILMN_1354598	RGD1564938_predicted	0,51	0,36	0,50	0,50	0,60
ILMN_1355252	Nags_predicted	0,66	0,36	0,41	0,36	0,51
ILMN_1355867	Baat	0,76	0,36	0,21	0,19	0,31

ILMN_1364924	Igfals	0,73	0,35	0,27	0,27	0,34
ILMN_1351129	Slc6a13	0,79	0,35	0,33	0,29	0,54
ILMN_1358491	Gstm3	0,78	0,35	0,27	0,25	0,32
ILMN_1359736	Atf5	0,68	0,35	0,35	0,30	0,58
ILMN_1370220	Fads2	0,65	0,35	0,24	0,25	0,31
ILMN_1376969	Creb3l3	0,78	0,35	0,32	0,23	0,46
ILMN_1358346	Slc22a8	0,57	0,35	0,40	0,40	0,56
ILMN_1372211	Ela1	0,51	0,34	1,14	0,69	1,22
ILMN_1363829	C4bpb	0,90	0,34	0,18	0,16	0,53
ILMN_1358374	LOC368066	0,65	0,34	0,50	0,49	0,16
ILMN_1371222	Spink3	0,67	0,34	0,32	0,23	0,27
ILMN_1366651	Fmo1	0,69	0,34	0,40	0,28	0,50
ILMN_1374674	LOC362882	0,52	0,34	0,38	0,37	0,33
ILMN_1356756	Cyp2a2	0,79	0,34	0,19	0,11	0,27
ILMN_1374541	Mug2	0,71	0,34	0,22	0,19	0,21
ILMN_1353055	Agxt	0,59	0,34	0,26	0,22	0,32
ILMN_1357171	Adfp	0,48	0,34	0,57	0,53	0,66
ILMN_1350578	Slc13a3	0,63	0,34	0,51	0,52	0,80
ILMN_1364108	Cdo1	0,65	0,33	0,33	0,28	0,30
ILMN_1365234	Slc22a7	0,57	0,33	0,38	0,30	0,42
ILMN_1363573	Acsl5	0,51	0,33	0,25	0,25	0,45
ILMN_1350755	Dio1	0,68	0,33	0,41	0,36	0,34
ILMN_1351551	Mlc1_predicted	0,59	0,33	0,35	0,34	0,24
ILMN_1375179	Ak3l1	0,64	0,33	0,28	0,24	0,42
ILMN_1371494	Amacr	0,77	0,33	0,31	0,23	0,31
ILMN_1360637	Prg4_predicted	0,66	0,33	0,35	0,32	0,50
ILMN_1353191	Igf2bp3	0,60	0,33	0,31	0,30	0,51
ILMN_1374623	Mbl2	0,68	0,32	0,25	0,24	0,36
ILMN_1366309	LOC497680	0,66	0,32	0,29	0,26	0,43
ILMN_1368383	Cyp3a18	0,68	0,32	0,36	0,31	0,39
ILMN_1650104	Gulo	0,54	0,32	0,33	0,31	0,42
ILMN_1351603	Cxcl12	0,44	0,32	0,27	0,27	0,27
ILMN_1363828	Pck1	0,86	0,32	0,12	0,07	0,33
ILMN_1351105	Nnmt_predicted	0,89	0,32	0,14	0,14	0,52
ILMN_1367035	Lcat	0,66	0,32	0,32	0,29	0,40
ILMN_1650401	Rdh3	0,78	0,31	0,20	0,17	0,35
ILMN_1349437	RGD1307603_predicted	0,80	0,31	0,17	0,10	0,33
ILMN_1370783	Acox2	0,76	0,31	0,24	0,18	0,44
ILMN_1352415	Serpina4	0,86	0,31	0,16	0,13	0,24
ILMN_1365426	Ap1gbp1	0,56	0,31	0,26	0,26	0,36
ILMN_1353658	Gucy1b2	0,74	0,31	0,34	0,35	0,37
ILMN_1354552	Rnf125_predicted	0,66	0,31	0,27	0,20	0,48

ILMN_1373409	Kynu	0,58	0,30	0,31	0,30	0,26
ILMN_1357127	Nalp12_predicted	0,67	0,29	0,19	0,20	0,31
ILMN_1358609	Hsd17b9	0,63	0,29	0,16	0,11	0,32
ILMN_1358930	Irs3	0,32	0,29	0,45	0,44	0,43
ILMN_1363750	Acs1	0,65	0,28	0,38	0,27	0,25
ILMN_1376953	Cyp2c6	0,88	0,28	0,22	0,16	0,45
ILMN_1363947	Hmgcs2	0,72	0,28	0,34	0,23	0,31
ILMN_1362268	Serpina3m	0,80	0,28	0,18	0,12	0,27
ILMN_1361321	Afm	0,61	0,28	0,16	0,12	0,29
ILMN_1376347	Hrasl3	0,54	0,27	0,26	0,25	0,47
ILMN_1358319	Apoa2	0,77	0,27	0,14	0,12	0,27
ILMN_1366106	RGD1311384	0,68	0,26	0,23	0,20	0,33
ILMN_1355213	Ppp1r3b	0,54	0,26	0,26	0,21	0,33
ILMN_1359537	Serpina6_mapped	0,65	0,26	0,16	0,09	0,19
ILMN_1366486	Sult1c1	0,68	0,25	0,12	0,08	0,15
ILMN_1362755	Akr1c18	0,59	0,25	0,24	0,21	0,25
ILMN_1354527	Insig2	0,57	0,25	0,26	0,20	0,44
ILMN_1349692	Akr1c21	0,72	0,24	0,14	0,13	0,34
ILMN_1361935	MGC72973	0,39	0,24	0,28	0,25	1,13
ILMN_1352458	LOC497901	0,77	0,24	0,13	0,08	0,16
ILMN_1354234	LOC367391	0,37	0,24	0,31	0,22	0,55
ILMN_1367748	Plekhb1	0,38	0,24	0,29	0,27	0,27
ILMN_1358041	Gnmt	0,65	0,24	0,12	0,07	0,17
ILMN_1369281	C6	0,60	0,23	0,13	0,09	0,36
ILMN_1353230	LOC497821	0,55	0,23	0,29	0,23	0,37
ILMN_1354653	Crot	0,48	0,23	0,21	0,17	0,29
ILMN_1355809	Cyp3a11	1,02	0,23	0,17	0,05	0,08
ILMN_1367573	Slc25a25	0,68	0,22	0,17	0,14	0,53
ILMN_1362353	LOC683385	0,37	0,22	0,18	0,17	0,47
ILMN_1376545	Hdmcp	0,65	0,22	0,15	0,11	0,22
ILMN_1356639	Hba-a1	0,34	0,22	0,47	0,38	1,27
ILMN_1374903	Fgl1	0,63	0,22	0,16	0,12	0,50
ILMN_1354585	Cyp2c7	0,79	0,21	0,11	0,02	0,11
ILMN_1360239	RGD1310174_predicted	0,55	0,21	0,28	0,24	0,40
ILMN_1366884	Hsd3b	0,75	0,21	0,14	0,08	0,19
ILMN_1361516	Slco1b2	0,55	0,21	0,14	0,15	0,28
ILMN_1365037	Apom	0,47	0,21	0,18	0,14	0,24
ILMN_1365787	ste2	0,69	0,20	0,08	0,02	0,06
ILMN_1359395	Apoa5	0,58	0,20	0,13	0,13	0,39
ILMN_1353696	Hbb	0,34	0,19	0,32	0,28	1,14
ILMN_1365785	Ust5r	0,51	0,18	0,14	0,11	0,20
ILMN_1357481	Apoc2_predicted	0,57	0,18	0,23	0,10	0,25
ILMN_1364951	Cyp4a14	0,56	0,17	0,10	0,05	0,26

ILMN_1350091	G0s2	0,34	0,16	0,50	0,38	0,36
ILMN_1650905	Cyp2c37	0,56	0,16	0,17	0,16	0,21
ILMN_1374418	Hao2	0,45	0,16	0,11	0,09	0,13
ILMN_1362029	LOC502490	0,44	0,16	1,62	1,41	0,85
ILMN_1350483	Slc27a5	0,55	0,16	0,10	0,04	0,11
ILMN_1368331	Ca3	0,37	0,15	0,18	0,03	0,03
ILMN_2039661	G6pc	0,60	0,15	0,25	0,15	0,25
ILMN_1350207	Cyp1a2	0,51	0,15	0,16	0,13	0,26
ILMN_1352518	LOC690021	0,61	0,15	0,09	0,06	0,14
ILMN_1372759	Olr59	0,35	0,15	0,13	0,10	0,18
ILMN_1371178	Avpr1a	0,38	0,15	0,11	0,08	0,17
ILMN_1363705	Aox3	0,20	0,14	0,18	0,16	0,22
ILMN_1360466	Angptl4	0,22	0,14	0,22	0,18	0,29
ILMN_1349230	Cyp3a3	0,41	0,14	0,17	0,12	0,17
ILMN_1353485	Stac3_predicted	0,50	0,14	0,16	0,09	0,07
ILMN_1361259	Fabp7	0,22	0,13	0,18	0,28	0,35
ILMN_2040873	Cyp8b1	0,62	0,13	0,09	0,05	0,19
ILMN_1350838	LOC259245	0,36	0,12	0,11	0,07	0,08
ILMN_1369391	Cyp3a1	0,52	0,11	0,11	0,04	0,15
ILMN_1369315	Cyp3a13	0,30	0,11	0,19	0,15	0,27
ILMN_1357969	Cyp2c	0,43	0,11	0,08	0,02	0,02
ILMN_1361578	Cdh17	0,21	0,11	0,14	0,09	0,13
ILMN_1650087	Dhrs7	0,46	0,10	0,10	0,07	0,08
ILMN_1366136	LOC500473	0,48	0,10	0,09	0,06	0,06
ILMN_1354655	LOC259244	0,55	0,09	0,08	0,02	0,04
ILMN_1373699	LOC298116	0,48	0,09	0,07	0,02	0,03
ILMN_1363507	LOC298111	0,41	0,08	0,09	0,03	0,03
ILMN_1357521	LOC502953	0,32	0,06	0,08	0,03	0,04
ILMN_1365227	Obp3	0,12	0,03	0,11	0,06	0,04

Tab. suppl.2: 200 microRNA selezionati in seguito ad analisi informatica (p<0.05; sottoposti a FDR)					
microRNA	ΔΔCt KRT-19-/CTR	ΔΔCt KRT-19+/CTR	ΔΔCt Ade/CTR	ΔΔCt eHCC/CTR	ΔΔCt aHCC/CTR
U87-4386735	0.03	0.13	0.74	0.37	-0.64
Y1-4386739	0.36	0.11	0.21	-0.05	-0.21
mmu-let-7a-4373169	0.39	0.80	-0.16	-0.05	-0.50
mmu-let-7b-4373168	0.16	-0.12	0.17	0.17	-0.12
mmu-let-7c-4373167	-0.09	0.39	0.36	0.11	-0.24
mmu-let-7d-4395394	0.34	0.38	0.22	0.03	-0.32
mmu-let-7e-4395517	-0.24	0.31	0.31	0.28	-0.43
mmu-let-7f-4373164	0.00	-0.15	0.36	0.20	-0.24
mmu-let-7g-4395393	0.21	0.44	0.16	-0.12	-0.16
mmu-let-7i-4395332	0.80	0.38	0.09	-0.24	-0.08
mmu-miR-1-4395333	-2.59	-0.12	-0.05	-0.19	2.20
mmu-miR-101a-4395364	0.05	0.27	-0.09	-0.24	-0.07
mmu-miR-103-4373158	0.26	-0.11	0.40	0.17	-0.21
mmu-miR-106a-4395589	0.94	0.52	-0.23	-0.09	-0.35
mmu-miR-106b-4373155	0.76	0.48	-0.09	-0.33	-0.58
mmu-miR-107-4373154	-1.75	-1.51	0.73	1.05	0.09
mmu-miR-10a-4373153	3.10	3.55	-0.48	-0.27	-0.74
mmu-miR-10b-4395329	0.41	2.34	-0.08	-1.90	-0.34
mmu-miR-122-4395356	-0.06	0.73	0.28	0.60	-0.33
mmu-miR-124-4373295	4.73	2.33	-1.12	-0.98	-0.06
mmu-miR-125a-3p-4395310	0.41	-0.82	-1.08	-4.00	-0.44
mmu-miR-125a-5p-4395309	0.91	0.44	-0.29	-1.07	-0.10
mmu-miR-125b-5p-4373148	0.00	0.86	0.56	0.24	-0.54
mmu-miR-126-3p-4395339	0.33	0.50	0.11	-0.10	-0.13
mmu-miR-126-5p-4373269	0.56	0.62	0.00	-0.16	-0.20
mmu-miR-127-4373147	-4.06	-6.04	1.10	0.96	-1.33
mmu-miR-128a-4395327	0.89	2.30	0.12	-0.30	-1.20
mmu-miR-130a-4373145	1.30	1.02	-0.06	-0.35	-0.48
mmu-miR-130b-4373144	1.25	1.58	-0.81	-0.59	-0.07
mmu-miR-132-4373143	0.89	1.63	-1.46	-0.48	0.13
mmu-miR-133a-4395357	9.48	11.12	-0.58	-0.43	-0.88
mmu-miR-135a-4373140	-0.95	-1.72	1.86	-0.79	0.74
mmu-miR-135b-4395372	0.05	-1.03	-1.26	0.97	0.62
mmu-miR-138-4395395	0.93	0.31	-0.18	-0.65	-0.75
mmu-miR-139-5p-4395400	-0.24	0.17	0.54	0.50	0.18
mmu-miR-140-4373374	0.31	0.52	-0.10	-0.27	-0.38
mmu-miR-141-4373137	-0.42	0.12	4.06	0.29	-3.34
mmu-miR-142-3p-4373136	0.51	0.49	-0.13	-0.40	-0.41
mmu-miR-142-5p-4395359	-1.94	-4.02	0.64	0.39	-0.25
mmu-miR-143-4395360	0.32	0.69	0.45	-0.29	-0.69
mmu-miR-145-4395389	0.15	0.50	0.21	-0.45	-0.71
mmu-miR-146a-4373132	0.72	0.39	-0.10	-0.41	-0.25
mmu-miR-148a-4373130	0.02	0.97	0.33	0.26	-0.46

mmu-miR-148b-4373129	0.38	-0.22	0.58	0.39	-1.20
mmu-miR-150-4373127	0.43	0.47	-0.03	-0.76	-0.19
mmu-miR-151-3p-4373304	1.13	0.29	-0.95	-1.24	-0.18
mmu-miR-152-4395170	0.03	0.34	0.26	-0.19	-0.33
mmu-miR-155-4395701	0.40	0.18	0.09	-1.22	-0.05
mmu-miR-15a-4373123	0.92	0.88	-0.82	-0.92	-0.15
mmu-miR-15b-4373122	0.28	0.37	0.16	0.16	-0.45
mmu-miR-16-4373121	0.53	0.40	-0.31	-0.33	-0.20
mmu-miR-17-4395419	0.84	0.25	-0.09	-0.09	-0.34
mmu-miR-181a-4373117	0.05	0.37	0.09	0.09	-0.23
mmu-miR-182-4395729	0.12	-0.71	0.04	3.11	0.44
mmu-miR-183-4395380	-0.97	-2.45	1.60	1.90	-0.12
mmu-miR-184-4373113	-0.85	-2.54	2.35	3.30	0.43
mmu-miR-185-4395382	0.93	-0.65	-2.84	-3.02	0.50
mmu-miR-186-4395396	0.69	0.13	-0.06	-0.24	-0.09
mmu-miR-188-5p-4395431	1.01	1.63	-0.81	-0.43	-0.88
mmu-miR-18a-4395533	1.37	0.33	-0.96	-0.46	-0.12
mmu-miR-190-4373110	1.76	0.83	0.54	-0.53	-0.43
mmu-miR-191-4395410	0.42	0.02	-0.24	-0.43	0.12
mmu-miR-192-4373108	-0.03	0.67	0.13	0.07	-0.18
mmu-miR-193-4395361	1.00	3.57	-0.48	-0.37	-0.20
mmu-miR-193b-4395597	0.87	0.29	-0.26	0.02	-0.09
mmu-miR-194-4373106	-0.11	0.70	0.24	0.12	-0.26
mmu-miR-195-4373105	0.53	0.92	-0.21	-0.65	-0.69
mmu-miR-196b-4395326	1.20	0.34	0.90	2.20	-0.62
mmu-miR-197-4373102	1.00	1.11	-0.13	-0.37	-0.49
mmu-miR-199a-3p-4395415	0.44	1.14	0.33	-0.87	-0.33
mmu-miR-199a-5p-4373272	-0.27	-0.85	1.13	-0.07	2.46
mmu-miR-19a-4373099	0.95	1.41	-0.15	-0.12	-0.51
mmu-miR-19b-4373098	0.16	0.59	-0.01	0.04	-0.51
mmu-miR-200a-4378069	0.07	0.37	0.59	-0.88	-0.46
mmu-miR-200b-4395362	1.09	1.25	-0.14	-1.39	-0.46
mmu-miR-200c-4395411	0.40	0.71	2.25	-0.48	-1.85
mmu-miR-203-4373095	0.00	0.36	0.33	-0.22	-0.05
mmu-miR-204-4373094	-2.85	-1.63	1.65	2.59	1.67
mmu-miR-20a-4373286	0.85	0.82	-0.14	0.04	-0.38
mmu-miR-20b-4373263	0.81	0.65	-0.25	-0.36	-1.24
mmu-miR-21-4373090	0.43	0.52	0.07	-0.28	-0.26
mmu-miR-210-4373089	-0.03	1.12	0.51	1.41	-1.73
mmu-miR-211-4373315	3.02	3.12	-0.84	0.67	-2.71
mmu-miR-214-4395417	0.86	0.11	-0.87	-2.26	0.18
mmu-miR-215-4373316	1.88	0.34	-1.35	-0.46	-1.14
mmu-miR-218-4373081	1.39	1.79	-0.41	-0.22	-1.70
mmu-miR-221-4373077	-0.93	-0.02	1.75	0.24	-0.03
mmu-miR-222-4395387	0.68	4.23	0.75	-0.02	-0.46
mmu-miR-223-4395406	0.68	0.15	-0.15	-0.84	-0.16
mmu-miR-224-4395683	3.79	0.85	-1.18	-1.80	0.42
mmu-miR-23b-4373073	0.70	0.48	-0.12	-0.68	-0.15

mmu-miR-24-4373072	0.90	0.54	-0.29	-0.52	-0.09
mmu-miR-25-4373071	1.36	1.21	-0.19	-0.30	-0.57
mmu-miR-26a-4395166	0.11	0.89	0.35	-0.06	-0.42
mmu-miR-26b-4395167	-0.53	0.14	0.55	0.39	-0.19
mmu-miR-27a-4373287	0.87	0.98	-0.05	-0.46	-0.38
mmu-miR-27b-4373068	0.64	0.57	-0.35	-0.41	-0.16
mmu-miR-28-4373067	0.40	0.39	0.01	-0.07	-0.21
mmu-miR-292-3p-4395723	0.41	-0.93	-3.66	-5.68	0.04
mmu-miR-296-5p-4373066	-0.09	0.74	-4.28	-2.11	-0.70
mmu-miR-29a-4395223	0.53	0.81	-0.15	-0.38	-0.11
mmu-miR-29b-4373288	0.57	0.08	-3.13	-3.36	0.24
mmu-miR-29c-4395171	1.43	1.99	-0.24	-0.38	-0.07
mmu-miR-301a-4373064	1.66	1.32	-0.09	-0.25	-0.52
mmu-miR-301b-4395730	0.55	0.04	0.16	0.06	-0.79
mmu-miR-302a-4378070	3.19	3.29	-0.56	-0.38	-1.69
mmu-miR-302b-4378071	6.85	6.95	-0.61	-0.20	-1.42
mmu-miR-30a-4373061	0.33	0.65	0.09	-0.21	-0.72
mmu-miR-30b-4373290	0.33	0.83	0.00	-0.04	-0.32
mmu-miR-30c-4373060	0.37	0.68	0.04	-0.24	-0.15
mmu-miR-30d-4373059	0.38	0.00	0.19	-0.10	-0.69
mmu-miR-30e-4395334	0.40	0.94	0.26	-0.15	-0.51
mmu-miR-31-4373331	1.58	1.26	0.23	-0.13	-0.38
mmu-miR-32-4395220	2.48	0.15	0.28	-1.52	0.10
mmu-miR-320-4395388	0.67	0.13	-0.01	-0.22	-0.17
mmu-miR-322-4378107	0.39	0.37	0.02	-0.11	-1.01
mmu-miR-324-3p-4395639	2.09	0.32	-1.63	-0.67	-0.66
mmu-miR-324-5p-4373052	2.47	2.22	-1.93	-2.00	-0.15
mmu-miR-328-4373049	2.11	1.55	-0.21	-0.14	-0.91
mmu-miR-331-3p-4373046	1.13	0.70	0.04	-0.35	-0.73
mmu-miR-331-5p-4395344	-1.68	0.52	-0.65	2.06	0.73
mmu-miR-335-3p-4395296	0.42	0.22	-0.24	0.21	-1.23
mmu-miR-335-5p-4373045	0.13	0.46	0.23	0.59	-0.81
mmu-miR-338-3p-4395363	-0.24	-0.18	-1.83	-3.04	0.19
mmu-miR-339-5p-4395368	0.23	0.37	-0.67	-0.84	0.03
mmu-miR-340-3p-4395370	0.74	0.67	-0.81	-0.11	-0.18
mmu-miR-340-5p-4395369	0.40	0.64	-0.05	-0.73	-0.35
mmu-miR-342-3p-4395371	0.99	0.49	0.03	-0.83	-0.05
mmu-miR-345-3p-4395659	1.41	-3.08	-4.20	-2.28	0.87
mmu-miR-345-5p-4395658	0.60	0.14	0.33	-0.51	-0.75
mmu-miR-34a-4395168	1.00	0.05	0.01	-0.14	-0.30
mmu-miR-34b-3p-4395748	1.08	0.85	0.11	-0.86	-1.11
mmu-miR-34c-4373036	1.59	1.55	1.28	-0.82	0.91
mmu-miR-350-4395660	1.09	2.62	1.15	1.21	-0.92
mmu-miR-351-4373345	-0.88	-1.66	1.35	0.77	0.46
mmu-miR-361-4373035	-0.41	-0.08	0.60	-0.16	0.15
mmu-miR-362-3p-4395746	2.29	4.21	-0.13	-2.28	-0.05
mmu-miR-363-4378090	-1.06	-0.06	-0.82	0.26	0.51
mmu-miR-365-4373194	-1.03	-0.23	0.51	0.46	0.19

mmu-miR-367-4373034	0.15	0.25	-0.23	-1.33	-1.82
mmu-miR-375-4373027	0.12	0.87	1.93	-0.28	-0.68
mmu-miR-376c-4395580	1.18	-1.05	2.12	1.16	-0.99
mmu-miR-381-4373020	-2.50	-1.78	0.10	0.40	0.38
mmu-miR-384-5p-4395732	-1.01	0.25	-2.14	-0.85	-2.24
mmu-miR-411-4381013	-4.78	-0.62	-0.15	-0.35	-1.35
mmu-miR-423-5p-4395451	-0.19	-1.86	0.37	0.58	0.76
mmu-miR-425-4380926	0.77	0.62	-3.61	-1.94	-0.25
mmu-miR-429-4373355	0.61	0.54	-0.27	-1.42	-0.26
mmu-miR-434-3p-4395734	-0.92	0.78	1.76	1.30	0.17
mmu-miR-449a-4373207	2.70	4.11	1.48	0.12	-3.26
mmu-miR-450a-5p-4395414	1.21	1.60	0.50	2.41	-1.88
mmu-miR-451-4373360	-0.43	0.46	1.83	2.28	-1.07
mmu-miR-484-4381032	1.28	0.57	-0.19	-0.51	-0.38
mmu-miR-486-4378096	-0.73	1.71	0.64	1.20	-2.78
mmu-miR-494-4395476	0.58	-0.27	-0.14	0.11	-0.23
mmu-miR-497-4381046	0.79	1.02	-0.01	-0.30	-0.38
mmu-miR-499-4381047	-0.30	-0.20	0.44	0.30	-0.89
mmu-miR-500-4395736	2.07	-2.71	3.23	4.73	-1.02
mmu-miR-503-4395586	3.14	2.05	-0.70	-1.32	-0.35
mmu-miR-509-3p-4395651	1.14	1.19	-0.50	-0.62	-1.54
mmu-miR-511-4395679	2.02	1.26	-1.29	-1.51	0.14
mmu-miR-532-3p-4395466	0.73	0.34	-0.15	-0.03	-0.39
mmu-miR-532-5p-4380928	0.58	2.58	-0.65	-0.88	0.09
mmu-miR-539-4378103	-1.50	-5.27	0.69	0.56	-0.91
mmu-miR-542-3p-4378101	0.44	-0.28	1.51	0.96	-0.05
mmu-miR-542-5p-4395693	1.63	1.67	4.00	-0.58	-1.77
mmu-miR-574-3p-4395460	0.14	-0.05	0.37	0.13	-0.95
mmu-miR-582-5p-4395696	0.59	-1.00	-1.90	-1.29	-1.61
mmu-miR-598-4395606	2.83	-0.60	0.72	-1.38	0.65
mmu-miR-652-4395463	1.10	0.81	-0.69	-0.62	-0.20
mmu-miR-667-4386769	-0.56	-1.56	0.77	1.07	0.03
mmu-miR-671-3p-4395433	-0.42	-0.86	0.27	1.47	0.79
mmu-miR-672-4395438	-0.88	0.13	3.33	1.20	-0.47
mmu-miR-674-4395193	2.09	2.52	-0.57	-0.49	-2.51
mmu-miR-682-4381081	1.27	0.88	0.35	0.03	-2.19
mmu-miR-685-4386748	0.53	-0.12	0.24	-0.21	-0.88
mmu-miR-708-4395452	3.32	4.23	-1.15	-0.04	-1.72
mmu-miR-744-4395435	0.58	0.44	0.20	-0.25	-0.17
mmu-miR-7a-4378130	2.85	1.12	1.42	-0.22	-0.72
mmu-miR-7b-4395685	-1.36	-1.44	0.45	0.53	-1.90
mmu-miR-802-4395566	-0.78	2.15	0.43	0.74	-0.56
mmu-miR-872-4395375	0.85	1.17	-0.44	-0.23	-0.25
mmu-miR-9-4373285	-2.96	0.82	0.65	-1.32	1.43
mmu-miR-92a-4373013	0.14	0.26	0.17	-0.04	-0.64
mmu-miR-93-4373302	1.11	0.10	-0.29	-0.57	-0.10
mmu-miR-96-4373372	-1.38	-1.86	0.30	0.52	1.70
mmu-miR-98-4373009	0.29	0.64	1.07	0.85	-0.50

mmu-miR-99b-4373007	0.92	0.73	-0.10	-1.03	-0.28
rno-miR-1-4395765	0.16	1.27	-1.04	-0.54	-1.99
rno-miR-17-3p-4395779	0.71	0.01	-0.82	0.01	0.48
rno-miR-190b-4395749	3.51	2.08	-0.23	-1.57	0.15
rno-miR-207-4381096	0.25	1.65	0.29	-0.02	0.73
rno-miR-224-4373187	3.17	-0.54	-0.30	-0.85	0.45
rno-miR-333-4381109	-0.01	-0.09	0.55	-0.06	0.33
rno-miR-339-3p-4395760	0.59	0.99	-2.58	-2.45	0.12
rno-miR-345-3p-4395762	0.32	0.34	1.07	-0.01	-0.02
rno-miR-351-4395764	0.39	0.23	0.30	1.58	-0.82
rno-miR-381-4381102	0.13	0.23	1.28	2.32	-4.53
rno-miR-450a-4381124	0.58	0.47	0.36	-0.19	-1.03
rno-miR-466c-4395768	1.65	-0.20	3.41	2.49	-2.84
rno-miR-505-4381097	0.63	4.66	0.86	-1.45	-1.16
rno-miR-532-5p-4395752	0.71	0.74	0.08	-0.12	-0.34
snoRNA135-4380912	-0.05	-0.09	0.88	0.63	0.03

Tab suppl. 3A: miRNA differenzialmente espressi negli Ade/eHCC rispetto alle lesioni KRT-19+

miRNA	FC	miRNA	FC
iper-espressi		miR-29c	4,94
miR-133a	3140,83	miR-185	4,91
miR-302b	160,69	miR-130b	4,80
miR-362-3p	47,43	miR-200b	4,29
miR-505	34,75	miR-218	4,24
miR-708	26,89	miR-15a	3,37
miR-324-5p	18,26	miR-328	3,29
miR-193	15,90	ipo-espressi	
miR-222	15,19	miR-127	0,01
miR-10a	15,04	miR-500	0,01
miR-292-3p	14,80	miR-539	0,02
miR-296-5p	13,77	miR-184	0,02
miR-302a	13,46	miR-142-5p	0,04
miR-339-3p	11,27	miR-183	0,05
miR-10b	11,02	miR-204	0,07
miR-532-5p	10,28	miR-466c	0,12
miR-29b	10,10	miR-376c	0,16
miR-425	9,64	miR-667	0,18
miR-503	8,61	miR-107	0,19
miR-211	8,58	miR-423-5p	0,20
miR-190b	8,43	miR-96	0,20
miR-674	8,23	miR-671-3p	0,28
miR-224	5,23	miR-451	0,32

Tab. suppl. 3B: miRNA differenzialmente espressi negli HCC tardivi rispetto agli Ade/eHCC

miRNA	FC	miRNA	FC
iper-espressi		miR-674	3,96
miR-381	84,54	miR-183	3,71
miR-466c	52,95	miR-148b	3,17
miR-141	38,12	ipo-espressi	
miR-500	34,42	miR-292-3p	0,03
miR-449a	15,60	miR-29b	0,09
miR-486	13,36	miR-185	0,09
miR-450a-5p	11,08	miR-339-3p	0,16
miR-542-5p	8,90	miR-425	0,19
miR-451	8,88	miR-1	0,20
miR-210	6,76	miR-214	0,28
miR-211	6,67	miR-324-5p	0,28
miR-200c	5,83	miR-151-3p	0,52
miR-196b	4,79		

Tab. suppl. 4A: miRNA comunemente deregolati nelle lesioni KRT-19+ e negli aHCC

miR-183-4395380
miR-224-4373187
miR-214-4395417
miR-192-4373108
miR-499-4381047
miR-200a-4378069
miR-429-4373355
miR-200b-4395362
miR-224-4395683
miR-125b-5p-4373148
miR-182-4395729
miR-194-4373106
miR-193-4395361
miR-93-4373302
miR-185-4395382
miR-802-4395566
miR-122-4395356
miR-375-4373027

Tab. suppl. 4B: miRNA comunemente deregolati nelle lesioni KRT-19+ e negli Ade/eHCC

miR-224-4395683
miR-802-4395566
miR-224-4373187
miR-451-4373360
miR-125b-5p-4373148
miR-194-4373106
miR-192-4373108
miR-185-4395382
miR-486-4378096
miR-200b-4395362
miR-429-4373355
miR-499-4381047
miR-93-4373302
miR-19b-4373098
miR-127-4373147
miR-214-4395417
miR-375-4373027
miR-122-4395356
miR-539-4378103
miR-148a-4373130
miR-26a-4395166
miR-1-4395765

Tab. suppl. 4C: miRNA comunemente deregolati negli Ade/eHCC e negli aHCC

miR-324-5p-4373052
miR-130a-4373145
miR-224-4373187
miR-214-4395417
miR-192-4373108
miR-499-4381047
miR-429-4373355
miR-200b-4395362
miR-1-4395333
miR-224-4395683
miR-125b-5p-4373148
miR-194-4373106
miR-93-4373302
miR-185-4395382
miR-802-4395566
let-7i-4395332
miR-301a-4373064
miR-122-4395356
miR-99b-4373007
miR-375-4373027
miR-125a-5p-4395309
miR-331-3p-4373046
miR-151-3p-4373304
miR-29b-4373288
miR-484-4381032

Tab. suppl. 5: miRNA differenzialmente espressi nelle lesioni KRT-19+ rispetto a quelle KRT-19-

miRNA	FC
iper-espressi	
miR-224	16,11
miR-500	12,82
miR-539	6,52
miR-185	2,92
miR-34a	2,38
miR-93	2,09
miR-183	1,96
miR-182	1,74
miR-17	1,61
miR-320	1,52
miR-24	1,35
ipo-espressi	
miR-9	0,09
miR-222	0,11
miR-802	0,15
miR-486	0,25
miR-193	0,28
miR-148a	0,56
miR-26b	0,57
miR-194	0,57
miR-122	0,61
miR-125b-5p	0,61
miR-26a	0,63
miR-192	0,66

Tab suppl. 6: elenco degli 86 geni ortologhi tra ratto e uomo coinvolti nella progressione dell'HCC (in grassetto sono indicati i geni deregolati anche nelle lesioni KRT-19+)

Smboli	Nomi dei geni
ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
ABCC6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6
AGXT	alanine-glyoxylate aminotransferase
AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1, member C1
AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3
AKR1C4	aldo-keto reductase family 1, member C4
ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate
ANGPTL4	angiopoietin-like 4
ANXA1	annexin A1
ANXA2	annexin A2
ANXA4	annexin A4
ANXA5	annexin A5
ANXA7	annexin A7
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase 1
AVPR1A	arginine vasopressin receptor 1A
BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (<i>Xenopus laevis</i>)
BOK	BCL2-related ovarian killer
C15orf23	chromosome 15 open reading frame 23
C5orf13	chromosome 5 open reading frame 13
CCNB2	cyclin B2
CD63	CD63 molecule
CDH17	cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine)
COL1A2	collagen, type I, alpha 2
CRYAB	crystallin, alpha B
CSDA	cold shock domain protein A
CTGF	connective tissue growth factor
CX3CL1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
DEFB1	defensin, beta 1
DHRS7	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7
EGF	epidermal growth factor
ENTPD5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
ESM1	endothelial cell-specific molecule 1
FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
GCLM	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
GNMT	glycine N-methyltransferase
GPX2	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
HAGH	hydroxyacylglutathione hydrolase
HAL	histidine ammonia-lyase
HAO2	hydroxyacid oxidase 2 (long chain)
HES6	hairy and enhancer of split 6 (<i>Drosophila</i>)
ICA1	islet cell autoantigen 1, 69kDa
IER3	immediate early response 3
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3
EHHADH	enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase
RPSA	ribosomal protein SA

LBP	lipopolysaccharide binding protein
LGALS3BP	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein
LCP1	lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)
LPL	lipoprotein lipase
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NDRG2	NDRG family member 2
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
PCYOX1	prenylcysteine oxidase 1
PIK3C3	phosphoinositide-3-kinase, class 3
PIR	pirin (iron-binding nuclear protein)
PLA2G7	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase)
PLSCR1	phospholipid scramblase 1
PMM1	phosphomannomutase 1
PPAP2C	phosphatidic acid phosphatase type 2C
PQLC3	PQ loop repeat containing 3
PYGB	phosphorylase, glycogen; brain
RND1	Rho family GTPase 1
MRPL13	mitochondrial ribosomal protein L13
RTKN	rhotekin
S100A11	S100 calcium binding protein A11
SERPINB1	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1
SLC22A25	solute carrier family 22, member 25
SLC40A1	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1
SNX10	sorting nexin 10
SPINT1	serine peptidase inhibitor, Kunitz type 1
SYNJ2	synaptojanin 2
TALDO1	transaldolase 1
TAX1BP3	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3
TMEM55A	transmembrane protein 55A
TNFRSF12A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A
TSPAN3	tetraspanin 3
TSPAN8	tetraspanin 8
TUBB	tubulin, beta
TUBB2A	tubulin, beta 2A
TUBB6	tubulin, beta 6
TXNRD1	thioredoxin reductase 1
VIM	vimentin

Tab. suppl. 7: elenco dei miRNA coinvolti nella progressione degli HCC di ratto e umani

miRNA	References
miR-224	1, 4, 6, 7, 8
miR-183	4, 6, 8
miR-130b	7
miR-130a	15
miR-182	4, 6, 8, 18
miR-324-5p	4, 7, 8
miR-301a	4, 5, 6, 8
miR-331-3p	6
miR-222	3, 4, 6, 8
miR-151-3p	4, 8
miR-193b	6
miR-98	14
miR-185	2, 6
miR-93	5, 7, 8
miR-425	9
miR-99b	13
miR-106b	5, 7, 8
miR-15b	12
miR-181a	10
let-7i	14
miR-292-3p	11
miR-1	2, 5
miR-375	16, 17
miR-125b-5p	2, 5, 6, 7, 8
miR-194	2, 8
miR-122	3, 5, 7, 8

Referenze

1	Murakami Y. et al, Oncogene, 2006
2	Budhu A. et al, Hepatology, 2008
3	Cairo S. et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2010
4	Wang YU. et al, J Biol Chem, 2008
5	Wong CM. et al, Hepatology, 2012
6	Wong QW. et al, Clin Cancer Res, 2010
7	Connolly E. et al, Am J Pathol, 2008
8	Borel F. et al, J Hepatol, 2012
9	Pineau P. et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 2010
10	Junfang J. et al, Hepatology, 2009
11	Meng F. et al, Gastroenterology, 2007
12	Huang YH. et al, Plos One, 2012
13	Kutay H. et al, J Cell Biol, 2006
14	Huang YS. et al, J Gastr Hep, 2008
15	Huang XH. et al, Hepatol Res, 2009
16	Liu AM. et al, Biochem Biophys Res Commun, 2010
17	He XX. et al, Oncogene, 2011
18	Li S. et al, Hepatology, 2009