



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN
INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI INDUSTRIALI

SIMULAZIONE STOCASTICA DEL PROCESSO DI
RIPROGRAMMAZIONE CELLULARE TRAMITE ESPRESSIONE
EPISOMALE MULTIFATTORIALE IN PIATTAFORMA
MICROFLUIDICA

Relatore: Prof. Nicola Elvassore

Correlatori: Ing. Camilla Luni

Ing. Federica Michielin

Laureando: FRANCESCO RIZZOTTI

Anno accademico: 2011-2012

A Umberto, Laura e Cristina

*Il loro esempio e stimolo mi fa sempre
raggiungere traguardi importanti...*

Riassunto

Questo lavoro di tesi tratta dello sviluppo di un modello stocastico per simulare le prime fasi del processo di riprogrammazione cellulare che porta alla produzione di cellule staminali pluripotenti. Il modello descrive il processo di infezione mediante adenovirus per introdurre nelle cellule i quattro fattori di Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) ed i meccanismi intracellulari successivi. È stato simulato il moto browniano e convettivo degli adenovirus nell'ambiente extracellulare. Si è descritto in modo stocastico l'adsorbimento dei virus nelle cellule e quindi l'introduzione del DNA virale nella popolazione cellulare coltivata all'interno di un canale microfluidico. I processi intracellulari modellati comprendono la trascrizione dell'mRNA virale nel nucleo cellulare, la sua traduzione in proteina nei ribosomi, la duplicazione cellulare ed i meccanismi di DNA binding da parte dei quattro fattori di Yamanaka, tenendo conto degli effetti cooperativi tra Oct4 e Sox2. Inoltre il modello è in grado di simulare infezioni multiple a diverse dosi virali.

Il modello stocastico fornisce risultati che permettono di correlare il rilascio di adenovirus, dipendente dalle condizioni operative dell'esperimento, all'effettiva espressione episomale dei quattro fattori di trascrizione esogeni e al loro binding a specifici target sul DNA. Infine, è stata svolta un'analisi di sensibilità per analizzare come ciascuna condizione operativa influisca sulle proprietà medie e distribuite della popolazione cellulare.

Indice

INTRODUZIONE	1
CAPITOLO 1 – Cellule staminali e stato dell’arte nella riprogrammazione cellulare	3
1.1 INTRODUZIONE ALLE CELLULE STAMINALI.....	3
1.2 OTTENIMENTO E CLASSIFICAZIONE DELLE CELLULE STAMINALI.....	4
1.2.1 Cellule staminali embrionali.....	4
1.2.2 Cellule staminali pluripotenti indotte.....	5
1.3 INFEZIONI VIRALI.....	6
1.3.1 Retrovirus e adenovirus.....	6
1.3.2 Adenovirus.....	7
1.4 IL PROCESSO DI INFEZIONE VIRALE ED I MECCANISMI DI RIPROGRAMMAZIONE.....	8
1.4.1 Trasporto del virus dal bulk della sospensione virale alla superficie cellulare.....	8
1.4.2 Trafficking intracellulare.....	9
1.4.3 Meccanismi di riprogrammazione.....	10
1.4.4 Rapporti stechiometrici fra i quattro fattori.....	10
1.5 TECNOLOGIA MICROFLUIDICA.....	12
1.5.1 La microfluidica in campo biologico.....	12
1.5.2 Fisica della microscala.....	12
1.6 MODELLI MATEMATICI.....	13
1.6.1 Modelli deterministici.....	13
1.6.2 Modelli stocastici.....	14
1.6.2.1 Moto browniano.....	14
1.6.3 Modelli stocastici di ingresso del virus nella cellula.....	15
1.6.4 Modelli stocastici di espressione genica.....	20
1.6.5 Modelli stocastici di riprogrammazione cellulare.....	22
1.7 OBIETTIVO DELLA TESI.....	26
CAPITOLO 2 – Materiali e metodi	28
2.1 PRODUZIONE PIATTAFORMA MICROFLUIDICA.....	28
2.1.1 Soft litografia.....	28
2.1.2 Creazione del master tramite fotolitografia.....	29
2.1.2.1 Pretrattamento del Wafer.....	29
2.1.2.2 Deposizione del photoresist.....	30
2.1.2.3 Trattamento termico ed esposizione.....	30

2.1.2.4	Trattamento termico e sviluppo.....	31
2.1.2.5	Trattamento chimico superficiale.....	32
2.1.3	Produzione dello stampo in PDMS.....	32
2.1.3.1	Caratteristiche fisiche del PDMS.....	33
2.1.3.2	Produzione del chip microfluidico.....	34
2.2	CARATTERIZZAZIONE FLUIDODINAMICA.....	36
2.2.1	Campo di moto.....	36
2.2.2	Stima dell'evaporazione.....	38
2.2.2.1	Evaporazione attraverso lo strato di PDMS.....	38
2.2.2.2	Evaporazione dal pozzetto.....	41
2.3	PROTOCOLLO SPERIMENTALE DELLE INFEZIONI VIRALI.....	41
2.4	ANALISI DI IMMAGINE.....	42
2.4.1	Analisi di immagine con MATLAB.....	42
2.4.2	Virus decay.....	44
2.5	ANALISI DI IMMAGINE CON CELL PROFILER.....	47
2.5.1	Curva di crescita cellulare.....	49
	CAPITOLO 3 – Modello matematico.....	52
3.1	RAPPRESENTAZIONE DEL PROCESSO SIMULATO.....	52
3.2	INFEZIONE VIRALE DI UN SINGOLO FATTORE.....	54
3.2.1	Equazioni del moto browniano e convettivo.....	56
3.2.2	Adsorbimento.....	56
3.3	PROCESSI INTRACELLULARI.....	58
3.3.1	Modello di duplicazione cellulare.....	58
3.3.1.1	Implementazione della legge logistica.....	59
3.3.2	Bilanci di materia mRNA e della Proteina.....	62
3.3.3	Bilanci di materia integrati con la duplicazione cellulare.....	64
3.4	INFEZIONI SEQUENZIALI.....	66
3.5	INFEZIONE MULTIFATTORIALE.....	67
3.5.1	Metodo di implementazione nel software.....	68
3.6	DNA BINDING.....	70
3.7	PARAMETRI DEL MODELLO MATEMATICO.....	73
	CAPITOLO 4 – Risultati del modello.....	75
4.1	CONDIZIONI NOMINALI DI SIMULAZIONE.....	75
4.2	DUPLICAZIONE CELLULARE.....	75
4.3	RILASCIO DI DNA VIRALE NELLA POPOLAZIONE CELLULARE.....	77
4.3.1	DNA virale nella popolazione cellulare per MOI 1.....	77
4.3.2	DNA virale nella popolazione cellulare per MOI 20.....	82

4.4	RISULTATI OTTENUTI DAI PROCESSI INTRACELLULARI.....	86
4.4.1	Produzione di mRNA e proteina per MOI 1.....	86
4.4.2	Produzione di mRNA e proteina per MOI 20.....	89
4.5	RISULTATI DEL DNA BINDING.....	92
4.5.1	DNA binding per MOI 1.....	92
4.5.2	DNA binding per MOI 20.....	95
	CAPITOLO 5 – Analisi di sensitività.....	99
5.1	SIMULAZIONE DI RIFERIMENTO.....	99
5.2	ANALISI DI SENSITIVITÀ.....	103
5.2.1	Variazione della MOI.....	103
5.2.1.1	MOI 60.....	103
5.2.1.2	MOI 40.....	105
5.2.1.3	Eterogeneità della popolazione cellulare.....	106
5.2.2	Variazione del numero di cicli di infezione.....	107
5.2.2.1	Tre cicli di infezione.....	107
5.2.2.2	Quattro cicli di infezione.....	108
5.2.2.3	Eterogeneità della popolazione cellulare.....	109
5.2.3	Variazione del tempo di inter-infezione.....	110
5.2.3.1	Tempo di inter-infezione di 24 h.....	110
5.2.3.2	Tempo di inter-infezione di 48 h.....	111
5.2.3.3	Eterogeneità della popolazione cellulare.....	113
5.3	CONCLUSIONI SULL'ANALISI DI SENSITIVITÀ.....	113
	CONCLUSIONI.....	115
	NOMENCLATURA.....	116
	BIBLIOGRAFIA.....	119
	APPENDICE A.....	123
	APPENDICE B.....	158
	APPENDICE C.....	167
	APPENDICE D.....	173
	APPENDICE E.....	174
	APPENDICE F.....	180

Introduzione

L'oggetto di studio del presente lavoro di tesi è il processo di riprogrammazione cellulare, mediante il quale è possibile ottenere cellule staminali pluripotenti a partire da cellule somatiche. L'approccio seguito si riferisce all'importante scoperta scientifica del Dott. Shinya Yamanaka (Premio Nobel per la Medicina 2012). Il Dott. Yamanaka scoprì, nel 2006, che introducendo quattro geni codificanti per specifici fattori di trascrizione in cellule murine differenziate è possibile riprogrammarle allo stato di staminale pluripotente, da cui poi ottenere per differenziamento tutti i tipi di cellule di un organismo adulto. Tale scoperta ha permesso a numerosi laboratori di tutto il mondo, tra cui il BioERA, di creare nuove opportunità di ricerca per lo studio dei meccanismi biologici e lo sviluppo di nuovi metodi terapeutici in medicina rigenerativa.

Questa tesi si colloca all'interno di un progetto più ampio in corso nel laboratorio BioERA per lo studio della riprogrammazione cellulare in piattaforme microfluidiche. La piattaforma microfluidica ha lo scopo di migliorare l'efficienza ed il controllo del rilascio dei quattro fattori di Yamanaka nelle cellule mediante adenovirus. Una volta infettate, le cellule iniziano a produrre i quattro fattori esogeni e a riprogrammarsi mediante una serie di processi intracellulari ancora non completamente elucidati. Il contributo di questa tesi è di tipo ingegneristico: si è sviluppato un modello matematico stocastico che consente di correlare l'espressione dei fattori esogeni, in una popolazione cellulare eterogenea, alle condizioni sperimentali nella piattaforma microfluidica.

Questa tesi si articola in cinque capitoli. Il primo capitolo indica lo stato dell'arte della riprogrammazione cellulare: vengono introdotti da un punto di vista biologico i meccanismi intracellulari che intervengono in seguito all'infezione virale. Si discutono i modelli matematici presenti in letteratura riguardanti il moto dei virus ed il loro adsorbimento sullo strato cellulare, la produzione di mRNA virale e proteine, che costituiscono i fattori di trascrizione.

Nel secondo capitolo vengono riportati i materiali ed i metodi utilizzati per la fabbricazione della piattaforma microfluidica e per l'analisi di immagine. Inoltre viene discussa la caratterizzazione fluidodinamica del chip microfluidico, eseguita con un software agli elementi finiti (Comsol Multiphysics 4.2).

Nel terzo capitolo viene spiegato il modello matematico e il metodo di implementazione nel software di calcolo MATLAB. Vengono riportate le equazioni che hanno permesso di

tradurre in linguaggio matematico l'intero processo biologico che dall'infezione virale porta all'espressione episomale dei quattro fattori di trascrizione esogeni.

Nel quarto capitolo vengono esposti i risultati del modello che permettono di correlare le condizioni operative del rilascio del DNA virale all'espressione episomale multifattoriale della popolazione cellulare simulata.

Il quinto capitolo tratta l'analisi di sensitività volta ad analizzare come ciascuna condizione operativa influisca sulle proprietà della popolazione cellulare.

Capitolo 1

Cellule staminali e stato dell'arte nella riprogrammazione cellulare

In questo capitolo si tratterà degli aspetti biologici che intervengono nella riprogrammazione cellulare per ottenere cellule staminali pluripotenti indotte tramite infezioni virali. Verranno sottolineati i vantaggi che offrono i dispositivi microfluidici nel condurre sperimentalmente le infezioni virali e si descriveranno i modelli matematici proposti in letteratura per simulare questo processo. Infine verrà indicato l'obiettivo di questo lavoro di tesi.

1.1 Introduzione alle cellule staminali

Tutti gli organi e tessuti nel nostro corpo sono costituiti da cellule specializzate con precise funzioni biologiche che derivano da un gruppo di cellule, costituenti l'embrione nelle prime fasi di sviluppo, dalle quali si genera l'intero organismo. Tali cellule sono identificate come cellule staminali embrionali. Perciò esse sono cellule primitive non specializzate, dotate della singolare capacità di trasformarsi in diversi tipi di cellule del corpo attraverso un processo noto come differenziamento. Per questo motivo i meccanismi biologici di queste cellule hanno assunto recentemente uno spiccato interesse dal punto di vista medico; infatti giocano un ruolo importante nella medicina rigenerativa che consiste nel trattamento di malattie incurabili mediante terapie di trapianto.

Grazie alla loro capacità di sostituire le cellule danneggiate nel corpo, le cellule staminali potrebbero essere usate per trattare una serie di condizioni patologiche tra cui malattie genetiche relative al sistema sanguigno [*Blau et al., 1988; Moayeri et al., 2005*], diabete [*Burns et al., 2006; Yamoaka et al., 2003*], morbo di Parkinson e lesioni del midollo spinale. La speranza è che il trapianto, l'attecchimento e la crescita delle cellule staminali nel tessuto danneggiato possa rigenerare i vari tipi di cellule presenti nel tessuto stesso e perse a causa di condizioni patologiche. Questa innovativa frontiera della medicina spinge la comunità scientifica ad attuare un grosso sforzo per isolare, caratterizzare e differenziare cellule

staminali di varia natura in condizioni di coltura controllate in modo da concepire e poter applicare su larga scala il processo di differenziamento. Tuttavia esistono due problemi principali che riguardano l'utilizzo di cellule staminali embrionali: il primo è di carattere etico, infatti il processo di isolamento di queste cellule richiede la distruzione dell'embrione umano; il secondo riguarda il rigetto, questo perché il sistema immunitario del paziente riconosce le cellule ed i tessuti estranei provocando il rigetto del tessuto trapiantato [Martin 1981]. Per cercare di superare queste problematiche la comunità scientifica sta impiegando in questi anni numerosi sforzi per risolvere l'ostacolo derivante dalla differenziamento *in vitro*.

1.2 Ottenimento e classificazione delle cellule staminali

È possibile classificare le cellule staminali in base al loro ottenimento: si distinguono così le cellule staminali embrionali (ESC) e le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC).

1.2.1 Cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali vengono isolate dalla parte interna della blastocisti e coltivate *in vitro* ricreando lo schema di sviluppo e di differenziamento, acquisendo così la specifica funzione delle cellule mature del tessuto in cui risiedono. Terminato lo sviluppo dell'organismo il numero delle cellule staminali si stabilizza ed esse acquisiscono altre mansioni finalizzate al mantenimento dell'integrità funzionale dei tessuti.

Le cellule staminali vengono normalmente suddivise in quattro macro-categorie in funzione dello stadio di maturazione [Rao, 2004]:

- *Totipotenti*: sono quelle cellule staminali che possono svilupparsi in un intero organismo e anche in tessuti extra-embryonari: zigote.
- *Pluripotenti*: sono quelle cellule staminali che possono specializzarsi in tutti i tipi di cellule che troviamo in un individuo adulto ma non in cellule che compongono i tessuti extra-embryonari: cellule staminali embrionali;
- *Multipotenti*: sono quelle cellule staminali in grado di specializzarsi solo in alcuni tipi di cellule: cellule staminali adulte;
- *Unipotenti*: sono quelle cellule staminali che danno origine solo ad un tipo di cellula specializzata: cellule precursori di cellule differenziate.

Questo tipo di suddivisione permette di caratterizzare le diverse fasi di specializzazione. Le cellule staminali totipotenti danno origine a cellule staminali multipotenti, ciascuna delle quali dà origine a determinate cellule unipotenti che, infine, producono le cellule adulte.

1.2.2 Cellule staminali pluripotenti indotte

Le iPS (dall'inglese *Induced Pluripotent Stem Cells*) sono cellule staminali pluripotenti, derivate artificialmente da cellule somatiche adulte. Si pensa che le cellule staminali pluripotenti indotte siano identiche alla loro controparte naturale, le staminali embrionali, per l'espressione di certi geni e proteine, schemi di metilazione della cromatina, tempi di divisione, formazione del nucleo embrionale, capacità di formare di teratomi e potenziale differenziativo. Le cellule iPS vengono tipicamente derivate per trasfezione di particolari geni tipici delle staminali embrionali, all'interno di cellule non pluripotenti, come i fibroblasti adulti. Questo tipo di ottenimento *in vitro* di cellule staminali suscita molto interesse perché previene non solo il rigetto immunologico ma anche questioni etiche relative all'impiego di cellule staminali embrionali. Questo nuovo approccio di ottenimento di cellule staminali lo si deve al team del Dr. Shinya Yamanaka dell'Università di Kyoto, Giappone, nel 2006 [Yamanaka *et al.* 2006]. Il team del Dr. Yamanaka ha scelto 24 geni normalmente espressi in cellule staminali embrionali e li ha utilizzati su cellule somatiche. Dei 24 geni testati, 4 hanno mostrato di far regredire i fibroblasti adulti: l'espressione dei fattori di trascrizione Oct4, Sox2, c-Myc e Klf4 in fibroblasti, mediata dalla trasfezione di vettori retrovirali, ha modificato la morfologia cellulare, la capacità proliferativa, l'espressione di marcatori superficiale ed ha indotto in queste cellule la capacità pluripotente staminale, da cui il nome *induced pluripotent stem cells*.

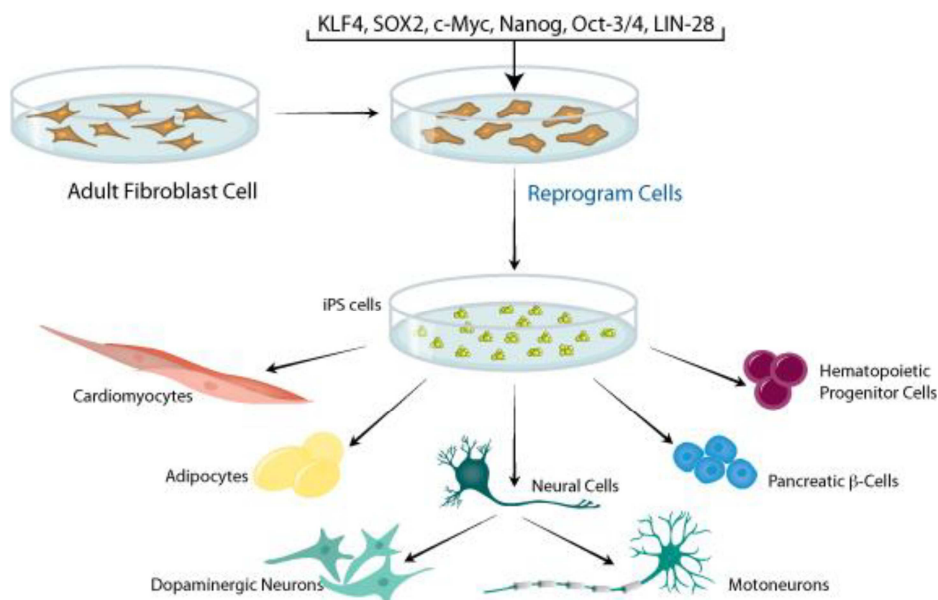


Figura 1.1 Retrovirus per tradurre fibroblasti di ratto con altri geni, individuando i 4 geni chiave per la produzione delle iPS cells [Yamanaka *et al.* 2006].

Sono stati così identificati quattro geni chiave per la produzione di staminali pluripotenti: Oct-3/4, Sox2, c-Myc, e Klf4. Le cellule sono state selezionate tramite selezione antibiotica per le cellule Fbx15⁺. Ma questa linea di iPS mostrò errori nella metilazione del DNA in confronto

agli schemi naturali nella linea ESC e la produzione di chimere funzionali fallì. Nel giugno del 2007, lo stesso gruppo [Yamanaka *et al.*, 2007] pubblicò uno studio innovativo insieme con altri due gruppi di ricerca indipendenti di Harvard, del MIT, e dell'Università della California di Los Angeles, ottenendo con successo la riprogrammazione dei fibroblasti in iPS. Queste linee cellulari sono derivate dai fibroblasti di ratto tramite riattivazione, mediata da retrovirus, degli stessi quattro fattori endogeni, ma i ricercatori questa volta selezionarono marker differenti. Invece di Fbx15, utilizzarono Nanog, che è un gene importante per le ESC. Gli schemi di metilazione del DNA indicano che Nanog è uno dei fattori principali per la pluripotenza cellulare, ciò porterebbe ad ottenere staminali pluripotenti senza usare le staminali embrionali. Sfortunatamente, uno dei quattro geni, c-Myc, necessario per l'induzione di pluripotenza, è cancerogeno, ed il 20% dei ratti con impianti di iPS sviluppano teratomi cancerosi. In uno studio successivo, Yamanaka ha riferito che si possono creare iPS anche senza c-Myc. Il processo richiede più tempo ed è meno efficiente, ma le chimere risultanti non sviluppano il cancro. Nel novembre del 2007, è stata posta una pietra miliare ampiamente documentata nella stampa con la creazione di iPS da cellule umane adulte. Con lo stesso principio applicato ai ratti, Yamanaka ha con successo trasformato i fibroblasti umani in cellule staminali pluripotenti usando gli stessi geni: Oct3/4, Sox2, Klf4, e c-Myc, per mezzo di infezione retrovirale.

1.3 Infezioni virali

Per ottenere cellule staminali pluripotenti indotte si segue l'approccio del Dr. Yamanaka, secondo il quale le cellule differenziate vengono infettate con vettori virali a DNA contenenti 4 geni che si sono rilevati essere i marker associati alle staminali embrionali. Un modo per distinguere i metodi della riprogrammazione cellulare riguarda il tipo di virus con il quale si esegue l'infezione. Si possono usare retrovirus o adenovirus.

1.3.1 *Retrovirus e adenovirus*

La differenza principale tra questi due tipi di vettori virali consiste nell'integrazione del DNA virale nel DNA della cellula infettata da parte dei retrovirus, cosa che non avviene con gli adenovirus. I vettori retrovirali vengono spesso utilizzati per terapie genetiche cliniche e nella ricerca perché la struttura morfologica e i loro meccanismi biologici sono ben conosciuti ed hanno un'alta efficienza di trasfezione. Tuttavia lo svantaggio principale nel loro utilizzo deriva dall'integrazione del DNA retrovirale nel genoma ospite che quindi porta all'espressione persistente di transgeni che possono provocare mutazioni genetiche che degenerano in tumori. Inoltre la loro perdita di espressione può portare all'inibizione ed al

completo differenziamento e mutazione delle cellule aumentando il rischio di formazione di teratomi [Montini *et al.*, 2006].

Emerge quindi la necessità di sviluppare strategie sperimentali che portino ad un aumento dell'efficienza di generare delle cellule iPS mediante l'uso di adenovirus non integranti [Chen *et al.*, 2009].

1.3.2 Adenovirus

Un adenovirus è costituito da un acido nucleico circondato da un rivestimento proteico, chiamato capside. Il capside virale è composto da un gran numero di catene polipeptidiche disposte simmetricamente [Benihoud *et al.*, 1999]. Questo rivestimento svolge due importanti funzioni:

- Protegge il genoma virale;
- Riconosce ed interagisce con la cellula ospite.

Il virus, inoltre, deve riuscire a sopravvivere all'ambiente extra cellulare e deve possedere anche l'abilità di alterare la propria conformazione in modo che, al momento opportuno, possa rilasciare il genoma all'interno della cellula ospite. Nel caso di adenovirus il diametro del capside, di simmetria icosaedrica, è di 70-90 nm.

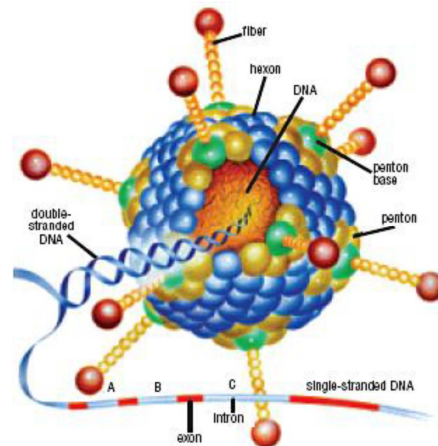


Figura 1.2 Struttura di un adenovirus [Benihoud *et al.*, 1999].

Come si può notare dalla Figura 1.2, il capside presenta 252 capsomeri, quelli disposti ai vertici dell'icosaedro (pentoni) presentano una o due proiezioni filamentose rigide (fibre) in cui risiedono i principali antigeni tipo specifici, mentre gli altri capsomeri (esoni) sono la sede degli antigeni comuni di genere. Le dimensioni ne fanno i più grandi virus privi di involucro. Le loro dimensioni rendono possibile l'entrata all'interno delle cellule bersaglio attraverso i pori, senza dover ricorrere alla fusione degli involucri. Il genoma invece è formato da una molecola di DNA a doppia elica lineare di 36-46 kbp.

Il vantaggio nell'utilizzo di adenovirus, nel caso delle infezioni, deriva dall'espressione dei transgeni con una bassissima frequenza di integrazione nel genoma ospite. Tuttavia

l'inconveniente del *gene delivery* tramite adenovirus è la diluizione del gene virale dovuta alla duplicazione delle cellule e perciò l'espressione genica non è consistente e non persiste per un tempo sufficientemente lungo. Nonostante questo svantaggio, per evitare l'insorgere di teratomi, ci si è concentrati sull'utilizzo di adenovirus per il processo di riprogrammazione cellulare. Una prova che giustifica questa scelta la si trova nel lavoro di Zhou et al, il quale ha generato cellule iPS da fibroblasti umani usando vettori adenovirali che hanno permesso alle cellule di esprimere Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc seppure con una bassa efficienza di riprogrammazione [Zhou et al., 2009]. In contrasto, un aspetto positivo che è emerso dallo studio riguarda un più alto livello di espressione genica raggiunta con vettori adenovirali piuttosto che retrovirali.

1.4 Il processo di infezione virale ed i meccanismi di riprogrammazione

L'ottenimento di cellule iPS tramite infezione virale passa per le seguenti fasi [Carter et al., 2007]:

- Trasporto dei virus nel medium ed adsorbimento sulle cellule;
- Trasporto del DNA virale dal suo capsido al nucleo della cellula, processo noto in letteratura come *intracellular trafficking*;
- Meccanismi di reprogramming che si distinguono in trascrizione del DNA a mRNA virale che avviene nel nucleo cellulare tramite l'RNA polimerasi, traduzione dell'mRNA a proteina (che corrispondono ai specifici fattori di trascrizione esogeni) grazie ai ribosomi presenti nel citoplasma;
- Traslocazione nel nucleo da parte dei fattori di trascrizione ai promotori dei geni target, processo noto come *DNA binding*;
- Espressione dei fattori endogeni.

Per le ragioni anticipate nel paragrafo precedente si è scelto di utilizzare adenovirus con DNA contenenti i geni che costituiscono quei fattori di trascrizione necessari per attivare il processo di riprogrammazione cellulare. Ciascuna di queste quattro fasi sono state analizzate al fine di poterle tradurre in linguaggio matematico e quindi implementare questi meccanismi biologici nel modello sviluppato.

1.4.1 Trasporto del virus dal bulk della sospensione virale alla superficie cellulare

Nella prima fase il virus viene trasportato dal bulk della sospensione virale fino a giungere sulla superficie cellulare. Il contatto iniziale tra virus e cellula è il risultato di collisioni casuali. È necessario che una proteina presente sulla superficie del virione collida con una

struttura complementare (recettore) presente sulla membrana cellulare. Un virus può, quindi, stabilire un rapporto solo con quelle cellule che possiedono sulla superficie dei recettori idonei a reagire con gli antirecettori presenti sulla superficie del virione. L'interazione tra virus e cellula è di tipo stereochimico e richiede un ambiente sufficientemente ricco di ioni in grado di neutralizzare le cariche di superficie delle strutture complementari in modo da ridurre la repulsione elettrostatica. I recettori sono localizzati sulla superficie cellulare e sono circa 104-105 per singola cellula. La presenza dei recettori determina il "tropismo" per specifici tipi cellulari, come la specificità d'organo e d'ospite. Gli antirecettori sono invece situati sulla superficie virale. Essi sono costituiti in linea di massima da glicoproteine nei virus con envelope, da proteine semplici nei virus nudi e sono rappresentati da strutture non ben evidenti. Alcuni virus sono in grado di legarsi al recettore di molteplici tipi di cellule, mentre altri possono accoppiarsi solo al recettore di un gruppo limitato di cellule. L'adsorbimento è irreversibile e determina un cambiamento nella morfologia strutturale del virus che generalmente fa perdere al capsido le proprietà di involucro protettivo. Il processo di adsorbimento richiede solo una partecipazione passiva della cellula e si verifica anche a basse temperature (4°C), a differenza di quanto avviene per il processo di penetrazione per il quale è necessario un intervento attivo della cellula e temperature ottimali. Le forze che legano il virus al recettore cellulare sono rappresentate da legami idrogeno, attrazioni ioniche e forze di Van der Waals. Il virione, inizialmente, è legato debolmente ad una cellula tramite uno o pochi recettori. In questo stadio, l'interazione può essere considerata reversibile ed il virione potrebbe distaccarsi. Se ciò non si verifica, vi è la possibilità che più siti di ancoraggio possano legarsi ad un numero maggiore di recettori. Per un numero di legami molto elevato, l'adsorbimento diventa praticamente irreversibile.

1.4.2 Trafficking intracellulare

La penetrazione del virus all'interno della cellula si verifica quasi istantaneamente dopo l'attacco del recettore. L'entrata del virus avviene per endocitosi, ovvero l'adesione del virus alla membrana citoplasmatica comporta la formazione di un vacuolo tramite il quale il virus è trasportato all'interno della cellula. Il virus nell'endosoma mostra un trasporto bidirezionale lungo i microtubuli [Nielsen *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 2003]. Successivamente il virus impiega un meccanismo di attivazione di abbassamento del pH per rompere la membrana endosomale ed andare quindi nel citoplasma. Il virus raggiunge il nucleo cellulare grazie ai microtubuli: questi sono dei composti del citoscheletro, provvedono al supporto di vari componenti cellulari ed effettuano il trasporto di materiali in alcuni punti particolari della cellula. Dopo di che il virus si attacca al complesso dei pori nucleari e si disassembla rilasciando il DNA virale all'interno del nucleo. La Figura 1.3 riassume le fasi dell'intracellular trafficking.

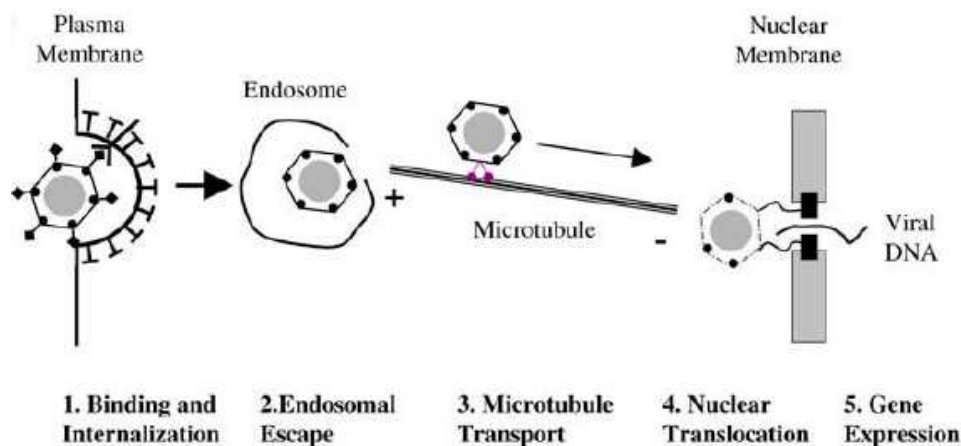


Figura 1.3 Percorso di gene delivery [Dinh et al., 2005].

1.4.3 Meccanismi di riprogrammazione

Quando il DNA virale si trova nel nucleo della cellula ospite, avviene la trascrizione ad opera del RNA polimerasi, quest'ultima si lega al promotore del gene virale e vengono sintetizzate le sequenze di nucleotidi caratteristiche del gene che viene così trascritto in mRNA. Le catene di mRNA vengono trasferite nel citoplasma dove avviene la traduzione nelle rispettive proteine grazie ai ribosomi. In riferimento alla riprogrammazione cellulare i suddetti meccanismi si devono verificare per i quattro tipi di virus che contengono quei geni che codificano i fattori di trascrizione necessari per attuare la fase di remodeling per arrivare infine allo stato di staminale. Le cellule dovranno esprimere Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc e a questo punto avviene la traslocazione nel nucleo tenendo conto di effetti cooperativi come la formazione, da parte di alcuni dei quattro fattori di trascrizione, di etero-polimeri [Chen et al., 2008]. Con questo processo una cellula, esprimendo nel citoplasma i fattori di trascrizione esogeni, attiva tutti quei processi complessi di *remodeling* fino ad ottenere l'espressione dei fattori di trascrizione endogeni, che caratterizzano lo stato staminale.

1.4.4 Rapporti stechiometrici fra i quattro fattori

Negli anni successivi alla pubblicazione del lavoro del gruppo del Dr. Yamanaka si sono svolti degli studi per analizzare sia la durata temporale di espressione dei quattro fattori di trascrizione sia la loro quantità stechiometrica con la quale devono essere presenti nella cellula durante l'induzione allo stato staminale. Quest'ultimo aspetto incide molto sull'efficienza dell'intero processo di riprogrammazione (definita come il potenziale di una cellula di generare una cellula figlia iPS) che allo stato attuale raggiunge un range che va da 0.02% a 0.002% [Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007; Maherali et al., 2008]. In particolare uno studio condotto dal gruppo di Papapetrou e Tomishima mostrò che l'espressione dei 4

fattori di trascrizione secondo un'ottima stechiometria è critica per una riprogrammazione cellulare efficiente [Paparetrou, Tomishima et al., 2009]. Gli autori monitorando l'efficienza di riprogrammazione hanno eseguito infezioni virali partendo da una proporzione dei quattro fattori di 1:1:1:1 ed andando a variare la quantità di uno dei quattro mantenendo costanti gli altri tre. Lo studio ha riportato che il relativo aumento dell'espressione di Oct4 migliora l'efficienza di riprogrammazione, mentre il relativo aumento di Sox2, Klf4 o c-Myc produce un consistente peggioramento dell'efficienza, come si può notare dalla Figura 1.4; inoltre lo stesso effetto lo si ottiene con una relativa diminuzione dell'espressione di Oct4, come mostra la Figura 1.4.

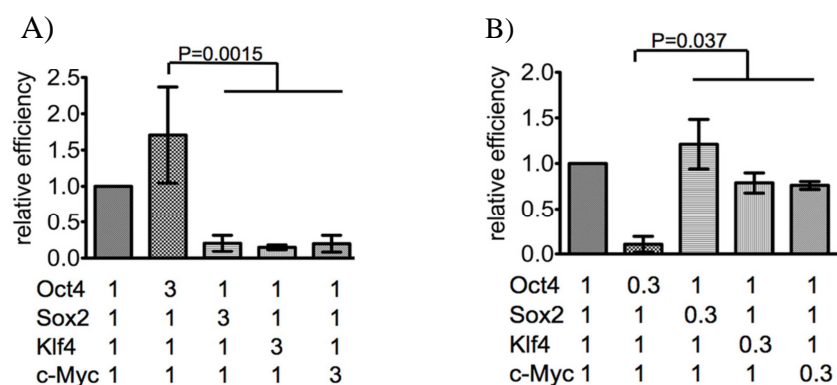


Figura 1.4 A) Effetto dell'aumento relativo di ciascuno dei quattro fattori; B) effetto di una diminuzione [Paparetrou et al., 2009].

Questi dati mostrano che molte deviazioni dalla stechiometria 1:1:1:1 producono un effetto sfavorevole per l'efficienza di riprogrammazione fatto eccezione per il relativo aumento di Oct4. In particolare la quantità dell'espressione di Oct4 si è rivelato critico nelle cellule staminali embrionali [Niwa et al., 2000]. Concentrandosi sull'effetto del livello di espressione di Oct4, gli autori hanno potuto notare che aumentando questo fattore di 3 volte si ottimizza l'efficienza di riprogrammazione, come si nota dalla Figura 1.5:

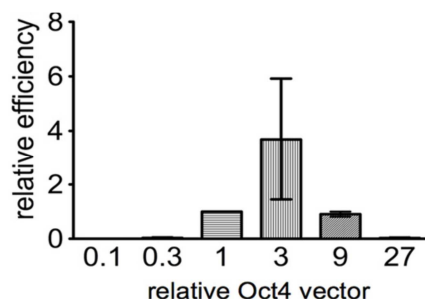


Figura 1.5 Effetto della quantità relativa del vettore virale Oct4 (ascissa) sull'efficienza di riprogrammazione (ordinata) [Paparetrou et al., 2009].

Perciò il rapporto stechiometrico, con il quale eseguire le infezioni virali con i vettori Oct4 Sox2 Klf4 e c-Myc, più utilizzato in letteratura è 3:1:1:1.

1.5 Tecnologia microfluidica

La tecnologia microfluidica si basa sulla progettazione di sistemi fluidici miniaturizzati che permettono di trattare volumi di fluido su scala micrometrica. Questo è reso possibile grazie alla realizzazione di microcanali aventi volume che varia generalmente tra le decine e le centinaia di microlitri. Questi dispositivi vengono realizzati tramite particolari tecniche di microfabbricazione come la soft litografia (§ 2.1). I sistemi microfluidici consentono di lavorare con quantità di reagente estremamente limitate, bassi tempi di reazione e la possibilità di effettuare operazioni in parallelo. Per questi motivi questa tecnologia è particolarmente apprezzata in campo biologico [Beebe *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007].

1.5.1 La microfluidica in campo biologico

Il concetto che sta alla base delle applicazioni biologiche nei sistemi microfluidici è noto in letteratura con il termine di “*lab-on-a-chip*”, ovvero l’incorporazione di aspetti multipli di laboratori biologici moderni in un singolo chip di dimensioni molto limitate. Grazie alla microfluidica è possibile studiare con grande risoluzione sistemi multicellulari ed a singola cellula permettendo un controllo localizzato delle condizioni sperimentali all’interno del sistema [Breslauer *et al.*, 2006].

Le piattaforme microfluidiche si prestano bene allo studio di risposte dinamiche di un sistema biologico in relazione ad un determinato input fornito dall’esterno, per mezzo dell’applicazione di stimoli altamente specifici ed all’isolamento della risposta alla perturbazione. Tutto questo permette una modellazione efficace di un sistema dinamico biologico. Il motivo principale che ha spinto l’utilizzo della microfluidica per lo scopo di questa tesi riguarda la coltivazione cellulare nei microcanali che permette una efficace interazione delle cellule con la sospensione virale. Un altro aspetto importante è la possibilità di una completa automatizzazione delle condizioni operative di flusso, per esempio impiegando sistemi robotizzati di *liquid handling*. Tale vantaggio non si avrebbe con le colture in statica.

1.5.2 Fisica della microscala

Oltre ai vantaggi descritti dovuti alla miniaturizzazione, il maggior potenziale deriva dalla fisica che governa la microscala. In presenza di dimensioni caratteristiche micrometriche l’effetto delle forze viscosive governa il trasporto di materia. Il moto dei fluidi nei condotti microfluidici avviene in regime laminare con un numero di Reynolds inferiore a 2100. Il

vantaggio del comportamento fluidodinamico in regime laminare è quello di poter prevedere il profilo di velocità secondo un approccio analitico, senza ricorrere ai modelli di simulazione di turbolenza che vengono impiegati nella caratterizzazione del regime di moto nei condotti fluidici tradizionali. Infatti nel sistema microfluidico l'intero campo di moto si può determinare risolvendo le equazioni di Navier-Stokes (§ 2.2.1). Un altro vantaggio che deriva dall'impiego della piccola scala è l'aumento significativo della superficie specifica dei microcanali, il che comporta una diffusione più rapida verso le pareti e quindi un miglior scambio di massa nel caso di pareti permeabili come quelle di matrice siliconica, materiale più utilizzato nella fabbricazione di microchip. Un'applicazione importante della fisica della microscala alla biologia deriva dalla possibilità di costruire gradienti chimici, che rappresentano la forza motrice del trasporto di materia, con una risoluzione a livello cellulare, permettendo quindi un trattamento molto specifico.

1.6 Modelli matematici

Grazie al modello sviluppato in questo lavoro di tesi si è tradotto in linguaggio matematico il comportamento cellulare a partire dall'infezione virale in modo tale da simulare il processo che porta all'ottenimento di cellule staminali. L'efficacia del modello viene valutata confrontando la risposta fornita dal modello con quella effettiva, osservata sperimentalmente. I modelli matematici vengono suddivisi in due classi: modello deterministico e modello stocastico.

1.6.1 Modelli deterministici

I modelli deterministici sono caratterizzati da un sistema di equazioni differenziali ordinarie (ODE) o parziali (PDE). A partire dalle condizioni iniziali, il set di equazioni può predire il comportamento del sistema e il modello evolve verso un'unica soluzione.

Nel 1959 Valentine e Allison furono i primi a proporre in letteratura un modello deterministico con l'intento di studiare il processo di infezione virale affrontando la dinamica dell'adsorbimento di virus su particelle non biologiche [Galdiero, 1979; Defer et al., 1990]. Gli autori proposero un modello basato sulla diffusione del virus in un film sferico stagnante intorno ad una particella, considerando, come condizioni al contorno sulla superficie una concentrazione nulla, implicando di fatto un adsorbimento trattato come se fosse una reazione irreversibile ed istantanea. Negli anni seguenti vennero condotti ulteriori prove per confutare il modello, così vennero apportate delle modifiche per migliorare la predizione in termini di velocità di adsorbimento. Si introdusse un fattore di correzione noto come efficienza di collisione [Chilakuru et al., 1991]. L'aspetto del modello proposto da Valentine e Allison preso più in considerazione è il contatto virus cellula che gli autori hanno semplificato con un

processo controllato dalla diffusione, effettuando però ulteriori modifiche con l'inserimento di parametri correttivi, tenendo conto della formazione di aggregati cellulari a all'interazione virus-recettore.

Nel 1990 furono proposti ulteriori modelli che includevano non solo meccanismi di formazione dei legami virus-recettori ma anche l'adsorbimento non specifico del virus sulla superficie cellulare [Wickham *et al.*, 1990]. Inoltre altri modelli descrivono il meccanismo di attacco del virus sulla superficie cellulare basato su dinamiche browniane [English *et al.* 2004]. Tutti questi tipi di modelli sono sofisticati e complessi e centrati principalmente sulla fase di adsorbimento del virus, trascurando quella relativa alla diffusione dei virus nella sospensione. Per di più, come anticipato, il processo di infezione virale assume dinamiche completamente diverse nel caso di dominio extracellulare ed intracellulare ed i modelli presenti in letteratura descrivono solo l'una o l'altra parte. Dato che i processi nei due domini sono governati da fenomeni diversi, ne consegue che la modellazione dovrà basarsi su differenti aspetti: nel dominio extracellulare il moto dei virus ed il relativo adsorbimento è governato dalla diffusione, mentre nel dominio intracellulare il grado di dettaglio è diverso. Infatti si hanno sia modelli che descrivono i meccanismi dell'*intracellular trafficking* [Endy *et al.* 1997] sia modelli che considerano l'espressione delle proteine virali passando per le varie fasi che costituiscono le sintesi proteica [Zhadanov *et al.*, 2009].

1.6.2 Modelli stocastici

In generale un modello stocastico consiste nel calcolare la probabilità che, in un intervallo di tempo stabilito, si verifichi il processo. Un'infezione virale ha inizio quando una singola particella di virus è in grado di trasmettere il proprio genoma alla cellula ospite. In questi termini la natura stocastica del processo sviluppa dinamiche significativamente diverse da quelle previste dal modello deterministico. La natura discreta delle interazioni virus cellula rende il processo di infezione virale *intrinsecamente stocastico*. Infatti queste interazioni avvengono tra quantità discrete in determinati istanti di tempo, generando così delle fluttuazioni casuali.

Per questo motivo il modello matematico sviluppato in questa tesi è di tipo stocastico.

In questa tesi la diffusione del virus dal bulk della sospensione virale verso la superficie cellulare e la fase di trascrizione di DNA virale a mRNA sono descritti in modo stocastico, mentre la sintesi dei quattro fattori di trascrizione e la loro traslocazione sono trattati mediante ODE.

1.6.2.1 Moto browniano

Il moto browniano è un fenomeno puramente stocastico che caratterizza il moto casuale con cui le particelle sospese in un fluido si muovono. Albert Einstein, nel 1905, diede una

formulazione matematica del fenomeno secondo la quale le molecole di un fluido, sottoposte ad agitazione termica, provocano il moto casuale di un corpo che si trova immerso. Inoltre queste fluttuazioni influenzano tanto più un corpo quanto minore è la sua dimensione. Secondo questa teoria, applicando questo concetto al moto delle particelle virali, il loro movimento è dovuto al continuo bombardamento ad opera delle molecole del fluido in cui esse si circondano (acqua) che sono in continuo movimento per agitazione termica. In media questo tipo di bombardamento è isotropo, cioè uguale in tutte le direzioni e una particella soggetta a moto browniano subisce circa 10^{21} collisioni al secondo. Pertanto non è possibile analizzare il suo moto in modo dettagliato utilizzando le leggi della meccanica classica. Einstein studiò il comportamento medio di una particella sottoposta all'azione degli urti molecolari ed alla viscosità del fluido, considerando un modello mono dimensionale, con la seguente equazione (in cui con $\rho(x,t)$ è indicata la densità delle particelle browniane nel punto x e al tempo t):

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} \quad (1.1)$$

dove D è il coefficiente di diffusione e se al tempo $t=0$, le particelle sono tutte collocate nell'origine, la soluzione analitica della (1.1) è pari a

$$\rho(x,t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad (1.2)$$

Secondo questo approccio analizzando la distanza percorsa da una particella, che si muove di moto browniano, si trova che è proporzionale alla radice quadra dell'intervallo di tempo in cui è avvenuto lo spostamento [Khalid et al., 2010]:

$$\Delta x = \sqrt{2D\Delta t} \quad (1.3)$$

Per intervalli di tempo più piccoli rispetto quelli calcolati dalla (1.3) il moto può essere descritto come un processo diffusivo caratteristico del moto browniano, essendo su scala temporale molto maggiore di Δt . Ogni singolo urto da solo è in grado di produrre una minima variazione di velocità che viene subito quasi compensata da altre variazioni dello stesso segno e segno opposto, che sono completamente scorrelate dalla traiettoria degli istanti di tempo precedenti.

1.6.3 Modelli stocastici di ingresso del virus nella cellula

La dinamica della diffusione dei virus durante l'infezione virale riflette un accoppiamento di processi fisici e biologici. Mentre i primi includono il trasporto della progenie dei virus dalle cellule infette ad altre sensibili, dove hanno luogo nuove infezioni, i secondi comprendono la cinetica dei virus nelle cellule infettate. Anekal e colleghi hanno proposto un modello in grado di descrivere adeguatamente la fase di diffusione che caratterizza il processo di

infezione virale [Anekal et al., 2009]. Questo processo assume un aspetto assimilabile alla forma di una cometa (Figura 1.6).

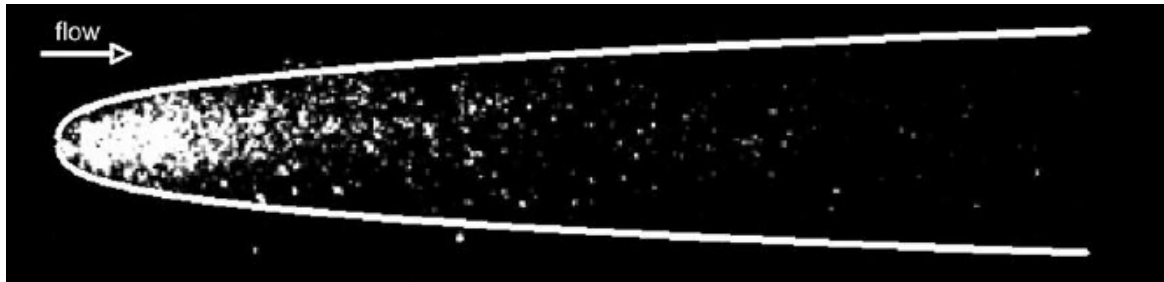


Figura 1.6 Forma assimilabile al processo di infezione virale [Anekal et al., 2009].

Gli autori hanno proposto un modello continuo e uno discreto che evidenziano i parametri ed i gruppi adimensionali che governano il processo. Nel modello continuo è stata valutata la fase di trasporto e di reazione con particolare attenzione a quello che succede nello strato cellulare e nel flusso che insiste al di sopra della superficie cellulare. Per la descrizione del modello si è impiegato un sistema di coordinate cartesiane dove l'asse di flusso è allineato con l'asse delle x mentre il monostrato cellula-ospite è definito dal piano xz , come è rappresentato in Figura 1.7.

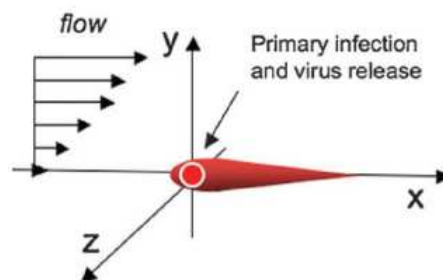


Figura 1.7 Sistema di coordinate cartesiane in cui il virus è rilasciato nell'origine e trasportato dal flusso [Anekal et al., 2009].

I fenomeni chiave sono:

- Il trasporto del virus nel fluido;
- Il legame del virus alla superficie cellulare;
- La diffusione del virus negli interstizi della superficie cellulare;
- L'entrata del virus all'interno della cellula ospite;
- La crescita ed il rilascio della progenie virale nello strato cellulare.

Nella fase di modellazione il gruppo di Anekal ha considerato la superficie cellulare come uno strato omogeneo, dove il virus diffonde (con un coefficiente di diffusività D_{vc}), mentre la cellula rimane adesa al substrato. Inoltre si è trascurata la crescita della cellula, considerando

un'efficienza di infezione cellulare pari al 90%. La cinetica del processo d'infezione virale è stata descritta dal gruppo di Anekal impiegando il seguente schema cinetico:



dove V_c rappresenta la concentrazione libera di virus, C , I e D rappresentano rispettivamente la concentrazione di cellule ospiti non infettate, infettate e morte; infine k_1 e k_2 sono le costanti di velocità delle due reazioni elementari e Y è la progenie virale prodotta da ogni cellula ospite infetta. Nello sviluppare il modello, il gruppo di Anekal, ha assunto che il moto dei virus sia regolato esclusivamente dalla diffusione mentre le cellule da infettare sono immobili. Dal bilancio di trasporto per ogni specie con le relative cinetiche che compaiono nei termini di produzione e consumo, si individuano le seguenti equazioni:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial[V_c]}{\partial t} = D_{vc} \nabla_H^2 [V_c] - k_1[V_c][C] + k_2Y[I] \\ \frac{\partial[C]}{\partial t} = -k_1[V_c][C] \\ \frac{\partial[I]}{\partial t} = k_1[V_c][C] - k_2[I] \\ \frac{\partial[D]}{\partial t} = k_2[I] \end{array} \right. \quad (1.5)$$

dove le parentesi quadre [] indicano la concentrazione di ogni specie, D_{vc} è il coefficiente di diffusività del virus nella cellula e ∇_H^2 è l'operatore Laplaciano (un operatore differenziale del secondo ordine). Le condizioni iniziali sono:

$$\left\{ \begin{array}{l} y = 0 \rightarrow [I] = [I]_0 \\ y > 0 \rightarrow [I] = 0 \\ y = 0 \rightarrow [C] = 0 \\ y > 0 \rightarrow [C] = [C]_0 \\ y \geq 0 \rightarrow [V_c] = [D] = 0 \\ t \geq 0 \rightarrow (x \rightarrow \infty) \wedge [I] = [V_c] = [D] = 0 \wedge [C] = [C]_0 \end{array} \right. \quad (1.6)$$

Queste condizioni vengono accoppiate con l'equazione che descrive il trasporto del virus nello strato di fluido in cui i fenomeni chiave che si realizzano sono:

- Lo scambio di virus da e verso lo strato cellulare;
- Il trasporto del virus nello strato di fluido avviene per mezzo di un meccanismo diffusivo e convettivo.

Questi fenomeni vengono formalizzati nella seguente equazione del trasporto del virus in fase fluida:

$$\frac{\partial[V_f]}{\partial t} = v \nabla V_f = D_{vf} \nabla^2 [V_f] \quad (1.7)$$

dove D_{vf} è il coefficiente di diffusività del virus nello strato cellulare. Accoppiando le equazioni (1.5) e (1.7) e considerando che il flusso del virus nello strato cellulare coincide con

quello nel fluido, il gruppo di Anekal, per aver maggior specificità nell'analisi, ha modellato il flusso in microscala, considerando il flusso racchiuso all'interno di un canale rettangolare di altezza H , in cui il campo di velocità è costituito da un moto laminare con profilo parabolico caratterizzato dall'altezza del canale e dalla massima velocità del fluido. La portata di fluido nella direzione x ha un profilo di velocità lineare sopra la superficie, dato dall'espressione

$$v_x = \dot{\gamma}y \quad (1.8)$$

dove $\dot{\gamma}$ è la velocità di variazione, y è la direzione normale alla parete, come dimostra la figura:

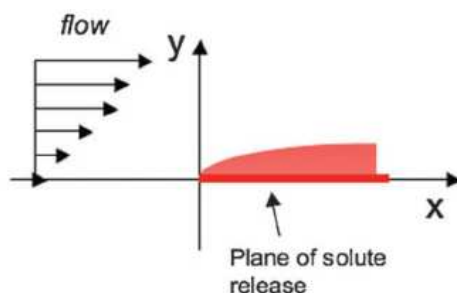


Figura 1.8 Profilo di velocità lungo l'asse x [Anekal et al., 2009].

Per $x < 0$ la superficie non contiene virus, mentre per $x > 0$ si ha una rapida dissoluzione dalla superficie al fluido, così che la condizione al contorno sulla concentrazione a $y = 0$ e $x > 0$ è $[C]=1$. Calcolando il numero di Peclet, definito come $Pe = v_{\max} H / D_{vf}$, il gruppo di Anekal ottenne un valore pari a 40, il che significa che le particelle di virus vengono trasportate sul substrato cellulare (per $y = 0$) prevalentemente per mezzo di fenomeni convettivi prima che loro possano diffondere alla distanza H . Le comete osservate sperimentalmente da Anekal e colleghi hanno mostrato che il trasporto e l'infezione da parte di entità discrete hanno un impatto sulla struttura della cometa. In particolare, la sua granulosità, visibile in figura, è determinata da singole particelle di virus durante la fase di flusso, di diffusione e d'infezione. La stocasticità associata a questi processi è individuata, sostituendo le equazioni di trasporto che descrivono il moto di particelle virali con appropriate equazioni differenziali stocastiche (equazioni di Langevin). Le particelle del virus sono considerate come entità piccole, rigide e diluite in una sospensione, in modo tale che i virus non influenzino il campo di moto del fluido. Il movimento delle particelle nella sospensione è descritto tramite l'equazione di Langevin:

$$\bar{x}(t + \Delta t) = \bar{x}(t) + \bar{k} \cdot \bar{x}(t) \Delta t + \bar{\xi}(\Delta t) \quad (1.9)$$

dove \bar{k} è il tensore della velocità di deformazione (se si considera un moto lungo le tre direzioni); in un simple shear il tensore \bar{k} ha come unico componente non nullo $k_{xy} = \dot{\gamma} = v_{\max} / H$.

Il moto Browniano è descritto dalle seguenti proprietà statistiche:

$$\begin{aligned}\langle \bar{\xi} \rangle &= 0 \\ \langle \bar{\xi\xi} \rangle &= 2D_{vf}\Delta t \bar{I}\end{aligned}\tag{1.10}$$

dove le parentesi $\langle \cdot \rangle$ indicano l'operatore media e il coefficiente di diffusione D_{vf} è dato dalla relazione di Stokes-Einstein:

$$D_{vf} = \frac{k_B T}{6\pi\mu a}\tag{1.11}$$

dove k_B è la costante di Boltzmann, μ è la viscosità del fluido e a è il raggio della particella di virus. Per modellare il processo di adesione, Anekal assunse che ogni particella sia sottoposta ad un adsorbimento secondo una cinetica del primo ordine, sul piano $y=0$. Indicando con c_w la concentrazione o, equivalentemente, la densità di probabilità che la particella venga adsorbita alla parete si ottiene così l'equazione 1.12:

$$-\frac{dc_w}{dt} = k_{cap}c_w\tag{1.12}$$

dove k_{cap} è la costante della velocità di reazione superficiale del primo ordine. La simulazione è venne realizzata modellando la probabilità di adsorbimento come un processo di Poisson. In particolare, gli autori considerarono che tutte le particelle che al tempo t si trovano a distanza minore di a dalla superficie cellulare possano essere soggette all'adsorbimento. La probabilità che una tale particella venga adsorbita tra il tempo t e il tempo $t+\Delta t$ è:

$$p_{cap} = 1 - e^{-k_{cap}\Delta t}\tag{1.13}$$

Così in ciascun intervallo di tempo, quelle particelle che si trovano ad una distanza inferiore ad a vengono rimosse dalla simulazione secondo la probabilità p_{cap} . Inoltre Anekal considerò intervalli di tempo più piccoli rispetto al tempo caratteristico di diffusione, indicato con H^2/D_{vf} , andando a definire un numero di Damkohler, $Da \ll 1$ in cui la cinetica di adsorbimento fosse lo stadio limitante dell'intero processo:

$$Da = \frac{k}{\sqrt{D_{vf}\dot{\gamma}}}\tag{1.14}$$

dove k è la costante di velocità macroscopica ed è correlata a k_{cap} dalla

$$k = k_{cap}a\tag{1.15}$$

Se si ottiene $Da \ll 1$, lo stadio limitante dell'intero processo è la cinetica di adsorbimento. La frazione di particelle virali adsorbiti in certi tempi è funzione solo del numero di Da e quindi del termine $k_{cap}t$. Per grandi valori di k , le particelle diffondono secondo una traiettoria circolare, il cui raggio di curvatura aumenta man mano che diminuisce k , ovvero al diminuire del numero di Da . Per valori di Da dell'ordine di 10^4 , le particelle virali adsorbite cambiano forma, cambia il tipo di cometa e la sua lunghezza aumenta lungo la direzione assiale x al diminuire di k . Il gruppo di Anekal arrivò ad affermare che la geometria della cometa dipende solo dal numero adimensionale di Damkohler.

1.6.4 Modelli stocastici di espressione genica

L'espressione genica è la produzione di macromolecole da una sequenza di DNA. La macromolecola può essere o una proteina o molecola di RNA che non è stata tradotta in proteina. Il processo di espressione genica comporta sempre la trascrizione e può includere l'elaborazione di mRNA (eucarioti), traduzione in proteine, e ulteriori modifiche post-traduzionali delle proteine. Ad ogni passo sequenziale si ha la possibilità che il processo di espressione genica possa essere modificato in molti modi. La regolazione di ciascuna di queste fasi controlla il flusso di informazioni da DNA a RNA e quindi a proteina. L'espressione genica è un processo fondamentalmente stocastico, dovuto alla casualità con cui, durante le fasi di trascrizione e di traduzione, da cellula a cellula, si hanno variazioni nel mRNA e nei livelli proteici [Koern *et al.*, 2005]. Queste variazioni dipendono sia dai parametri biofisici che regolano l'espressione genica, sia dalla struttura dei geni. Un processo stocastico coinvolge un fattore che non può essere previsto e quindi è meglio descritto come una distribuzione di probabilità piuttosto che come un valore definito. L'espressione genica stocastica è quindi l'espressione di una macromolecola da una sequenza di DNA in cui il processo comporta un fattore casuale, che non può essere determinato. La stocasticità nell'espressione genica è generalmente considerata come un effetto negativo sulla funzione cellulare con potenziali implicazioni per le malattie. Tuttavia, la stocasticità nell'espressione genica può anche essere vantaggiosa. È in grado di fornire la flessibilità necessaria da parte delle cellule di adattarsi ad ambienti fluttuanti o rispondere a sollecitazioni improvvise; è un meccanismo attraverso il quale l'eterogeneità della popolazione può essere stabilita durante la differenziazione cellulare e lo sviluppo.

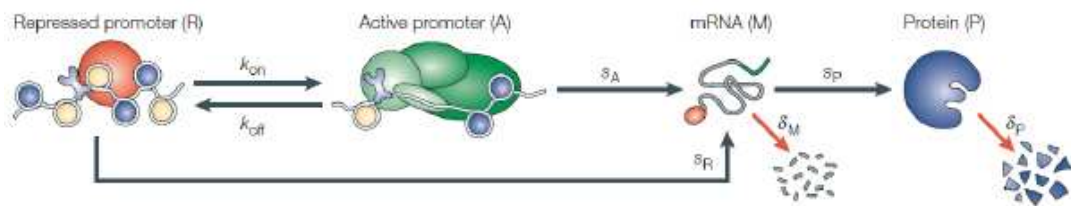


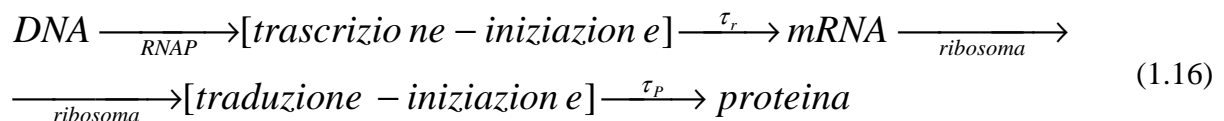
Figura 1.9 Fasi principali che intervengono nell'espressione genica [Koern *et al.*, 2005].

La Figura 1.9 illustra alcuni dei passaggi principali nell'espressione genica. Il controllo della trascrizione è mediato da fattori che si legano agli elementi promotori posti a monte o che influenzano il legame di molecole di altri elementi cis-regolatori all'interno o in prossimità del promotore. Poiché tali eventi vincolanti sono il frutto di incontri casuali tra molecole, alcune delle quali sono presenti in numero ridotto, i processi biochimici che regolano l'inizio della trascrizione sono intrinsecamente stocastici. Inoltre, i processi che portano alla sintesi e alla degradazione di molecole di mRNA e proteine sono soggetti a simili livelli di rumore. Il

modello proposto in Figura 1.9 è semplice in confronto alla reale complessità dell'espressione del gene. Le origini e le conseguenze di questi effetti sull'espressione di un singolo gene possono essere dimostrati mettendo a confronto le concentrazioni intracellulari di proteine ottenute dalle simulazioni stocastiche e deterministiche del modello proposto nella medesima figura. Le simulazioni deterministiche utilizzano equazioni che non prendono in considerazione i processi stocastici per descrivere la velocità con cui si hanno variazioni di mRNA e delle proteine. Le simulazioni stocastiche prevedono la formazione casuale e il decadimento di una singola molecola in modo esplicito. Di conseguenza, l'approccio deterministico, non è in grado di catturare gli effetti potenzialmente significativi di fattori che causano la stocasticità nell'espressione genica. Le simulazioni deterministiche del modello in Figura 1.9 prevedono concentrazioni di proteine intracellulari che sono simili a quelle previste dalle simulazioni stocastiche, solo se vengono trattati sistemi di grandi dimensioni e cinetiche estremamente veloci, ovvero delle transizioni veloci tra gli stati promotori. Gli stati dei promotori variano con una velocità molto maggiore di quella di trascrizione e possono essere considerati in stato stazionario e permettono di considerare la velocità di trascrizione costante. Queste condizioni sono soddisfatte se la concentrazione di proteina (intesa come misura globale dell'espressione genica) prevista da una simulazione stocastica oscilla con un'ampiezza molto bassa in tutto il livello medio previsto da una simulazione deterministica. Corrispondentemente, il coefficiente di variazione (cv), dato dal rapporto tra deviazione standard σ e media, deve essere molto piccolo. Quando le condizioni necessarie per un buon accordo tra simulazioni deterministiche e stocastiche non sono soddisfatte, gli effetti molecolari causati dal rumore possono essere di grandi dimensioni. Le cellule sono formate da un piccolo numero di molecole, come il DNA ed è questa molecola che dà ad ogni organismo l'identità genetica. Gli individui geneticamente identici, cresciuti in ambienti omogenei, possono essere molto diversi a causa di fluttuazioni casuali nella espressione di singoli geni. L'osservazione sperimentale che considera una variazione dei livelli di espressione genica da cellula a cellula non è certamente nuova. Nel 1957, Novick e Weiner hanno mostrato che la produzione di beta-galattosidasi in singole cellule è molto variabile e casuale. Tali studi sono stati ostacolati però dalla mancanza di affidabilità nell'analisi dell'espressione genica di una singola cellula [Novick et al., 1957]. Ko et al. hanno esaminato l'effetto di diverse dosi di glucocorticoidi per l'espressione di un glucocorticoide-sensibile in grado di codificare il transgene beta-galattosidasi e hanno scoperto una variazione da cellula a cellula nell'espressione del transgene [Ko et al., 1990]. Inoltre, aumentando la dose, si è ottenuto un aumento della frequenza di cellule visualizzate ad un elevato livello di espressione, piuttosto che un aumento uniforme di espressione in ogni cellula; ciò è dovuto ad una variazione della probabilità con cui una singola cellula può esprimere il gene ad un livello più alto. McAdams e Arkin, (1997) hanno modellato l'espressione genica utilizzando una formulazione stocastica della cinetica chimica derivata da Gillespie (1977), prevedendo che in

alcuni campi i valori assunti dalla proteina fluttuano notevolmente all'interno di ogni cellula. La loro analisi condotta per modellare la scelta tra lisi e lisogenia del fago lambda, ha dimostrato che la stocasticità dell'espressione genica potrebbe spiegare il perché alcune cellule sono attivate per via litica mentre altre seguono il percorso lisogeno.

Un altro punto da considerare è che la trascrizione non avviene in modo uniforme in tutto il genoma, ma tramite fattori di trascrizione che vengono attivati da parte di alcuni geni [Jackson *et al.*, 1993; Wansink *et al.*, 1993; Osborne *et al.*, 2004]. Sembra che un numero limitato di questi fattori (dell'ordine di centinaia) sono competenti per la trascrizione del mRNA nella cellula, così che la concorrenza di questi fattori potrebbe provocare l'espressione stocastica di un dato gene. Tim Gardner e Jim Collins, hanno fornito ulteriori dati sperimentali sulla variabilità fenotipica e la natura stocastica dell'espressione genica [Gardner, Collins *et al.*, 2000]. Dal momento che la trascrizione del gene, coinvolge molte reazioni e non può essere correttamente modellato come una reazione istantanea in un unico passaggio, è stato proposto un modello dove queste reazioni sono considerate in serie determinando le cinetiche controllanti. Questi vengono poi simulati utilizzando una versione modificata dell'algoritmo Gillespie, in grado di simulare le reazioni. L'intero processo di espressione del gene che include la trascrizione del DNA in mRNA per mezzo del RNA polimerasi (RNAP) e la successiva traduzione del mRNA nella catena proteica polipeptidica mediante l'impiego del ribosoma, può essere descritto dal seguente schema cinetico di reazione:



1.6.5 Modelli stocastici di riprogrammazione cellulare

Quantificare l'efficienza e la tempistica degli eventi che si verificano durante la riprogrammazione cellulare *in vitro* è problematico a causa dell'eterogeneità cellulare e genetica delle cellule somatiche infettate. La riprogrammazione delle cellule somatiche in cellule staminali pluripotenti avviene attraverso l'espressione di 4 fattori di trascrizione come già discusso nel paragrafo 1.2.2, ma solo una piccola frazione delle cellule contenenti i quattro fattori può progredire verso la pluripotenza. L'efficienza di riprogrammazione è dello 0,05%, ciò significa che su 2000 fibroblasti solo uno è in grado di dar vita ad una cellula pluripotente. Inoltre molte cellule ritenute pluripotenti, in realtà, subiscono un parziale processo di riprogrammazione, dovuto ad una dipendenza diretta dell'espressione continua dei transgeni dei fattori di programmazione per il loro autorinnovamento. Bassa efficienza e parziale riprogrammazione rappresentano gli ostacoli maggiori che influiscono pesantemente

nell'ottenimento delle cellule iPS. Dato che, anche dopo il controllo di valori adeguati di Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc, si hanno basse efficienze e parziali riprogrammazioni, si è indagato su questioni relative ai meccanismi di base della riprogrammazione epigenetica: come funziona il processo di riprogrammazione, cosa accade alla maggior parte delle cellule che non diventano riprogrammate nella fase di crescita cellulare continua e cosa succede durante l'espressione dei fattori di riprogrammazione. La risposta a tali domande è stata quella di considerare la riprogrammazione come un processo stocastico continuo [Hanna et al., 2009], in cui la conversione di una cellula somatica in una cellula iPS può essere pensato come una deriva dello stato delle cellule. Questo stato delle cellule può essere definito da percorsi o fluttuazioni di espressione genica o epigenetici. Queste fluttuazioni sono probabilmente dovuti all'eterogeneità della cellula o alla natura intrinseca stocastica dell'espressione genica.

Il processo di riprogrammazione può essere rappresentato dal punto di vista matematico utilizzando due differenti tipologie di modelli:

- *Modello deterministico* o anche *modello elite* in cui la riprogrammazione diretta avviene solo in un sottogruppo di cellule trasdotte in un tempo di latenza fissato, pari ad un valore costante;
- *Modello stocastico*, in cui tutte o la maggior parte delle cellule sono competenti per essere riprogrammate a cellule staminali pluripotenti indotte, sebbene ciò avviene con diversi tempi di latenza.

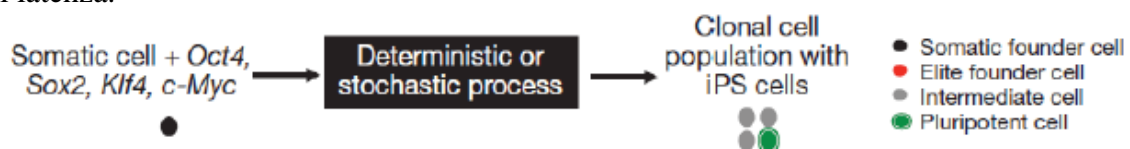


Figura 1.10 Modello di progressione allo stato pluripotente durante la diretta riprogrammazione [Hanna et al., 2009].

La latenza è il tempo assoluto o numero di divisioni della cellula a cui è sottoposta la cellula fino ad ottenere un numero cospicuo di cellule figlie iPS. Il modello deterministico presuppone che solo poche cellule sono competenti per la riprogrammazione. Questo modello può essere ulteriormente suddiviso in due categorie:

- Modello "*elite predeterminato*",
- Modello "*elite indotto*".

Nel modello predeterminato, un piccolo numero di cellule sono competenti per la riprogrammazione di trasduzione retrovirale, anche prima dei quattro fattori. Nel modello indotto, oltre ai quattro fattori, i geni dei fattori devono essere attivati o inattivati dall'integrazione virale nella cellula ospite. Perciò solo le cellule con specifici siti virali d'integrazione sono competenti per la riprogrammazione. La generazione delle cellule iPS può essere promossa dall'attivazione o inattivazione dei geni endogeni da retrovirus o

lentivirus, aumentando così la proliferazione, diminuendo l'apoptosi (morte cellulare programmata) o aumentando la riprogrammazione. Inoltre, l'espressione dei transgeni è fortemente influenzata dalla posizione dell'integrazione retrovirale, ogni cellula trasdotta ha un unico percorso d'integrazione e questo spiega perché solo una porzione molto limitata di cellule trsdotte completa il processo di riprogrammazione

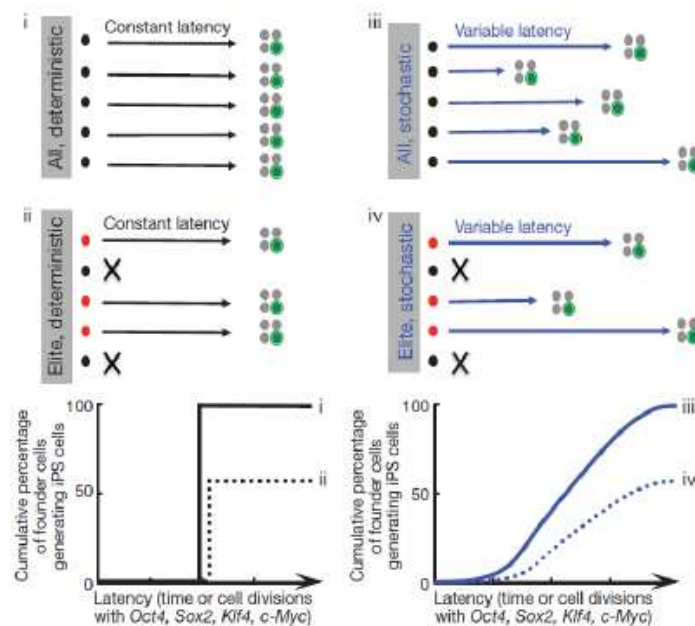


Figura 1.11 Grafici che mostrano la forma generale delle cinetiche di riprogrammazione nei diversi modelli [Hanna et al., 2009].

Nel modello stocastico, una volta introdotti i 4 fattori di trasduzione, molte cellule differenziate hanno la possibilità di diventare cellule iPS. La differenziazione delle cellule è spesso descritta (Figura 1.12) come una sfera che rotola giù verso un paesaggio epigenetico, descritto da Conrad Waddington nel 1957 [Waddington 1957]. Ogni cellula, parte dallo stato di cellula totipotente, attraversa lo stato di pluripotenza e rotola giù verso lo stato di *lineage-committed*. Le cellule pluripotenti sono in uno stato transitorio (come se fosse uno stato metastabile), sono in pendenza e non possono fermarsi e per effetto della gravità sono rapidamente differenziate in vari lineages. Le cellule staminali, invece, possono auto rinnovarsi e mantengono così la pluripotenza per lungo tempo (interpretando la figura si raggiunge una “buca di potenziale”).

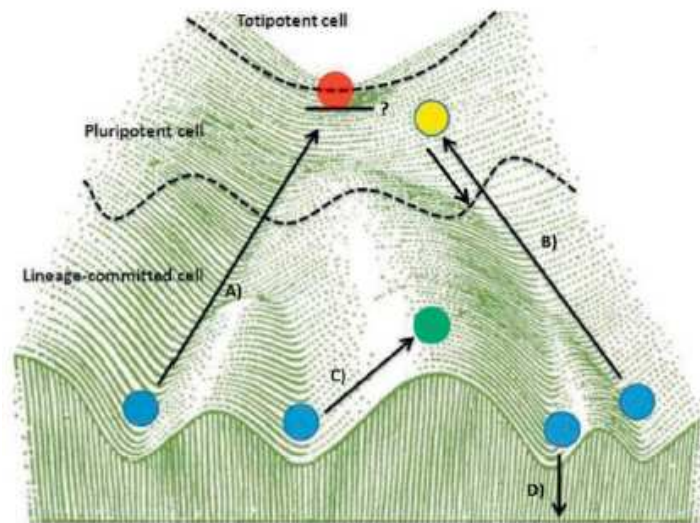


Figura 1.12 Rappresentazione schematica della differenziazione cellulare [Andrews et al., 2004].

Si ha la completa riprogrammazione se i quattro fattori sono espressi in un percorso che porti ad avere uno stimolo sufficiente nella giusta direzione e se ognuna delle cellule è intrappolata all'interno di una delle valli di cui è costituito il paesaggio epigenetico, così che loro possono rimanere nella zona di pluripotenza, anche dopo che l'espressione del transgene è scomparsa. La prima richiesta può essere raggiunta solo stocasticamente, perché le tecnologie a disposizione non consentono di controllare con precisione i livelli di espressione dei 4 transgeni. I quattro fattori di riprogrammazione non riescono da soli a creare le protuberanze epigenetiche, quindi anche la generazione delle cellule staminali pluripotente indotte richiede la presenza di eventi stocastici. Hanna et al. simulano il processo di riprogrammazione cellulare in maniera stocastica, considerando che il processo avvenga in ogni singola cellula. Per stimare la velocità intrinseca di riprogrammazione per ogni cellula, Hanna et al. hanno testato se il modello stocastico è in grado di descrivere i loro dati sperimentali. Il modello considera (Figura 1.13) la riprogrammazione delle B cellule che si verifica in uno step del processo con una costante di velocità k per ogni cellula intrinseca e $N(t)$ indica il numero di cellule in ogni pozzetto.

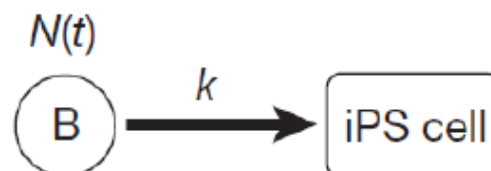


Figura 1.13 Rappresentazione del modello di riprogrammazione considerato da Hanna [Hanna et al.2009].

Il tempo di latenza è dato dalla somma del tempo necessario affinché la prima B cellula dell'intera popolazione sia riprogrammata, più il tempo di ritardo, t_p , durante il quale la

cellula figlia ha bisogno di crescere per raggiungere la soglia di rilevamento. Ad ogni istante di tempo e per ogni pozzetto, pesa la velocità alla quale si verifica il primo evento di riprogrammazione, diminuisce il numero della popolazione $N(t)$ e la distribuzione di probabilità cumulativa di riprogrammazione nel tempo è pari a:

$$P(t+t_p) \approx 1 - e^{-k\tau} \quad (1.17)$$

Dove τ è il tempo in cui la popolazione è ridimensionata:

$$\tau = \int_0^t N(t') dt' \quad (1.18)$$

Quindi la probabilità diventa:

$$P(t+t_p) \approx 1 - e^{-kN_{eff}(t-t_0)} \quad \text{per } t > t_0 \quad (1.19)$$

La velocità di divisione della cellula controlla la dimensione della popolazione, N , e perciò ridimensiona il tempo, influenzando la velocità osservata di riprogrammazione. Per esempio, se la velocità di divisione della cellula e le procedure di coltura sono modificate per avere una dimensione effettiva della popolazione pari a 1000 cellule invece che 106 cellule per pozzetto, il tempo necessario affinché più del 90% dei pozzetti sia riprogrammato dovrà essere più grande.

1.7 Obiettivo della tesi

L'obiettivo della tesi consiste nello sviluppo di un modello matematico che permetta di simulare il processo biologico della riprogrammazione cellulare tramite infezioni adenovirali transienti in chip microfluidici per la produzione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPS). Il modello è un algoritmo basato sulla traduzione in linguaggio matematico dei processi cellulari che intervengono durante la fase di riprogrammazione, descritta in dettaglio nel paragrafo 1.4. Tale algoritmo, una volta implementato in un software di calcolo numerico (MATLAB), permetterà di caratterizzare, in funzione delle condizioni operative del processo di infezione (*input*) l'espressione dei quattro fattori di trascrizione esogeni e la loro azione sui geni endogeni, che rappresentano gli *output* del modello. È in quest'ottica che il modello matematico così sviluppato funge da "laboratorio virtuale". L'ottenimento del profilo di espressione dei quattro fattori esogeni e come essi sono legati ai promotori dei geni target, serve da supporto tecnico per poter ottimizzare sperimentalmente l'espressione dei fattori di trascrizione esogeni e l'efficienza di riprogrammazione. Le condizioni operative dell'analisi sperimentale corrispondono alle variabili *input* del modello e sono: la quantità di adenovirus per cellula (variabile indicata come *MOI*, *multiplicity of infection*); i rapporti stechiometrici tra i quattro fattori di trascrizione; il numero di infezioni per garantire un livello di espressione ottimale; il tempo che intercorre tra un'infezione e l'altra necessario alla cellula per poter esprimere sia i fattori esogeni sia quelli endogeni. Si svolgerà quindi un'analisi

multi parametrica per selezionare in modo mirato le condizioni operative con cui svolgere gli esperimenti in laboratorio, i quali richiedono uno sforzo considerevole in termini di tempo e costi. I risultati che fornirà il modello serviranno quindi per caratterizzare la correlazione tra rilascio del DNA virale nella popolazione cellulare e i meccanismi che regolano la biologia intracellulare.

Questo lavoro di tesi è prevalentemente focalizzato sulla modellazione matematica del processo di riprogrammazione cellulare e sull'implementazione in MATLAB dell'algoritmo di risoluzione. Tuttavia è necessario interfacciarsi con l'analisi sperimentale in modo tale da garantire una validazione del modello.

Capitolo 2

Materiali e metodi

In riferimento allo scopo della tesi sono state condotte prove sperimentali per caratterizzare l'espressione dei fattori di trascrizione endogeni con quelli esogeni forniti dal modello matematico sviluppato. In questo capitolo vengono descritte le tecniche di analisi e la strumentazione utilizzata durante lo svolgimento delle prove.

2.1 Produzione piattaforma microfluidica

Gli esperimenti sono stati svolti su colture cellulari in canali microfluidici. La preparazione del chip microfluidico viene eseguita tramite la tecnica della soft litografia.

2.1.1 Soft litografia

La soft litografia è una tecnica di microfabbricazione utilizzata per la preparazione di piattaforme microfluidiche. Il termine “soft” deriva dall'impiego di materiali elastomerici come il polidimetilsilossano (PDMS), il polimero più utilizzato per la fabbricazione dei chip. Il PDMS viene fatto reticolare in uno stampo sulla cui superficie sono impresse strutture in rilievo che fungono da *pattern*. Questo stampo viene supportato da un wafer di silicio. Il procedimento della soft litografia è schematizzato in Figura 2.1 e può essere così riassunto:

- Produzione di una fotomaschera nella quale vi è impressa una geometria specifica;
- Deposizione su wafer di silicio pretrattato di uno strato di polimero fotosensibile il cui spessore viene controllato con precisione tramite uno *spin coater*;
- Pretrattamento termico del photoresist e successiva esposizione a radiazione UV, grazie alla quale avviene la reticolazione sulla parte trasparente della fotomaschera;
- Eliminazione con solvente delle porzioni non reticolate ed ottenimento del master;
- Trattamento del master con esadimetilsilazano (HMDS) per facilitare la successiva estrazione del PDMS reticolato stabilizzare la superficie in rilievo;
- Deposizione di una soluzione omogenea composta da monomero ed agente reticolante e successiva reticolazione per via termica;
- Rimozione dello strato di PDMS.

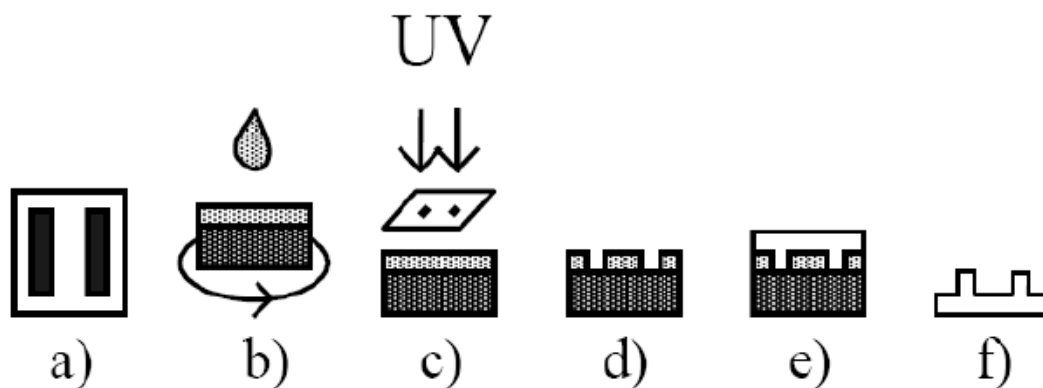


Figura 2.1 Schematizzazione dell'intero processo di soft-litografia: a) realizzazione della fotomaschera; b) deposizione del photoresist su wafer di silicio tramite spin-coate; c) esposizione a raggi UV; d) sviluppo del master con opportuno solvente, con eliminazione delle zone non reticolate; e) deposizione del PDMS liquido e successiva reticolazione; f) ottenimento dello stampo solido in PDMS.

2.1.2 Creazione del master tramite fotolitografia

Il master rigido viene ottenuto tramite un processo di microfabbricazione che si basa sulla deposizione di un *photoresist* su wafer di silicio, sul quale viene impressa la geometria desiderata. Il *photoresist* utilizzato (SU-8 2000) è una resina epossidica fotosensibile negativa fornita dalla Microchem. La ditta fornisce anche le indicazioni per tutte le fasi del processo fotolitografico.

2.1.2.1 Pretrattamento del Wafer

Si utilizza un wafer di silicio di tipo N, di diametro 5'' (125 mm). È necessario innanzitutto assicurarsi che il wafer sia perfettamente privo di umidità per non compromettere la successiva adesione del *photoresist*. Il wafer viene posto in forno (Heraeus) a 130°C per almeno 20-30 minuti in modo tale che tutta l'umidità eventualmente presente sulla superficie possa evaporare.

La superficie del wafer viene quindi sottoposta ad un trattamento al plasma della durata di un minuto alla pressione di circa 0.3 mbar; a tale scopo si utilizza un plasma cleaner (Harrick Plasma). Sarebbe anche consigliato trattare il wafer con un promotore di adesione, MMC Primer 80/20 composto per il 20% da esametildisilazano (HDMS) e per l'80% da Polimetil Acetato (PM Acetato): si pone il wafer nello spin coater (Laurell) fissandolo con l'ausilio di una pompa da vuoto; si deposita il promotore sul wafer in modo omogeneo lasciandolo agire per almeno 10 secondi e azionando successivamente lo *spin coater* a 3000 rpm per 20-30 secondi. Al termine dell'operazione si pone il wafer in forno a 115°C per 1-3 minuti.

È necessario evitare che il wafer venga sporcato da eventuali depositi di polvere o simili durante l'intera fase di pretrattamento.

2.1.2.2 Deposizione del photoresist

Al termine del pretrattamento si pone nuovamente il wafer sullo *spin coater* e si deposita centralmente una quantità di *photoresist* necessaria a ricoprire circa il 30% della superficie del wafer stesso, facendo attenzione ad inglobare meno aria possibile. Da questo punto in poi tutte le operazioni devono essere condotte al buio per evitare la preventiva reticolazione del polimero fotosensibile.

Il *photoresist* SU-8 2000 (Microchem) è disponibile in dodici viscosità standard, che permettono di ottenere spessori da 0.5 a più di 200 micron con un singolo processo di deposizione. Per ottenere una struttura dell'altezza di 100 micron si utilizza l'SU-8 2100, per il quale viene fornita la relazione tra lo spessore del film di polimero ottenibile e la velocità di spin. In Figura 2.2 è riportato il diagramma corrispondente, fornito dalla Microchem.

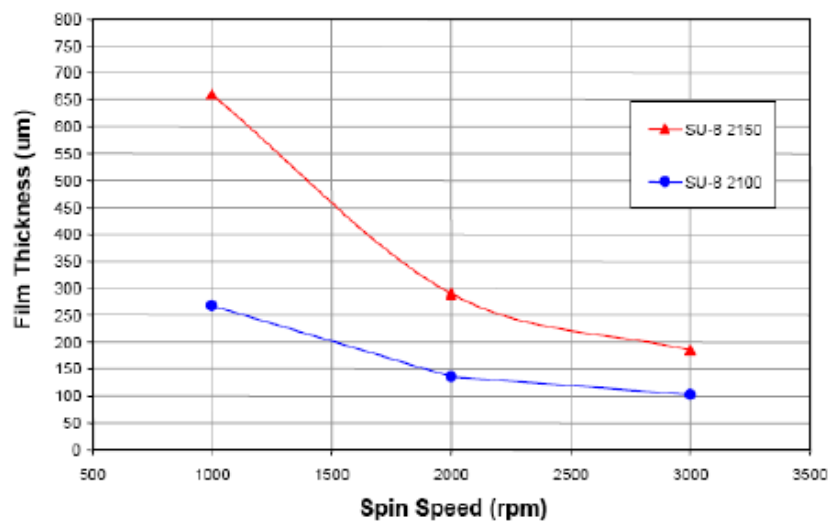


Figura 2.2 Spessori ottenibili con i fotoresist SU-8 2100 e SU-8 2150 in funzione della velocità di spin.

Per la creazione dello strato di fotoresist con spessore 100 μm si utilizza uno *spin coater* (Laurell) in cui viene impostato il seguente programma:

- 1° step: 500 rpm per 5-10 secondi con accelerazione di 100 rpm/sec;
- 2° step: 3000 rpm per 30 secondi con accelerazione di 300 rpm/sec.

2.1.2.3 Trattamento termico ed esposizione

Prima di esporre il wafer alla sorgente UV è necessario procedere ad una fase di riscaldamento su piastra (*soft-bake*) al fine di distendere le tensioni interne al materiale e far evaporare parzialmente il solvente presente al suo interno. È previsto un preriscaldamento, opzionale, a 65°C ed uno successivo a 95°C su piastra riscaldante (Falc), le cui durate dipendono dallo spessore del film depositato. In Tabella 2.1 sono riportati i tempi di precottura consigliati in funzione dello spessore finale che si desidera ottenere.

Tabella 2.1 Tempo di precottura consigliata a 65 ed a 95°C in funzione dello spessore di fotoresist.

Spessore [μm]	Tempo di precottura [min]	
	65°C	95°C
100 - 150	5	20 - 30
160 - 225	5 - 7	30 - 45
230 - 270	7	45 - 60
280 - 550	7 - 10	60 - 120

Per la fase di esposizione si utilizza una lampada a raggi UV (AOI) con lunghezza d'onda 365 nm. L'energia di esposizione E_e , da impostare prima dell'esposizione, viene fornita in base allo spessore secondo quanto riportato in Tabella 2.2.

Tabella 2.2 Energia di esposizione in funzione dello spessore di fotoresist.

Spessore [μm]	Energia di esposizione [mJ/cm ²]
100 - 150	240 - 260
160 - 225	260 - 350
230 - 270	350 - 370
280 - 550	370 - 600

Nota la potenza P della lampada è possibile determinare il tempo di esposizione t secondo la seguente formula:

$$t = \frac{E_e}{P} \quad (2.1)$$

Prima di procedere con l'esposizione è necessario adagiare la fotomaschera sul wafer in modo che, una volta esposto alle radiazioni, polimerizzi solo la zona desiderata.

2.1.2.4 Trattamento termico e sviluppo

Un secondo riscaldamento su piastra è necessario per favorire la completa reticolazione del polimero e l'evaporazione dei solventi. Anche in questo caso sono previsti due step a 65°C (facoltativo) e 95°C le cui durate dipendono dallo spessore. In Tabella 2.3 sono riportati i tempi di post-cottura consigliati, a 65 e 95°C, in funzione dello spessore di fotoresist.

Tabella 2.3 *Tempi di post-cottura consigliati, a 65 e a 95°C, in funzione dello spessore di fotoresist.*

Spessore [μm]	Tempo di precottura [min]	
	65°C	95°C
100 - 150	5	10 - 12
160 - 225	5	12 - 15
230 - 270	5	15 - 20
280 - 550	5	20 - 30

La fase di sviluppo prevede l'utilizzo di un apposito solvente per eliminare le zone non reticolate; in questo caso viene utilizzato Metossimetacrilato (Sigma). Inizialmente il wafer viene immerso in una piastra di vetro contenente il solvente e agitato di tanto in tanto. Il tempo di sviluppo dipende dallo spessore di fotoresist come riportato in Tabella 2.4; tuttavia si è notato che tempi di qualche minuto inferiori a quelli consigliati sono più che sufficienti per ottenere uno sviluppo completo.

Tabella 2.4 *Tempi di sviluppo consigliati in funzione dello spessore di fotoresist.*

Spessore [μm]	Tempo di sviluppo [min]
100 - 150	10 - 15
160 - 225	15 - 17
230 - 270	17 - 20
280 - 550	20 - 30

Per controllare lo stato dello sviluppo ed infine bloccare l'operazione si utilizza alcol isopropilico (Sigma). Il wafer viene poi lasciato asciugare a temperatura ambiente fino a che i reagenti utilizzati non sono evaporati completamente.

2.1.2.5 Trattamento chimico superficiale

Prima di procedere con la fase di produzione dello stampo in silicone, per favorire la fase di distacco dello stampo, il wafer viene trattato con qualche goccia di esametildisilazano (HDMS, Sigma) e lasciato per circa 30 minuti all'interno di una camera sottovuoto.

2.1.3 Produzione dello stampo in PDMS

La produzione dello stampo in silicone richiede tre passaggi fondamentali:

- Preparazione di una miscela liquida, composta da un prepolimero e un agente reticolante;

- Deposizione della miscela sul master rigido ottenuto tramite processo fotolitografico;
- Reticolazione del PDMS ed estrazione dello stampo.

Prima di illustrare dettagliatamente le fasi di produzione dello stampo in silicone, verranno descritte le caratteristiche principali del PDMS.

2.1.3.1 Caratteristiche fisiche del PDMS

I polidimetilsilossani hanno una combinazione unica di proprietà che deriva dalla presenza di una catena silossanica inorganica e gruppi metilici organici attaccati alla catena. Questi elastomeri si adattano bene alle superfici, anche non planari nella scala micrometrica, e su aree relativamente ampie [Xia, Whitesides 1998]. Il polidimetilsilossano, o PDMS, è caratterizzato da una bassa temperatura di transizione vetrosa e quindi è fluido a temperatura ambiente, ma può essere convertito rapidamente in solido tramite cross-linking. Lo stampo elastomerico viene preparato mediante cast molding: un prepolimero dell'elastomero viene versato su un master con impressa una struttura in rilievo sulla superficie e dopo la successiva reticolazione viene estratto. Il master viene fabbricato tramite fotolitografia. Nella seguente figura viene illustrato in modo schematico la procedura di fabbricazione di uno stampo in PDMS.

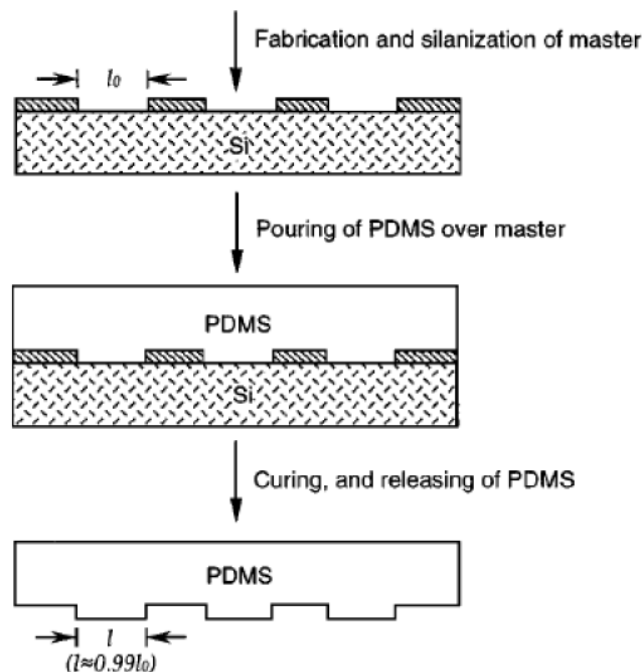


Figura 2.3 Schematizzazione del processo per l'ottenimento dello stampo in PDMS: fabbricazione del master, deposizione del PDMS liquido sul master, cottura ed estrazione.

Il PDMS elastomero più comunemente utilizzato è il Sylgard 184 (Dow Corning). Viene fornito un kit che contiene una base costituita da una gomma siliconica liquida (PDMS terminante con gruppi vinilici) ed un agente reticolante (miscela di un complesso al platino e copolimeri di metilidrossisilossano e dimetilsilossano), che vengono miscelati tra loro in un

determinato rapporto. A questo punto la miscela viene versata sul master e scaldata ad elevate temperature per ottenere un elastomero solido e cross-linkato, grazie alla reazione tra i gruppi vinilici ($\text{SiCH}=\text{CH}_2$) e idrosilanici (SiH). Il materiale così ottenuto è caratterizzato da una bassa tensione superficiale (~ 21.6 dyn/cm) e da una buona stabilità chimica, inoltre, non essendo idroscopico, non rigonfia con l'umidità; è molto permeabile ai gas, in particolare all'ossigeno e all'anidride carbonica, ed ha una buona stabilità termica (fino a circa 186°C in aria); è trasparente dal punto di vista ottico fino a 300 nm e quindi può essere trattato anche tramite raggi UV.

2.1.3.2 Produzione della piattaforma microfluidica

Una volta prodotto il master in fotoresist si passa alla solidificazione del PDMS sullo stampo. Il processo di solidificazione consiste nella reticolazione (cross-linking) del dimetilsilossano tramite un agente reticolante preparato rispettivamente in proporzione ponderale 10:1. Dopo opportuna miscelazione si passa alla degasificazione (con essiccatore) per togliere l'aria inglobata nel polimero durante l'omogeneizzazione. Successivamente la miscela di polimero e agente reticolante viene versato nel mold e dopo un'ulteriore degasificazione lo stampo viene posto in forno a 70°C per 2 ore per permettere la reticolazione. Data la consistenza ottenuta si ritaglia con un bisturi lo strato di PDMS per separarlo dal mold e si procede con la foratura per ottenere i punti di ingresso ed uscita dei microcanali. Successivamente lo strato di PDMS viene assemblato ad un vetrino tramite la tecnologia al plasma: tale tecnica permette di funzionalizzare le superfici producendo un legame chimico tra vetro e PDMS. Il vetrino ed il PDMS vengono rivolti con le superfici che andranno a contatto verso l'alto e dopo che la camera è stata sottoposta a 0,3 mbar viene attivato il plasma e mantenuto per 2 minuti cercando di stabilizzare la pressione con la valvola regolatrice. Passati due minuti la camera viene sfiatata per raggiungere la pressione atmosferica e poter attaccare le superfici. Al fine di facilitare l'adesione il chip viene posto in una piastra riscaldata a 80°C per 30 minuti. A questo punto il chip è composto da PDMS modellato secondo lo stampo, composto da fori per l'entrata e l'uscita dei microcanali e supportato da un vetrino.

Grazie alle tecniche di micro fabbricazione è possibile realizzare condotti microfluidici con dimensione caratteristica micrometrica. Per le applicazioni sperimentali di questo lavoro di tesi è stata utilizzata la piattaforma microfluidica schematizzata in Figura 2.8. Il micro canale ha una sezione rettangolare; la superficie inferiore, che funge da substrato per le cellule, è composta da vetro boro silicato, mentre quella superiore è caratterizzata da una matrice polimerica di PDMS, realizzata tramite uno stampo ottenuto con la fotolitografia. Il chip microfluidico impiegato per gli esperimenti di coltura cellulare è costituito da uno strato di PDMS di 3 mm di spessore contenente microcanali rettangolari, ottenuti dallo stampo, le cui dimensioni sono: 200 μm di altezza, 18 mm di lunghezza e 1,5 mm di larghezza. La Figura 2.4 mostra la forma e le dimensioni finali del chip microfluidico e una foto del loro

collegamento con le pompe micrometriche CAVRO che sono in grado di manipolare volumi di fluidi molto piccoli, dell'ordine dei nanolitri e per questa caratteristica sono adatte per condurre esperimenti in piattaforma microfluidica, nei cui canali sono condotte le colture cellulari. Dal momento che la durata degli esperimenti biologici è dell'ordine dei giorni, è opportuno prevedere delle riserve di medium in PDMS. Questi pozzetti vengono applicati da un lato del chip e preparati formando dei fori del diametro dei 3 mm a uno strato di PDMS di spessore di 5 mm. Ciascun pozzetto ha un volume di 25 μL e funge da riserva di medium necessaria per il mantenimento della coltura cellulare o la sospensione virale durante lo svolgimento di esperimenti di coltura cellulare.

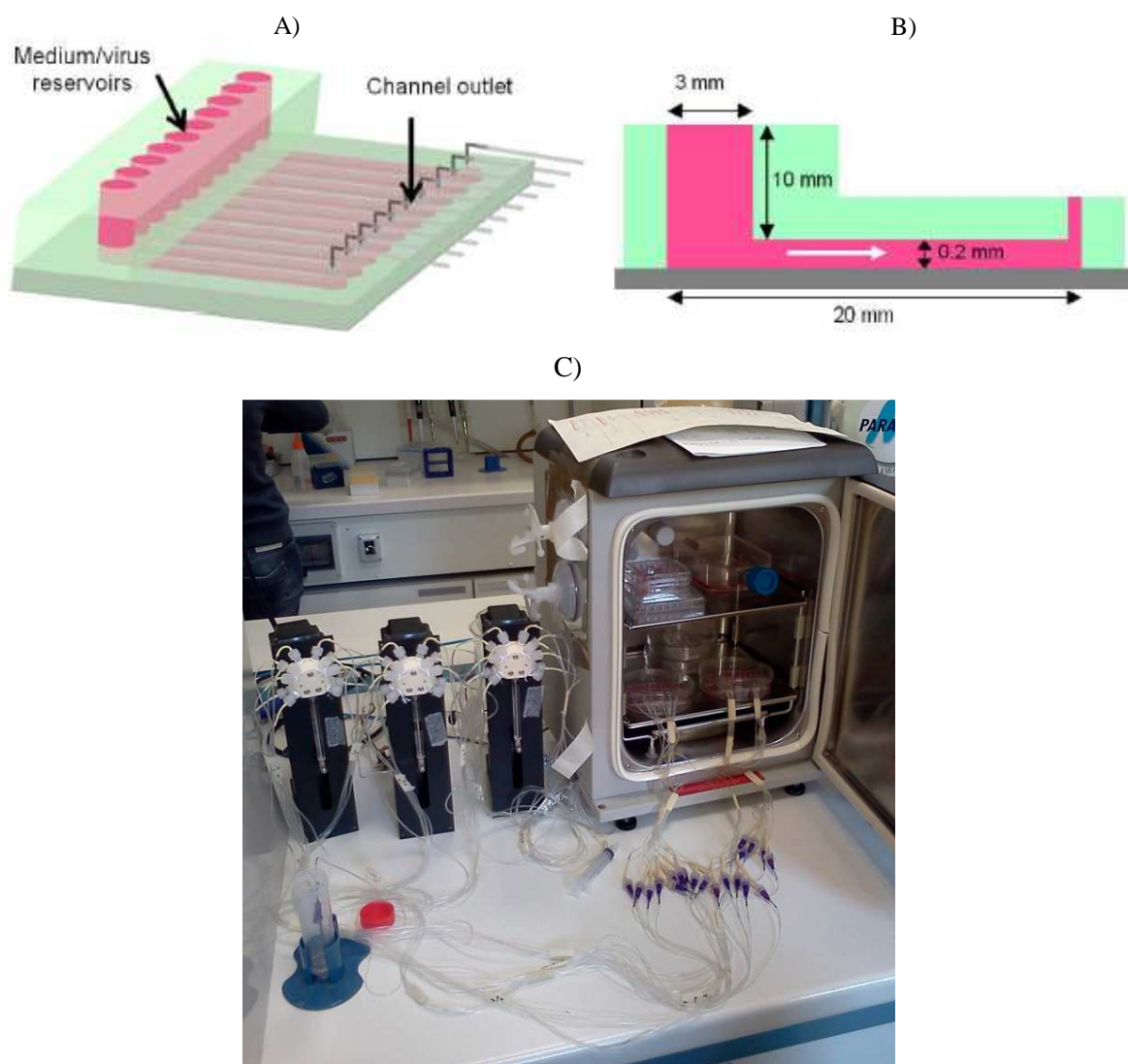


Figura 2.4 A) Forma finale del chip microfluidico (in rosa sono indicati i microcanali in parallelo con i relativi pozzetti e in verde lo strato di PDMS); B) dimensioni del chip; C) Foto dei chip microfluidici collegati alle pompe micrometriche CAVRO.

2.2 Caratterizzazione fluidodinamica

Per poter eseguire gli esperimenti in condizioni controllate è necessario studiare il comportamento fluidodinamico di un fluido all'interno della piattaforma microfluidica; in questo modo sarà possibile quantificare l'interazione tra il medium contenente gli adenovirus e le cellule adese sulla superficie inferiore del micro canale. A tale scopo in questa sezione vengono studiate la fluidodinamica nei canali della piattaforma microfluidica utilizzata e l'entità dell'evaporazione del medium durante l'esperimento, aspetto molto critico in un setup microfluidico con un elevato rapporto superficie/volume.

2.2.1 Campo di moto

A causa delle ridotte dimensioni caratteristiche (dell'ordine dei micrometri), il moto di un fluido nei microcanali avviene in regime laminare. Perciò il trasporto di quantità di moto lungo il condotto microfluidico è governato dalle forze viscosive, piuttosto che da quelle inerziali.

Un aspetto interessante che caratterizza la fisica della microscala è che il campo di moto può essere risolto analiticamente tramite le equazioni di Navier-Stokes (2.1), ottenendo perciò un profilo di velocità esatto.

$$\rho \frac{Dv}{Dt} = -\nabla p + \mu \nabla^2 v + \rho g \quad (2.1)$$

Per ottenere una soluzione univoca dell'equazione (2.1) occorre introdurre opportune condizioni al contorno: in particolare si è posta una condizione *no-slip*, secondo la quale la velocità all'interfaccia tra due fasi diverse deve essere uguale, per cui lo strato di fluido adiacente alla parete ha velocità nulla.

La risoluzione dell'equazione (2.1) è stata ottenuta tramite un software di simulazione fluidodinamica (COMSOL Multiphysics 4.2), grazie al quale è possibile ottenere soluzioni 3D e interpretare in modo più efficiente i risultati.

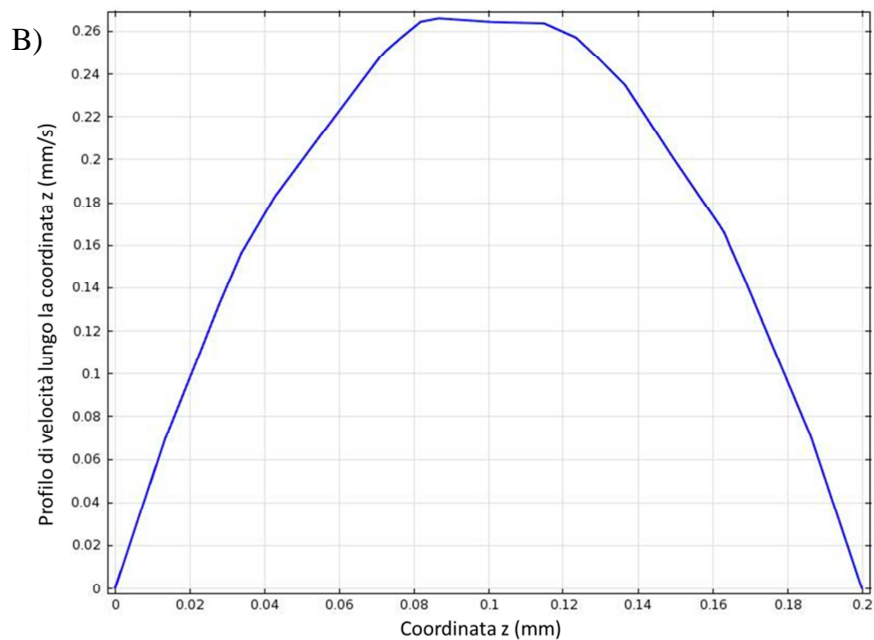
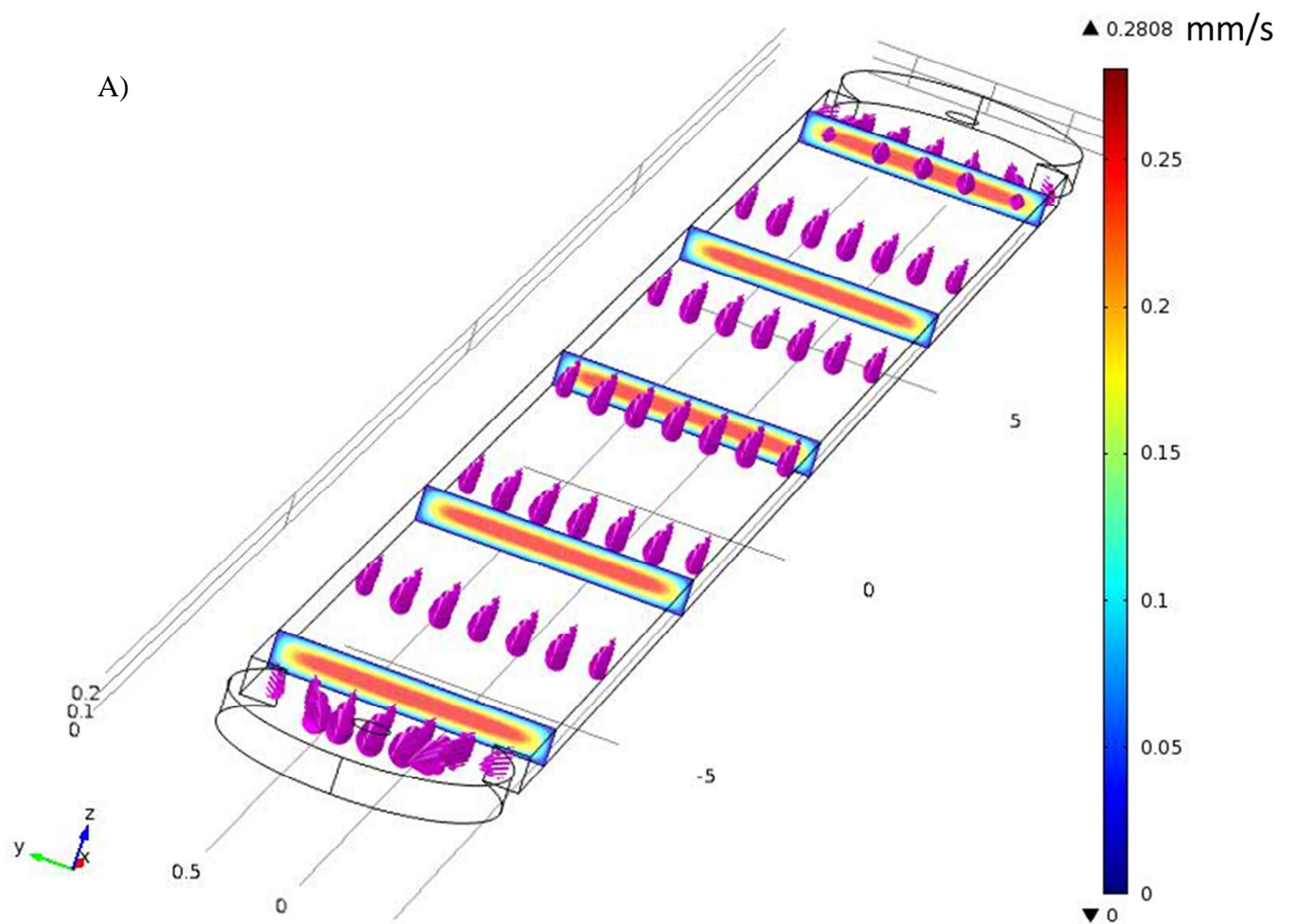


Figura 2.5 A) Soluzione numerica del campo di moto, le sezioni colorate esprimono il profilo di velocità lungo il piano yz , mentre le frecce viola rappresentano i vettori di velocità del campo di moto; B) Profilo di velocità lungo la coordinata z .

Come si può notare dalla Figura 2.5 il profilo di velocità trasversale al condotto microfluidico è parabolico. Tale andamento è costante lungo la coordinata assiale. A causa delle piccole dimensioni del canale e delle basse portate, il flusso è sempre laminare negli esperimenti svolti; perciò i sottili strati di fluido trasmettono la quantità di moto agli strati adiacenti secondo la propria viscosità.

Dal punto di vista della simulazione CFD il sistema in esame presenta una notevole semplificazione intrinseca: dato che il tempo caratteristico di reazione biologica è molto superiore al tempo di permanenza nel micro canale è possibile disaccoppiare la fluidodinamica dalla cinetica di reazione e quindi si ha una maggiore semplicità nell'implementazione dei flussi reattivi.

2.2.2 Stima dell'evaporazione

L'evaporazione è un fenomeno presente nelle applicazioni *lab-on-a-chip*, date le elevate superfici specifiche in gioco e la permeabilità delle pareti in PDMS. Perciò si è quantificato l'aumento di concentrazione della soluzione fisiologica dovuto all'evaporazione del solvente (acqua); tale analisi permette inoltre di prevenire un eventuale essiccamento del microcanale, specie per esperimenti di lunga durata (giorni).

Durante gli esperimenti il microchip viene posto in un incubatore ad atmosfera controllata: 95% di umidità relativa, 5% di CO₂ e termostato a 37°C. Il valore dell'umidità relativa è tale da uguagliare le pressioni parziali tra l'acqua della soluzione fisiologica e il vapore d'acqua presente nell'incubatore. Tuttavia, dopo 24 ore, evidenze sperimentali hanno mostrato un incremento della concentrazione della soluzione fisiologica, dovuto all'evaporazione del solvente acquoso.

Ai fini delle simulazioni, la soluzione fisiologica (PBS) è stata considerata come acqua pura ed è stata studiata la sua evaporazione dal canale e dal pozzetto con un approccio unidirezionale, secondo il quale l'acqua esce dal microcanale per evaporazione mentre l'aria atmosferica non entra. Si sono analizzati due casi: l'evaporazione dal microcanale attraverso lo spessore di PDMS e l'evaporazione direttamente dal pozzetto.

2.2.2.1 Evaporazione attraverso lo strato di PDMS

Il volume di controllo lungo cui si è eseguita la stima è lo strato di PDMS. L'obiettivo è quello di quantificare il flusso di vapore d'acqua che dal microcanale migra verso l'atmosfera in cui è presente aria umida. Perciò il trasporto di materia viene dettato dal gradiente di concentrazione. Si ha così la seguente formulazione del flusso diffusivo:

$$N_{H_2O} = -D_{H_2O-PDMS} \frac{dC_{H_2O}}{dy} \approx -\frac{D_{H_2O-PDMS}}{s} \Delta C_{H_2O} \quad (2.2)$$

dove $D_{H_2O-PDMS}$ è il coefficiente di diffusione del vapore d'acqua del PDMS, s è lo spessore dello strato di PDMS e ΔC_{H_2O} è la differenza tra $C_{H_2O}^2$ e $C_{H_2O}^1$, che indicano rispettivamente la

concentrazione di vapore d'acqua in PDMS all'interfaccia con l'atmosfera e all'interfaccia con il microcanale. Le variabili e i relativi valori necessari per calcolare le concentrazioni sono riportati in Tabella 2.5.

Tabella 2.5 Variabili utilizzate nella stima dell'evaporazione.

Variabile	Valore	Unità di misura	Referenze
$D_{H_2O-PDMS}$	$28 \cdot 10^{-12}$	m^2/s	[Toepke and Beebe 2006]
s	3	mm	
$H_{H_2O-PDMS}$	18,52	mmHg	[Muzenda et al., 2011]
$P_{H_2O}^{sat}$	47,07	mmHg	[Mitrovic 2011]
$C_{H_2O}^1$	$1,363 \cdot 10^3$	mol/m^3	[Mitrovic 2011]
$C_{H_2O}^2$	$0,847 \cdot 10^3$	mol/m^3	[Mitrovic 2011]

I valori delle concentrazioni all'interfaccia sono stati trovati imponendo la condizione di isofugacità da ambo le parti:

- Lato microcanale-PDMS: $\hat{f}_{H_2O}^{microcanale} = \hat{f}_{H_2O}^{PDMS}$; $x_{H_2O}^{microcanale} \gamma_{H_2O} P_{H_2O}^{sat} = x_{H_2O}^{PDMS,1} H_{H_2O-PDMS}$; approssimando la soluzione fisiologica (PBS) come acqua si ottiene la frazione di vapore d'acqua in PDMS in equilibrio con l'interfaccia acquosa: $x_{H_2O}^{PDMS,1} = P_{H_2O}^{sat} / H_{H_2O-PDMS}$ da cui tramite trasformazioni si ottiene $C_{H_2O}^1$.
- Lato PDMS-aria umida: $\hat{f}_{H_2O}^{PDMS} = \hat{f}_{H_2O}^{aria\ umida}$; considerando l'aria umida come una miscela ideale di gas ideali, la fugacità del vapore d'acqua in aria corrisponde alla pressione parziale dell'acqua, ovvero dall'uguaglianza delle fugacità si ottiene: $x_{H_2O}^{PDMS,1} H_{H_2O-PDMS} = y_{H_2O} P$, dove la composizione di vapore d'acqua in aria umida (y_{H_2O}) si ottiene da dati psicometrici conoscendo l'umidità relativa (95%), temperatura (37°C) e pressione P (1 atm); quindi la frazione di vapore d'acqua in PDMS in equilibrio con l'interfaccia gassosa è $x_{H_2O}^{PDMS,2} = \frac{y_{H_2O} P}{H_{H_2O-PDMS}}$ da cui si ricava $C_{H_2O}^2$.

Avendo il gradiente di concentrazione si può calcolare dalla (2.2) il flusso di vapore d'acqua N_{H_2O} . Infine moltiplicando tale valore per la superficie del microcanale, per il tempo e per il volume specifico dell'acqua si ottiene il volume di H₂O evaporato.

I seguenti risultati mostrano come varia il volume evaporato dal microcanale al variare dello spessore di PDMS; mentre sotto è riportato il risultato ottenuto sull'analisi di sensitività eseguita per quantificare l'effetto di una fluttuazione di umidità relativa sul trasporto di vapore d'acqua.

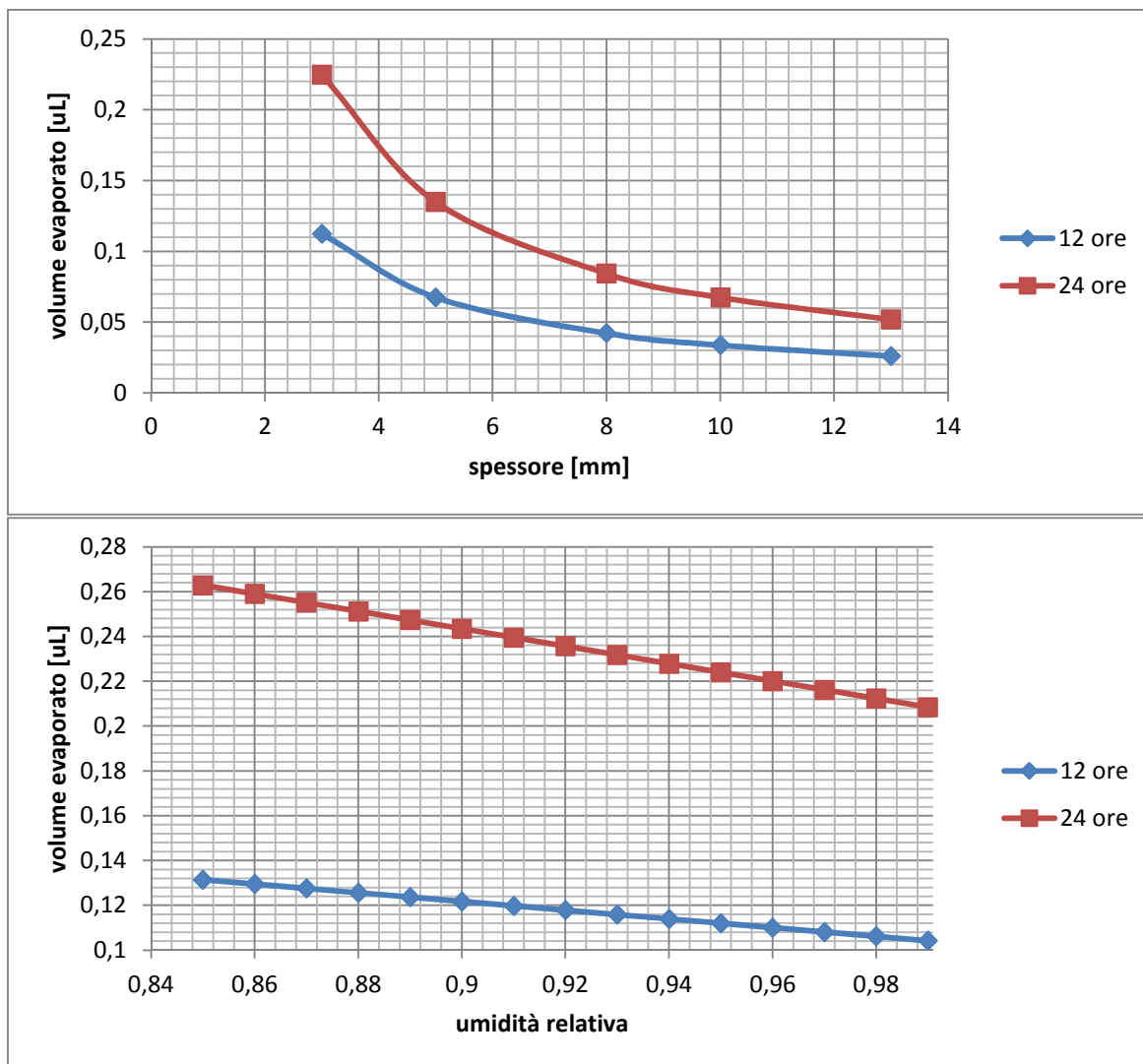


Figura 2.6 Andamento del volume evaporato in funzione dello strato di PDMS (sopra); volume evaporato in relazione ad una fluttuazione dell'umidità relativa (sotto).

La Figura 2.6 quantifica la diminuzione del volume di H₂O evaporato all'aumentare dello spessore di PDMS e si nota una notevole diminuzione passando da 3 a 6 mm di spessore: quantitativamente il volume evaporato diminuisce da 0,1 a 0,004 μL aumentando lo spessore da 3 a 5 mm; mentre l'entità di questa variazione non è osservabile per spessori maggiori di 8 mm. L'analisi di sensitività mostra che una fluttuazione dell'umidità relativa non ha molta influenza sul flusso di materia. In linea di massima, il volume evaporato per uno spessore di PDMS di 3 mm e 95% di umidità relativa è di 0,116 μL per 12 ore e 0,225 μL per 24 ore, quindi, considerando che un canale ha una capacità di 6 μL, si ha una diminuzione del 2 e 4%. Perciò si può concludere che, almeno nel microcanale, l'evaporazione può essere trascurabile.

2.2.2.2 Evaporazione dal pozzetto

In questo caso il volume di controllo è lo strato limite che vi è all'interfaccia liquido/gas. Il gradiente di concentrazione (quindi le condizioni al contorno del volume di controllo) è stimabile dalla differenza tra la composizione dell'acqua al punto di saturazione e la composizione d'acqua nel bulk, ovvero quella che corrisponde al 95 % di umidità relativa, sempre ottenuta da relazioni psicometriche. Si è considerato 1 mm di strato limite. Utilizzando un approccio analogo al caso precedente si è calcolato il flusso di vapore d'acqua attraverso l'interfaccia liquido-gas e si è ottenuto l'andamento dell'acqua evaporata dal pozzetto in funzione dell'umidità relativa (Figura 2.7).

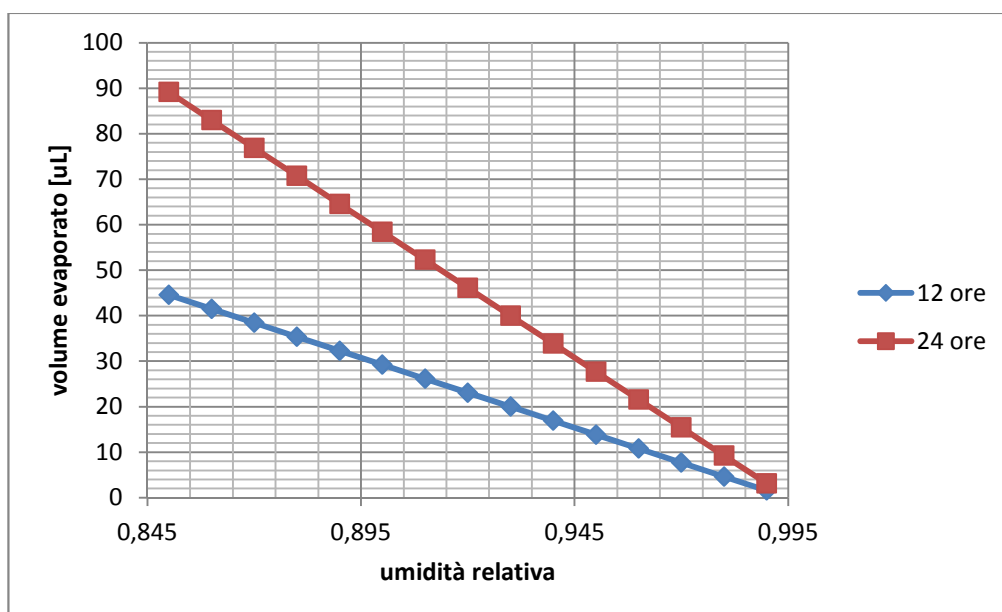


Figura 2.7 Andamento del volume evaporato nel pozzetto in relazione ad una fluttuazione dell'umidità relativa.

Considerando una capacità del pozzetto di circa 35 µL, alle condizioni operative in 12 ore evapora un volume di 14 µL, e in questo caso l'evaporazione non è trascurabile se si ha una diminuzione dell'umidità relativa. Infatti passando ad un 80 % di umidità relativa il pozzetto potrebbe essiccarsi. Si conclude pertanto che l'evaporazione dal pozzetto è più importante rispetto quella del microcanale, ciò è dovuto all'effetto inibitore dello strato di PDMS.

2.3 Protocollo sperimentale delle infezioni virali

Prima di poter effettuare un'infezione con adenovettori è necessario eseguire con cura una semina omogenea delle cellule ad una densità stabilita. La semina cellulare avviene nei canali dei microchip. Una variabile importante per lo studio della riprogrammazione cellulare,

secondo l'approccio dell'infezione virale, è il numero di virioni per cellula seminata. Si definisce quindi il parametro MOI, multiplicity of infection:

$$MOI = \frac{\text{numero di particelle virali}}{\text{numero di cellule}} \quad (2.3)$$

Una volta fissato l'MOI, conoscendo la densità della semina cellulare, si calcola il numero totale di particelle virali da prelevare dalla soluzione madre. Successivamente viene prelevata la sospensione madre stoccata nell'apposito freezer a -80°C ; per evitare che il virus subisca shock termico la si pone in un siberino, permettendo così uno scongelamento graduale. Il tutto viene posto sotto cappa sterile. Di seguito si preleva il volume necessario per effettuare l'infezione e lo si diluisce in terreno di coltura. Quindi si prelevano dall'incubatore le cellule da infettare, si aspira il terreno di coltura, si effettua un rapido lavaggio in PBS e si incubano le cellule con la nuova sospensione virale. Inizia ora il processo che in questa tesi è definito come fase di infezione. Tramite le micropompe CAVRO viene iniettata, in 2 minuti di infusione, la sospensione virale nei canali microfluidici. Una volta che la sospensione virale è stata iniettata, il microchip viene lasciato in incubatore in condizione di statica per 90 minuti. Successivamente con le micropompe CAVRO viene aspirata la sospensione virale (*outflow*) ed il microchip viene riposto nell'incubatore.

2.4 Analisi di immagine

Per analisi di immagine si intende l'estrazione di informazioni significative da immagini, nel nostro caso foto ottenute al microscopio dei canali microfluidici per studiare specifici aspetti biologici (da cui *bioimaging*).

Si è eseguito il bioimaging per studiare l'effetto della degradazione dei virus sull'efficienza di espressione, e per regredire i parametri dell'equazione logistica da dati sperimentali. Per questo studio si sono utilizzati due strumenti diversi: MATLAB, con l'ausilio di subroutine specifiche per il riconoscimento di immagine, e il software Cell Profiler.

2.4.1 Analisi di immagine con MATLAB

Per studiare l'effetto delle condizioni operative dell'infezione si sono infettate le cellule con virus portatori di una proteina fluorescente verde (GFP). Si è poi dovuta calcolare per ogni esperimento l'efficienza di infezione EI (%), definita come:

$$EI(\%) = \frac{\text{numero di cellule infette}}{\text{numero di cellule totali}} 100\% \quad (2.4)$$

Per numero di cellule infette si intende il numero di cellule che esprimono la GFP. Il programma in MATLAB è stato sviluppato in modo tale da ricevere in input immagini in formato *.jpg* e restituire il valore dell'efficienza di infezione. Affinché questo valore venga

calcolato, il programma deve elaborare due tipi di immagini: la prima contenente i nuclei marcati con HOECHST e la seconda immagine in cui sono visualizzate le cellule che esprimono la proteina fluorescente (cellule GFP⁺). L'analisi della prima immagine è necessaria per individuare tutte le cellule mediante l'identificazione dei loro nuclei, che hanno una morfologia arrotondata più facile da identificare rispetto alla varietà di morfologie assunte dalle cellule.

Seguendo l'ordine del programma, la prima immagine che viene elaborata è quella che individua il numero di nuclei (e quindi di cellule). Dopo l'acquisizione della prima immagine vi è l'elaborazione che passa attraverso i seguenti punti:

- Utilizzando la subroutine di MATLAB `rgbgray` si ha la trasformazione dell'immagine di colore blu in scala di grigi;
- Con il comando `adapthisteq` viene aumentato il contrasto adattando l'intensità dell'immagine;
- Grazie al comando `im2bw` da un'immagine con scala di grigi si passa ad una binaria secondo una soglia indicata con un parametro `n1`: per valori al di sopra di questo gli elementi identificati negli step precedenti si colorano di bianco, invece per valori inferiori a `n1` si colorano di nero;
- Con il comando `bwmorph` vengono eliminati i piccoli oggetti isolati che potrebbero essere contati dal programma come nuclei;
- I nuclei vengono identificati e numerati dal programma in base al riconoscimento di zone nell'immagine con intensità analoga e vengono rimpiccioliti utilizzando `bwareopen` e `bwmorph` in modo da renderli distanziati gli uni dagli altri;
- Per facilitare l'analisi della seconda immagine, con il comando `bwlabel` vengono identificate delle regioni nella foto caratterizzate dalla stessa intensità di illuminazione; queste regioni vengono raggruppate per costituire i nuclei delle cellule.

Dopo la memorizzazione del numero di nuclei e della loro posizione nella prima immagine, si passa all'elaborazione di quella relativa alle cellule GFP⁺. Analogamente al caso precedente, la foto viene trasformata in scala di grigi. Sfruttando la conversione della foto in una matrice e la memorizzazione delle regioni in cui ci sono i nuclei, avvenuta nell'ultimo step dell'elaborazione della prima immagine, si effettua la media di quegli elementi della matrice che identificano la posizione dei nuclei. Queste medie calcolate forniscono i valori dell'intensità di fluorescenza associate a tutti i nuclei identificati nella fase precedente. Perciò se nelle regioni in cui vi sono i nuclei l'intensità di fluorescenza è alta vuol dire che quelle cellule sono GFP⁺, in caso contrario l'intensità di fluorescenza sarà paragonabile a quella del background. La soglia che determina questa distinzione, nel programma viene indicata come `n2`, al di sopra della quale si ha una cellula GFP⁺ e al di sotto si ha una cellula che non è stata infettata (poiché non esprime la GFP).

Grazie all'elaborazione delle due foto il programma restituisce il numero di cellule totali, il numero di cellule infette e l'EI (%).

2.4.2 *Virus decay*

Lo scopo di questa analisi consiste nel verificare che l'impiego di virus al di fuori delle condizioni di utilizzo (indicate dal protocollo sperimentale) ha effetti sull'efficienza di infezione. In caso positivo è necessario stabilire una correzione sull'efficienza di infezione, perché si riflette nel modello matematico sulla relazione tra MOI e EI (%).

Sono stati valutati 2 casi che si sono ritenuti influenti sull'efficienza di infezione:

- Il primo riguarda l'adsorbimento dei virus sulle pareti del PDMS, questa analisi è stata realizzata infettando cellule con una sospensione composta da medium e virus lasciata nei canali microfluidici per 2 ore;
- Il secondo è relativo alla degradazione dei virus per effetto della temperatura, in questo caso tale effetto è stato realizzato infettando le cellule con virus stoccati in una eppendorf per 2 ore a 37°C, invece di essere utilizzati subito dopo lo scongelamento graduale dovuto allo stoccaggio a -80°C.

Si è confrontato l'efficienza di infezione utilizzando tre chip, ciascuno dei quali avente nei microcanali un tipo diverso di sospensione virale: la prima contenente virus fresco (inteso come appena scongelato dallo stoccaggio a -80°C), la seconda che ha subito l'adsorbimento sul PDMS di una frazione di virus e la terza che è stata lasciata a 37°C per 2 ore. Dopo il tempo di infezione (90 minuti) sono state scattate le foto con il microscopio a fluorescenza di ciascun microcanale dei tre chip, in modo tale da poter calcolare la media e la deviazione standard dell'EI (%) per ognuna delle tre condizioni operative. Le foto così scattate sono state elaborate dal programma MATLAB descritto nel paragrafo precedente. Il programma ha quindi valutato l'EI relativa alle diverse condizioni di infezione realizzate nei 3 chip. La media e la deviazione standard dell'EI sono state calcolate sui microcanali di ciascun chip.

Nel programma sono stati elaborati i risultati dell'analisi di immagine in modo tale da ottenere il numero di cellule con una certa intensità di fluorescenza per le tre condizioni di infezione. I risultati sono rappresentati in Figura 2.8, indicano il numero di cellule che hanno una certa intensità di fluorescenza, indicata in ascissa.

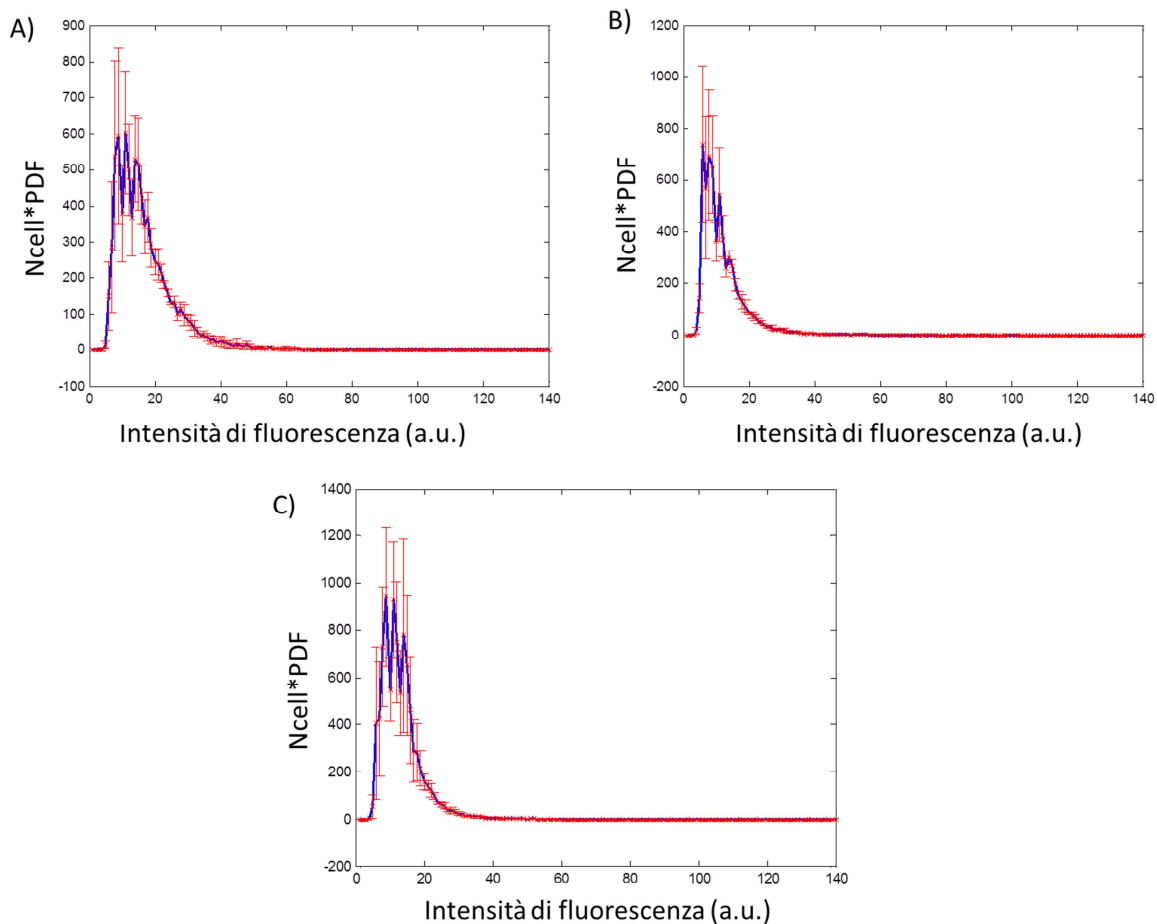


Figura 2.8 I grafici rappresentano l'andamento del Numero di cellule*PDF ($N_{cell} * PDF$) con le deviazioni standard calcolate sui microcanali di ciascun chip; A) Virus fresco, B) Adsorbimento dei virus, C) Degradazione termica dei virus.

L'efficienza di infezione dipende dalla soglia n_2 impostata, infatti se questa è troppo bassa anche il rumore di fondo potrebbe essere valutato come una cellula GFP^+ e se è troppo alta molte cellule che esprimono la GFP vengono perse perché emettono un'intensità di fluorescenza minore della soglia. Questa soglia è stata valutata da un confronto con un canale di controllo in cui le cellule non erano state infettate ed erano quindi GFP^- . Una volta ottenute le $N_{cell} * PDF$ di ciascuna delle tre condizioni operative sono state calcolate le Complementary Cumulative Distribution Function ($N_{cell} * CCDF$) definite come segue:

$$N_{cell} * CCDF(x) = \int_{threshold}^{\infty} N_{cell} * PDF(x) dx \quad (2.5)$$

Con x intensità di fluorescenza. Interpretando il significato dell'integrale, la $CCDF(x)$ è una funzione che indica la somma di tutte quelle cellule che hanno un'intensità di fluorescenza maggiore della soglia. Confrontando le tre diverse $CCDF$ si ottiene il seguente grafico:

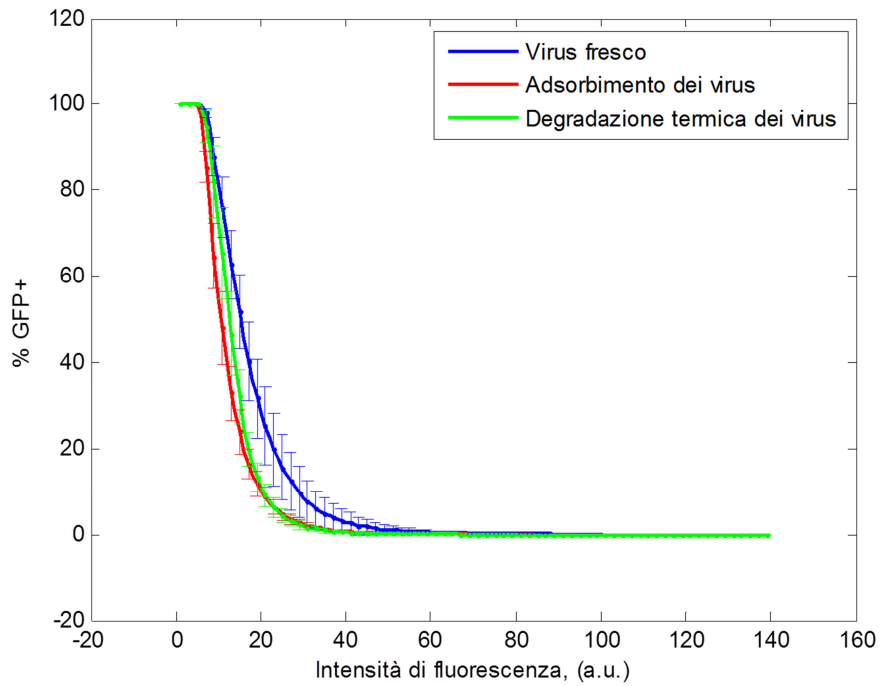


Figura 2.9 Complementary cumulative distribution function calcolate per i tre chip con le rispettive condizioni di infezione.

Come ci si aspettava, si può osservare che l'efficienza di infezione con virus appena scongelati è sempre maggiore rispetto quella relativa l'impiego delle altre sospensioni virali, indipendentemente dalla soglia scelta. Il seguente istogramma riassume il confronto sull'utilizzo delle tre sospensioni virali diverse in termini di efficienza di infezione.

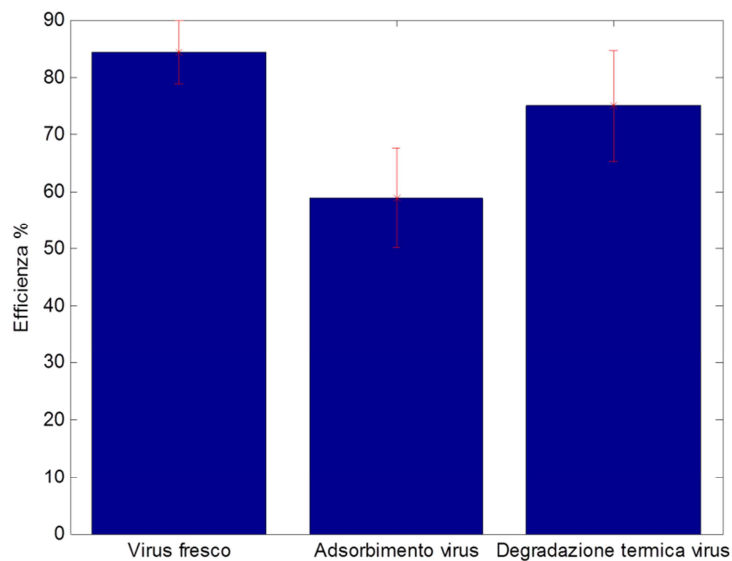


Figura 2.10 Efficienza di infezione delle tre diverse sospensioni virali usando una soglia pari a $n_2=9$.

Dalla Figura 2.10 si nota che l'adsorbimento dei virus sul PDMS è tale da diminuire l'EI del 25%, mentre l'utilizzo di virus stoccati a 37°C per 2 ore ne comporta una diminuzione del 10%.

2.5 Analisi di immagine con Cell Profiler

Cell Profiler è un software specifico per la misura e l'analisi di immagini di cellule. Il tipo di elaborazione delle immagini è simile a quello implementato col programma MATLAB. Lo sviluppo dell'analisi di immagini comincia con la creazione di una *pipeline*, intesa come sequenza di operazioni volte al riconoscimento e all'elaborazione dell'immagine. La *pipeline* utilizzata per il calcolo dell'EI è composta dai seguenti comandi:

- *LoadImages*: caricamento di tre foto della coltura cellulare: quella in bianco e nero, quella relativa ai nuclei marcati con HOECHST e quella con l'espressione della GFP;
- *Crop*: permette all'utente di selezionare la regione da analizzare, grazie alla foto in scala di grigi e successivamente le altre due foto vengono ritagliate automaticamente allo stesso modo;
- *ColorToGray*: converte le immagini relative a HOECHST e GFP in scala di grigi;
- *CorrectIlluminationCalculate*: viene calcolata una funzione di intensità di illuminazione delle foto HOECHST e GFP. Questa funzione è di tipo polinomiale e permette di calcolare il background della foto;
- *CorrectIlluminationApply*: viene sottratta la funzione di distribuzione di illuminazione alle foto HOECHST e GFP eliminando il background delle stesse;

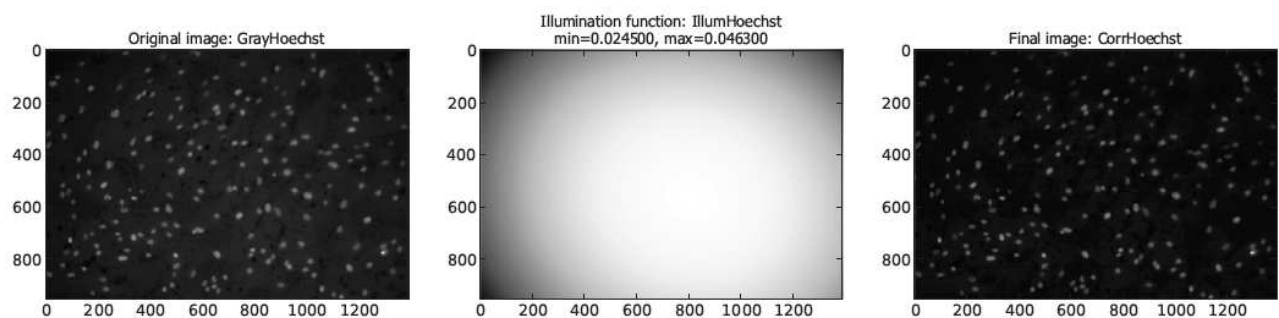


Figura 2.11 Elaborazione della foto HOECHST per sottrarre la funzione di illuminazione indicata con *Illumination function* (al centro), a destra la stessa foto senza il background.

- *IdentifyPrimaryObjects*: questo comando permette di identificare i nuclei presenti nella foto HOECHST modificata secondo gli step precedenti. Viene stabilito un range in pixel che indica il diametro tipico dei nuclei e gli oggetti al di fuori di questo range non vengono contati come nuclei;

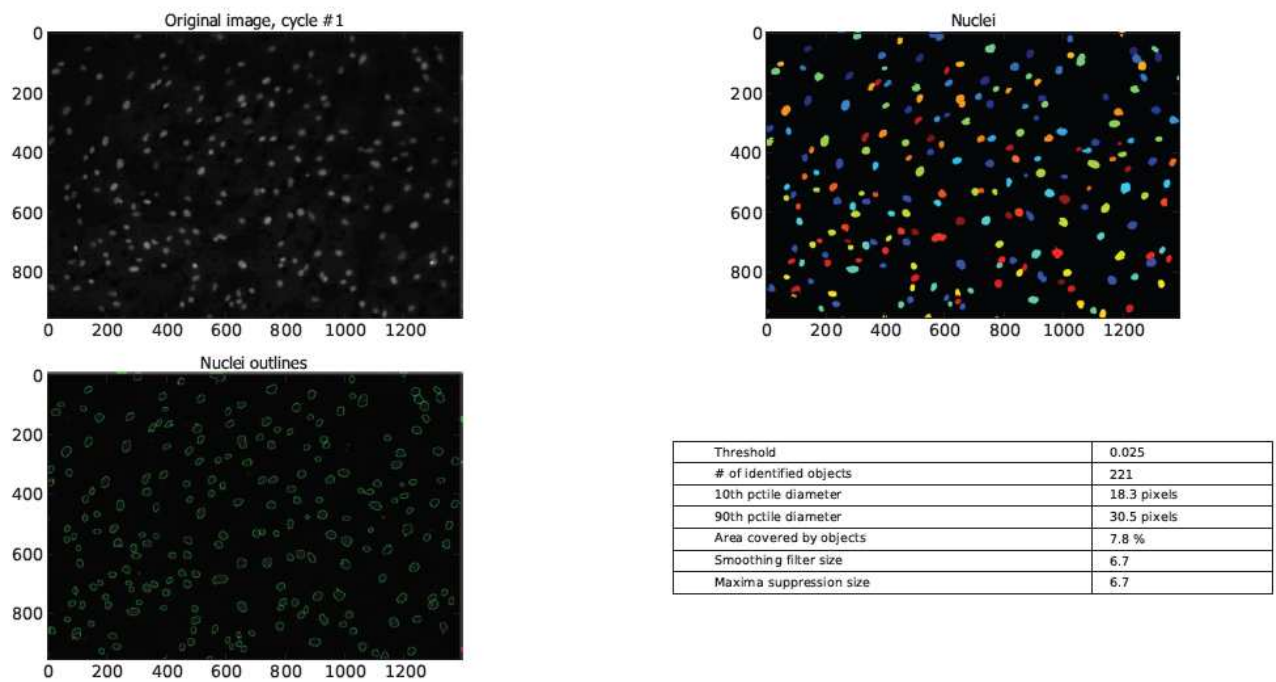


Figura 2.12 Identificazione dei nuclei assegnando un range di diametro dei nuclei.

- *MeasureObjectIntensity*: con la foto GFP viene calcolata l'intensità di illuminazione nei punti della foto dove sono stati identificati i nuclei allo step precedente, come si vede in figura:

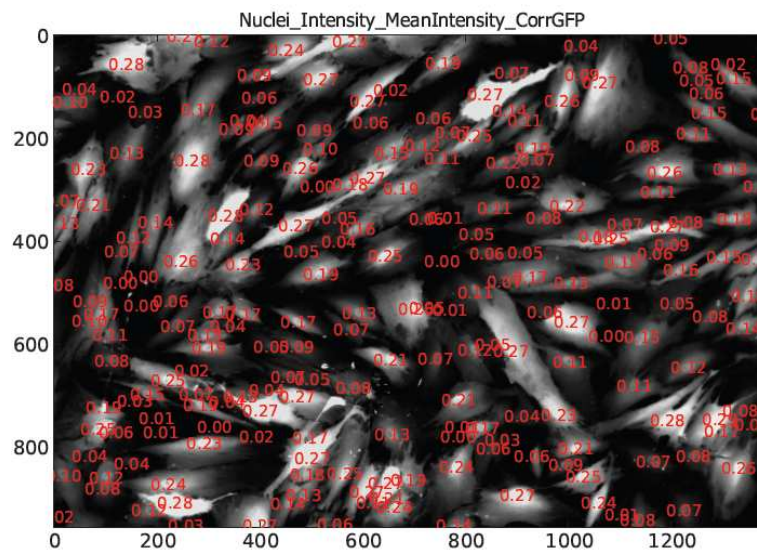


Figura 2.13 Intensità di illuminazione della foto GFP nei punti in cui sono stati identificati i nuclei

- *ClassifyObject*: classificazione dei nuclei in base all'intensità media. Questo comando permette di calcolare l'istogramma che riporta il numero di oggetti (in questo caso nuclei)

che hanno una certa intensità di illuminazione indicata in ascissa (ovvero l'istogramma rappresenta la PDF);

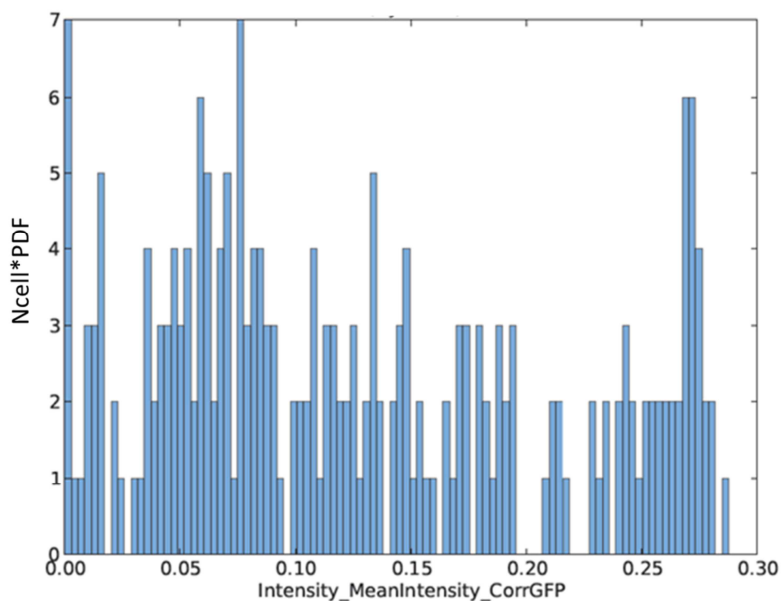


Figura 2.14 Iistogramma che rappresenta la $N_{cell} * PDF$ dell'intensità di fluorescenza della GFP.

- *FilterObject*: permette di filtrare il numero di nuclei in base all'intensità di espressione della GFP, ovvero vengono scartati gli oggetti che non hanno un valore minimo di intensità. In altre parole permette di calcolare i nuclei che sono stati infettati almeno da un virus stabilendo un valore soglia;
- *CalculateMath*: svolge delle operazioni matematiche, in particolare viene calcolata l'EI (%) dividendo il numero di nuclei, filtrati con la soglia stabilita in *FilterObject*, per il numero di nuclei totali, calcolati in *IdentifyPrimaryObjects*.

Questa pipeline è stata utilizzata per confermare i risultati ottenuti con l'analisi di immagine in MATLAB.

2.5.1 Curva di crescita cellulare

Per caratterizzare matematicamente il processo di duplicazione cellulare nel tempo si è assunto che esso segua la seguente legge logistica [Arino *et al.*, 2006]:

$$\frac{dN(t)}{dt} = rN(t) - \frac{rN(t)^2}{K} \quad (2.6)$$

Dove $N(t)$ è il numero di cellule presenti nella coltura cellulare al tempo t , r è la velocità di duplicazione e K corrisponde al numero di cellule presenti alla concentrazione di confluenza. Risolvendo analiticamente l'equazione differenziale si ottiene l'espressione esplicita per $N(t)$:

$$N(t) = \frac{K}{1 + \left(\frac{K}{N_0} - 1 \right) e^{-rt}} \quad (2.7)$$

Facendo un grafico dell'equazione si ottiene qualitativamente una sigmoide (Figura 2.19). La velocità di duplicazione r rappresenta la pendenza della curva $\log(N(t))$ nella fase di crescita esponenziale (fino al punto di flesso della curva $N(t)$ indicato in Figura 2.19). Per $K \rightarrow \infty$ l'Equazione 2.6 diventa $dN/dt = rN$, risolvendo analiticamente, con $N(t=0) = N_0$, si ha: $\ln(N(t)/N_0) = rt$. Definendo t_d come tempo necessario affinché si raddoppi il numero di cellule presenti nella coltura (*doubling time*), si ha $N(t=t_d) = 2N_0$, da cui si ottiene l'espressione della velocità di duplicazione:

$$r = \frac{\ln 2}{t_d} \quad (2.8)$$

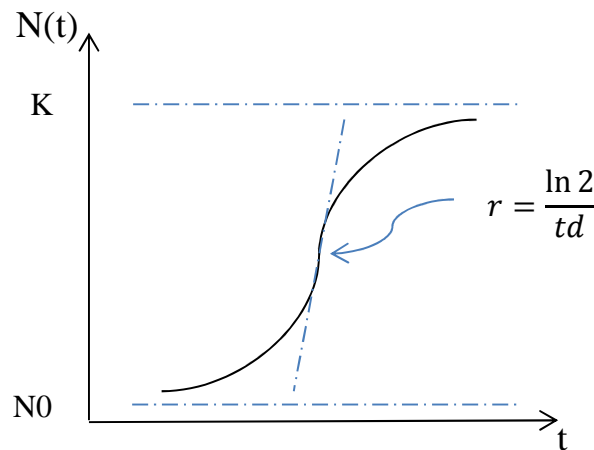


Figura 2.15 Andamento qualitativo del numero di cellule nel tempo

Per calcolare i parametri dell'equazione logistica, che caratterizza la duplicazione cellulare, si è svolto un fitting dei dati sperimentali. Questi dati sono stati analizzati grazie all'analisi di immagine eseguita col software Cell Profiler. In questo caso la *pipeline* è più semplice perché occorre solo quantificare i nuclei presenti nella foto. Sperimentalmente si è seguita la crescita cellulare di cellule MEF coltivate in tre canali microfluidici di un chip. Stabilendo dei time-point sono stati fotografati col microscopio tre zone di ogni microcanale, quindi per un totale di nove foto per ciascun tempo di campionamento. Su queste foto è stata calcolata la media e la deviazione standard. Perciò per ogni time-point si è ottenuto una media del numero di cellule e la deviazione standard tra le 9 foto. I parametri dell'equazione logistica da fittare sono la concentrazione di confluenza, K_{conc} [cellule/mm²], e il tempo di duplicazione t_d (h). Questi valori sono stati trovati minimizzando la funzione costo espressa nel seguente modo:

$$COST = \sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{N_i^{exp} - N_i^{th}(t_d, K_{conc})}{\sigma_i^{exp}} \right)^2 \right] \quad (2.9)$$

Dove n è il numero dei time point, N_i^{th} è la concentrazione di cellule teorica calcolata con la legge logistica, funzione di K_{conc} e td , \bar{N}_i^{exp} è la concentrazione di cellule media ottenuta da nove foto e σ_i^{exp} è la rispettiva deviazione standard.

I risultati di questa regressione sono illustrati in Figura 2.16.

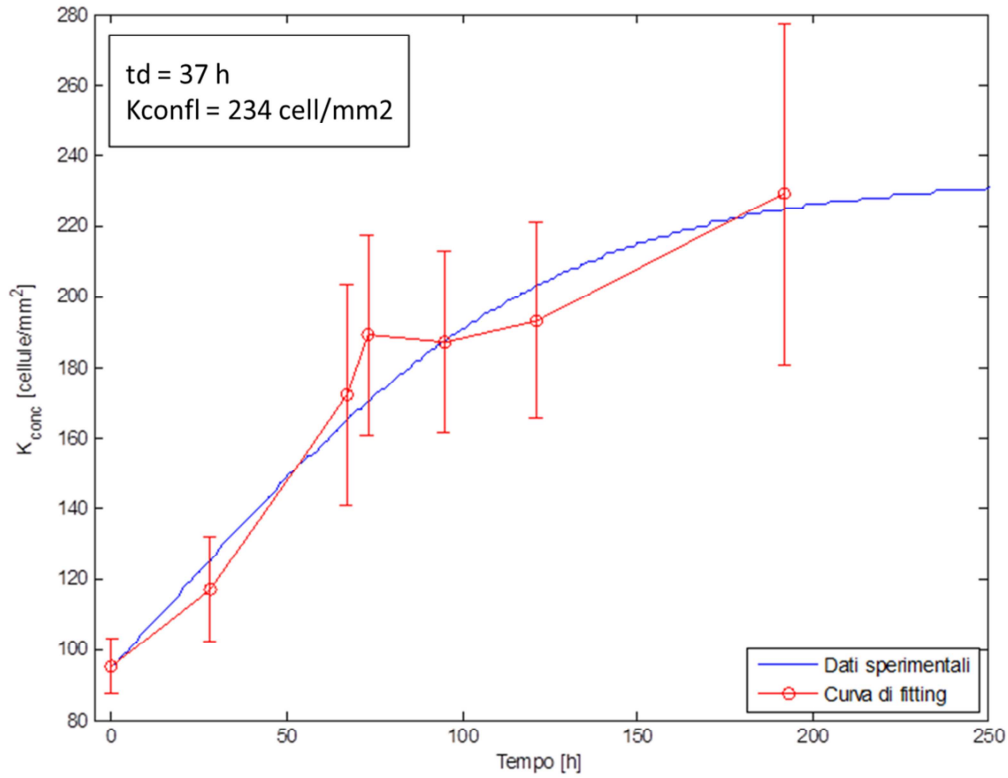


Figura 2.16 Fitting dei dati sperimentali che mostra l'andamento della concentrazione delle cellule nel tempo.

Dalla regressione si ottiene un tempo di duplicazione (t_d) pari a 37 h e una densità di cellule a confluenza di 234 [cellule/mm²].

Capitolo 3

Modello matematico

In questo capitolo viene descritto in dettaglio il modello matematico sviluppato per simulare l'intero processo di riprogrammazione cellulare. Si discuteranno inoltre gli aspetti di implementazione nel software ritenuti importanti per la comprensione dell'intero algoritmo.

3.1 Rappresentazione del processo simulato

Il modello matematico è stato sviluppato in cinque fasi:

- Infezione virale di un singolo fattore di trascrizione: questa parte del modello riguarda l'adsorbimento dei virus, che si muovono di moto browniano nella sospensione, sulla superficie cellulare;
- Processi intracellulari: in questa fase vengono modellati i processi biologici che intervengono nel tempo che intercorre tra un'infezione e l'altra, ovvero duplicazione cellulare, produzione di mRNA e proteina (che svolge il ruolo di fattore di trascrizione);
- Infezioni virali sequenziali: il modello viene sviluppato in modo tale da simulare più cicli di infezione;
- Infezioni multifattoriali: il modello viene esteso introducendo i quattro fattori di trascrizione (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc);
- DNA binding: processo che comprende la traslocazione dei quattro fattori nel nucleo ed il loro binding al DNA in corrispondenza dei promotori dei vari geni.

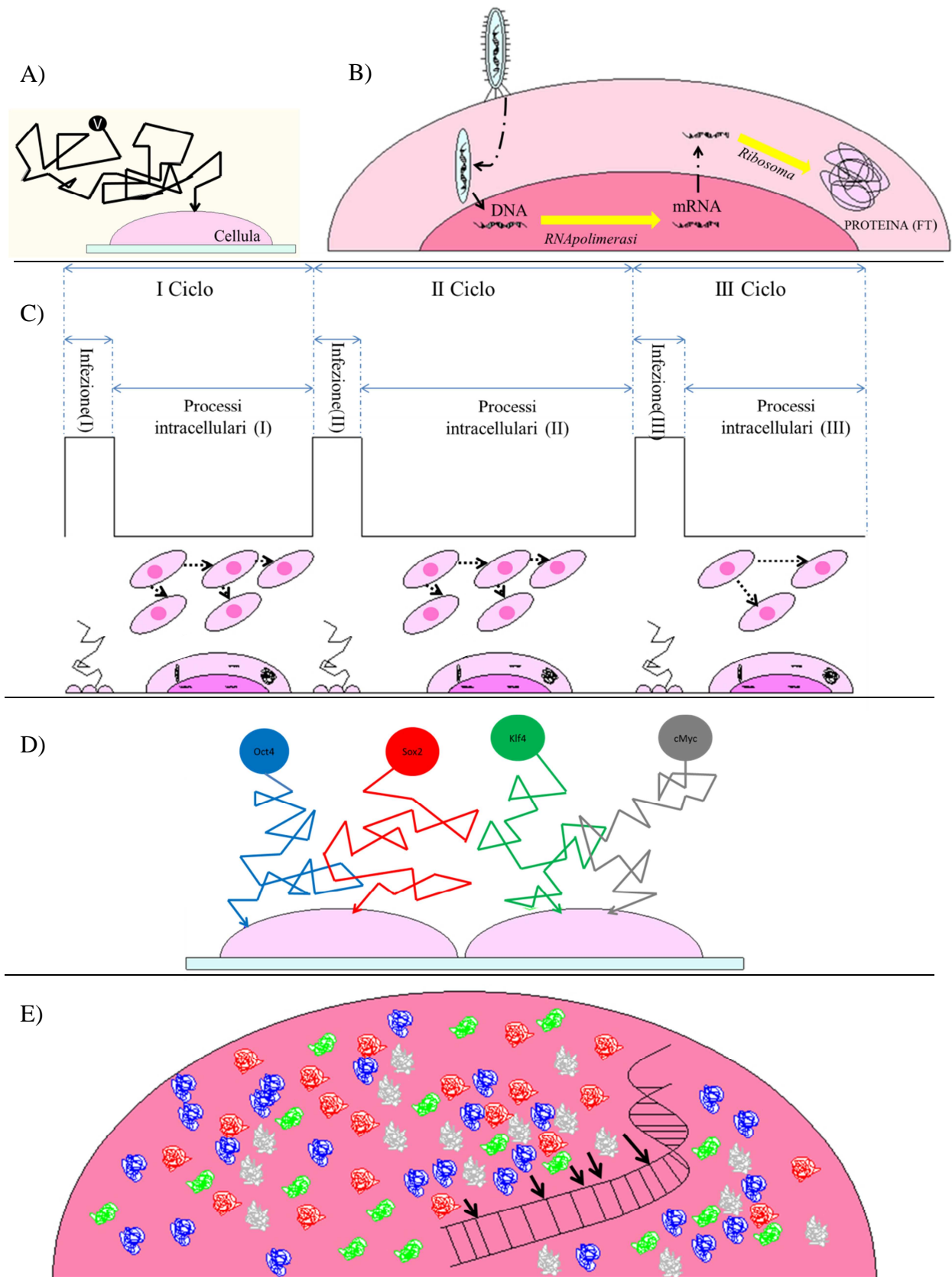


Figura 3.1 Rappresentazione delle fasi del processo biologico simulato: A) Infezione virale di un singolo fattore; B) Processi intracellulari: sintesi di mRNA e proteina integrata con la duplicazione cellulare; C) Infezioni virali sequenziali; D) Infezioni multifattoriali; E) DNA binding da parte dei 4 fattori di trascrizione che sono traslocati nel nucleo.

Nei prossimi paragrafi vengono spiegate le assunzioni fatte in ciascuna fase di sviluppo del modello per giustificare le soluzioni computazionali con il comportamento biologico delle cellule sottoposte alle infezioni virali in coltura microfluidica.

3.2 Infezione virale di un singolo fattore

Si è sviluppato un modello stocastico che permette di determinare la probabilità che ogni cellula della coltura, adesa sul substrato del canale microfluidico, venga infettata da un certo numero di virus che si muove nella sospensione virale che riempie il microcanale. Questi virus si muovono non solo per effetto della convezione, ma anche in modo casuale di moto browniano, caratterizzato dal coefficiente di diffusione dei virus nel medium. Ciascuna infezione avviene in tre stadi successivi:

- Introduzione della sospensione virale nel canale microfluidico (*infuse*), mediante un moto del fluido con profilo di velocità parabolico;
- Periodo di statica, in cui i virus si muovono solo per effetto del moto browniano;
- Fuoriuscita della sospensione virale (*outflow*) per moto convettivo.

Per i vantaggi presentati nel capitolo precedente si sono condotti gli esperimenti in coltura microfluidica, perciò il volume di controllo che si è simulato comprende un microcanale, assimilabile ad un condotto di sezione rettangolare di lunghezza L , larghezza W e altezza H al cui interno scorre la sospensione virale. Si è considerato un sistema di coordinate cartesiane, in cui la direzione della convezione è concorde con l'asse x , mentre la superficie che ospita lo strato cellulare è posta sul piano $x-z$, come viene rappresentato nella Figura 3.2.

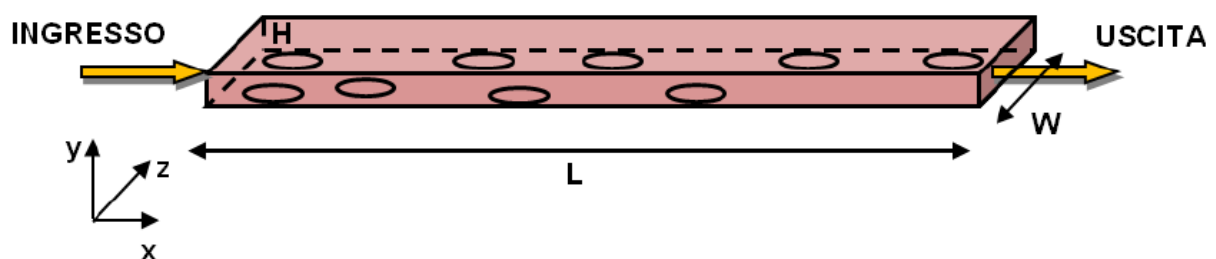


Figura 3.2 Sistema di riferimento, in cui il canale è schematizzato dal parallelepipedo di lunghezza $L=18\text{mm}$, larghezza $W=1.5\text{mm}$ e altezza $H=200\ \mu\text{m}$.

Un aspetto importante che riguarda questa fase è la rappresentazione della coltura cellulare nel canale microfluidico. Le cellule sono state considerate come entità discrete localizzate solo in alcune zone del substrato e la loro forma dipende da fattori fisici e funzionali. Spesso le cellule possono assumere forme differenti in funzione anche della concentrazione di confluenza: infatti se questa è troppo alta, può provocare irregolarità nella morfologia cellulare per effetto della pressione che le cellule esercitano tra loro. Le cellule che sono state

impiegate in questa tesi sono fibroblasti embrionali murini (MEF) che hanno una forma irregolare, come mostrato nella Figura 2.13 ottenuta al microscopio in contrasto di fase.

Ai fini della modellazione, la superficie di coltura cellulare è stata rappresentata come una griglia regolare la cui spaziatura è pari al diametro equivalente della cellula $d_{c,eq}$ (dato ricavato sperimentalmente). Il substrato è rappresentato da una matrice che nel modello viene indicata con A. In questa matrice vengono introdotte le cellule, in posizioni casuali, come elementi di valore pari a 1. Il numero totale di elementi di valore unitario introdotti nella matrice A corrisponde al numero totale di cellule N_{cell} che sono presenti in una coltura le cui dimensioni sono determinate dalla dimensione della base del canale microfluidico. In questo modo si assume che la coltura cellulare sia composta da cellule di uguale dimensione, posizionate casualmente sul substrato e geometricamente assimilabili ad un quadrato di lunghezza pari a $d_{c,eq}$, come mostrato in Figura 3.3

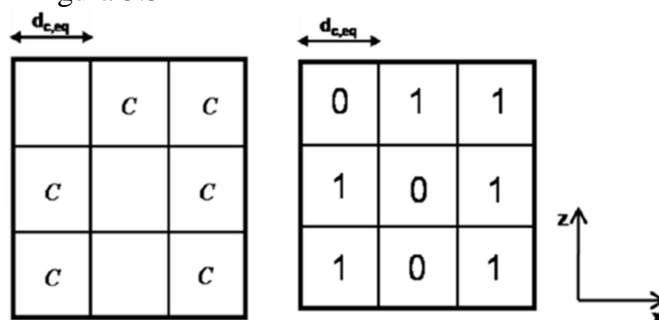


Figura 3.3 Rappresentazione della disposizione casuale delle cellule nel piano xz ed in una porzione della matrice A.

Se ad un certo istante di tempo un virus, per effetto della convezione e/o per diffusione, si trova sul piano xz ($y=0$) verrà calcolata la probabilità di infezione solo se in quella posizione l'elemento della matrice A sarà 1. La rappresentazione di questa fase è schematizzata nella Figura 3.4.

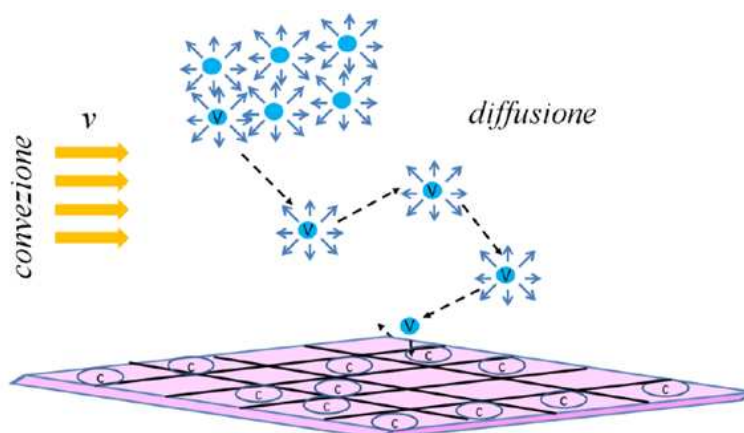


Figura 3.4 Rappresentazione schematica dell'infezione virale sul substrato microfluidico.

La Figura 3.4 rappresenta schematicamente l'infezione virale in cui i meccanismi di trasporto dei virus sono governati da fenomeni diffusivi, caratteristici del moto browniano, e convettivi, durante gli stadi in cui la sospensione virale entra (*infuse*) o esce (*outflow*) dal microcanale.

3.2.1 Equazioni del moto browniano e convettivo

Un virus per infettare la cellula deve trovarsi almeno in prossimità del substrato cellulare, collocato nel piano xz. Perciò è necessario stabilire la traiettoria che ciascun virus percorre durante l'intero tempo di infezione. Questa traiettoria è individuata dalle equazioni differenziali stocastiche che caratterizzano il moto browniano:

$$\begin{aligned}x_i(t + \Delta t) &= x_i(t) + v_x \cdot \Delta t + \sqrt{2D_v \Delta t} \cdot \xi_x \\y_i(t + \Delta t) &= y_i(t) + \sqrt{2D_v \Delta t} \cdot \xi_y \\z_i(t + \Delta t) &= z_i(t) + \sqrt{2D_v \Delta t} \cdot \xi_z\end{aligned}\tag{3.1}$$

Dove

- ξ_x, ξ_y, ξ_z sono variabili casuali distribuite normalmente con media zero e varianza unitaria;
- $x_i(t)$ è la posizione dell'i-esima particella virale al tempo t in direzione x;
- $y_i(t)$ è la posizione dell'i-esima particella virale al tempo t in direzione y;
- $z_i(t)$ è la posizione dell'i-esima particella virale al tempo t in direzione z;
- D_v è il coefficiente di diffusione del virus nella sospensione che riempie il microcanale;
- Δt è l'intervallo di tempo in cui il virus subisce lo spostamento;
- v è la velocità di convezione con la quale i virus si muovono all'interno del sistema di riferimento, che ha un profilo parabolico, come già discusso nel capitolo precedente.

Il sistema di equazioni 3.1 viene applicato nella fase di introduzione della sospensione virale ed in quella di fuoriuscita, mentre nel periodo intermedio, in cui non vi è flusso convettivo, la prima equazione viene opportunamente modificata annullando il termine v .

3.2.2 Adsorbimento

L'individuazione della traiettoria dei virus durante la fase di infezione virale mediante le equazioni 3.1 permette di stabilire gli istanti di tempo in cui una cellula può essere infettata. Infatti è la condizione al contorno per $y=0$ che tiene conto dell'interazione tra virus e cellula. Considerando un virus in posizione $y(t_1)$, che si sposta nel sistema secondo le equazioni 3.1, alla posizione $y(t_2)$, si possono verificare due casi:

- a) $y(t_2) \leq 0$;
- b) $y(t_2) > 0$.

Nel caso a), il virus ha intersecato l'asse $y=0$ nell'intervallo Δt e la probabilità di adsorbimento sullo strato cellulare data da K_{ads} è pari a [Andrews and Bray 2004]:

$$K_{ads} = P\sqrt{\Delta t}\tag{3.2}$$

Dove P è una costante positiva ricavata dal *fitting* di dati sperimentali, mentre la probabilità che il virus venga riflesso è:

$$K_{rifl} = 1 - P\sqrt{\Delta t} \quad (3.3)$$

L'algoritmo che descrive l'adsorbimento verifica l'infezione del virus generando un numero casuale q uniformemente distribuito nell'intervallo $[0, 1]$. In particolare se $q < K_{ads}$ avviene l'adsorbimento, il virus viene tolto dalla fase liquida e aggiunto all'eventuale cellula che si trova nella posizione di adsorbimento del virus; mentre se $q \geq K_{ads}$ il virus viene riflesso e le nuove coordinate del virus al tempo t_2 sono $(x(t_2), -y(t_2), z(t_2))$.

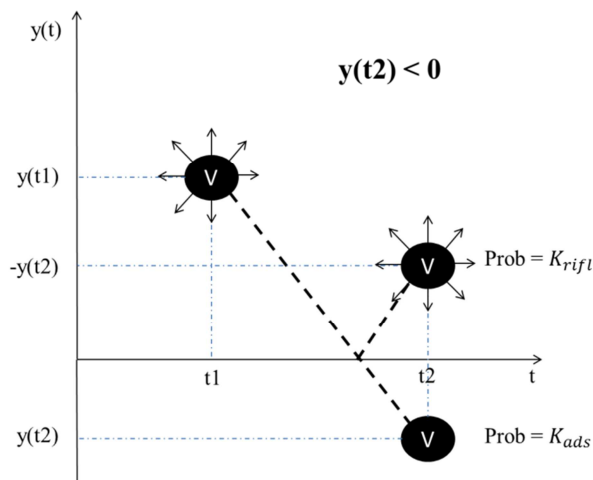


Figura 3.5 Probabilità di adsorbimento o riflessione della particella virale sulla superficie cellulare per un tempo $t^* \in [t_1, t_2]$, con $y(t_2) < 0$.

Nel caso b), in cui $y(t_2) \geq 0$, il virus in un istante di tempo compreso tra t_1 e t_2 potrebbe aver oltrepassato l'asse $y=0$ ed essere ritornato in posizione $y > 0$. La probabilità che ciò si verifichi è data da [Andrews and Bray 2004]:

$$P = e^{\left(\frac{-y(t_1)y(t_2)}{D_v \Delta t}\right)} \quad (3.4)$$

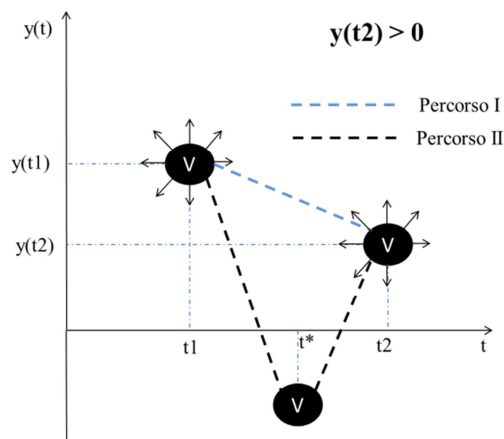


Figura 3.6 Adsorbimento della particella virale sulla superficie cellulare per un tempo $t^* \in [t_1, t_2]$, con $y(t_2) > 0$.

La probabilità che per $y(t_2) > 0$ il virus venga adsorbito sullo strato cellulare è data dalla probabilità K_{ads} moltiplicata per la probabilità P' che la particella nell'intervallo Δt abbia intersecato almeno una volta l'asse y :

$$K_{ads} = P' K_{ads} = e^{\left(\frac{-y(t_1)y(t_2)}{D_v \Delta t}\right)} P' \sqrt{\Delta t} \quad (3.5)$$

mentre la probabilità che il virus venga riflesso è:

$$K_{rifl} = 1 - P' K_{ads} = e^{\left(\frac{-y(t_1)y(t_2)}{D_v \Delta t}\right)} P' \sqrt{\Delta t} \quad (3.6)$$

La verifica dell'effettivo adsorbimento viene verificata generando il numero casuale q utilizzato con la stessa logica descritta precedentemente.

A questo punto il modello permette di simulare il comportamento intrinsecamente stocastico dell'infezione virale fornendo il numero di virus che al termine del tempo di infezione ha infettato le cellule adese sul substrato microfluidico.

3.3 Processi intracellulari

Una volta che le cellule sono state infettate dai virus, si ha l'inizio dei meccanismi biologici conseguenti all'endocitosi del DNA virale. I processi che sono stati simulati nel modello matematico comprendono la duplicazione cellulare, la trascrizione nel nucleo cellulare del DNA esogeno in mRNA, la traduzione in proteina (che fungerà da fattore di trascrizione) all'interno dei ribosomi presenti nel citoplasma, la traslocazione nel nucleo della proteina che avvia il processo di remodeling regolando l'espressione dei geni endogeni. In questo paragrafo viene descritta l'implementazione di questi processi con l'eccezione della traslocazione nel nucleo e del remodeling, trattati successivamente (§ 3.6).

Di seguito vengono descritti separatamente gli algoritmi implementati per la duplicazione cellulare e per la sintesi di mRNA e proteina, per poi esporre il modello che tiene conto di questi processi integrati nel tempo. La descrizione del modello ed i risultati che verranno discussi fanno riferimento a una popolazione cellulare arbitraria con condizioni iniziali fittizie, in modo tale da poter studiare questa importante fase della modellazione in maniera indipendente dall'intero programma. Per questo motivo si è considerato un microcanale di dimensione 3x8 celle, in cui ogni cella corrisponde a una cellula e i valori corrispondenti costituiscono il numero di virus che la cellula inizialmente contiene.

3.3.1 Modello di duplicazione cellulare

I dati di input (che costituiscono i valori di output della fase di infezione) di questa parte del modello sono rappresentati dalle matrici A0 e B0: la prima indica la posizione iniziale delle cellule (1 presenza di una cellula, 0 nessuna cellula), mentre la seconda indica il numero di virus presenti nelle cellule che sono state infettate, ovvero nelle posizioni in cui gli elementi

di A0 sono 1. L'output fornisce le corrispondenti matrici al termine del periodo simulato, denominate A1 e B1.

I parametri K e t_d sono stati determinati da fitting di dati sperimentali grazie all'analisi di immagine (Figura 2.16). Dalla regressione si è ottenuto un tempo di duplicazione t_d pari a 37 h e una densità di cellule a confluenza di 233,68 [cellule/mm²].

Determinato il numero di cellule nel tempo presenti nella coltura microfluidica, occorre stabilire come il DNA virale si ripartisce discretamente nelle cellule figlie. Il modello prevede una ripartizione del DNA virale, dalla cellula madre alle cellule figlie, secondo una funzione di probabilità data da una distribuzione normale con media pari alla metà del contenuto di DNA della cellula madre e di deviazione standard pari a un decimo rispetto la media del contenuto di DNA della cellula madre. Questo permette di assegnare il DNA virale alle cellule figlie anche in modo asimmetrico, essendo comunque più probabile la suddivisione che permette una ridistribuzione equa del DNA.

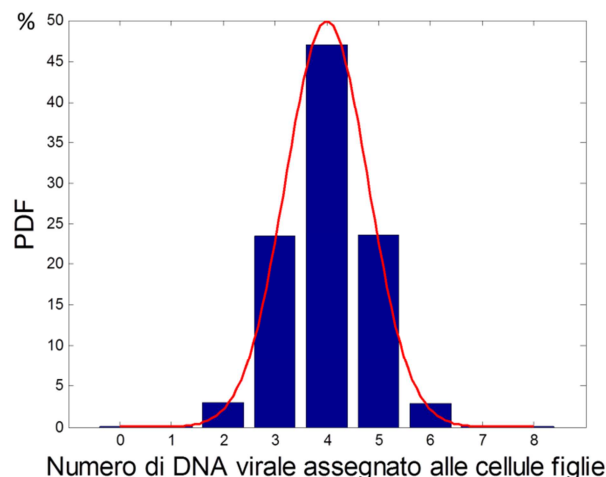


Figura 3.7 Andamento qualitativo della distribuzione simmetrica del DNA virale alle cellule figlie, con riferimento ad un valore iniziale pari a 8 virus/cellula.

La Figura 3.7 rappresenta il seguente esempio: se una cellula contiene inizialmente 8 molecole di DNA virale, dopo una divisione è più probabile che le cellule figlie abbiano 4 molecole di DNA virale ciascuna (dalla figura corrisponde al 80%), ma non si esclude la possibilità di una suddivisione del tipo 3 e 5 (10,7%) oppure 2 e 6 (0.017%) seppure con probabilità inferiore.

3.3.1.1 Implementazione della legge logistica

Si definisce la durata dei processi inter-infezione t_{d_tot} e la sua suddivisione in intervalli di tempo Δt . Per ogni istante di tempo t , il numero di cellule che si formano può essere rappresentato dall'equazione $N(t) = 2^n N_0$, dove n è il numero di generazioni, da cui si ottiene:

$$n = \log_2 \left(\frac{N(t)}{N_0} \right) \quad (3.7)$$

per ogni time point t viene calcolato il numero di cellule teoriche che si formano con l'Equazione (2.7) e tale valore viene impiegato per determinare il numero di generazioni con la (3.7). Dal momento che quest'ultimo valore è un numero reale, esso viene suddiviso nella sua parte intera e nella parte decimale. La parte intera corrisponde al numero di volte in cui tutte le cellule presenti al tempo t si duplicano, mentre la parte decimale rappresenta una frazione delle cellule presenti al tempo t che si duplica un'ulteriore volta. Ad ogni duplicazione una delle cellule che si forma viene posizionata nella matrice A1 casualmente (previa verifica che non ci sia una cellula nella stessa posizione), mentre l'altra cellula rimane nella posizione della madre. La quantità di DNA virale assegnata alle cellule figlie segue la distribuzione asimmetrica spiegata sopra. Un esempio di quanto può avvenire è illustrato schematicamente in Figura 3.8:

X	4	X	X
X	2	0	X
3	X	1	X
X	X	X	2

t

2	2	0	X
1	1	0	X
2	X	0	1
1	X	1	1

t+Δt

Figura 3.8 Esempio di distribuzione del DNA virale alle cellule figlie che si formano, le celle con X indicano che in quella posizione non ci sono cellule.

La collocazione delle cellule figlie avviene in modo casuale secondo una certa sequenza. Per analizzare i processi intracellulari ad ogni time-point, è necessario che le cellule al tempo $t+\Delta t$ si duplichino secondo la stessa sequenza impiegata al tempo t . Ciò significa che la posizione delle cellule figlie e la distribuzione simmetrica del DNA virale devono essere riproducibili agli istanti di tempo successivi. Per realizzare questa importante condizione è stata fissata la sequenza casuale che regola il posizionamento delle cellule figlie. Così facendo è possibile monitorare l'evoluzione dei processi intracellulari sebbene siano regolati da fenomeni stocastici.

Dopo aver simulato la duplicazione cellulare sopra descritta per l'intervallo di tempo dei processi intracellulari si sono ottenuti i risultati riportati in Figura 3.9.

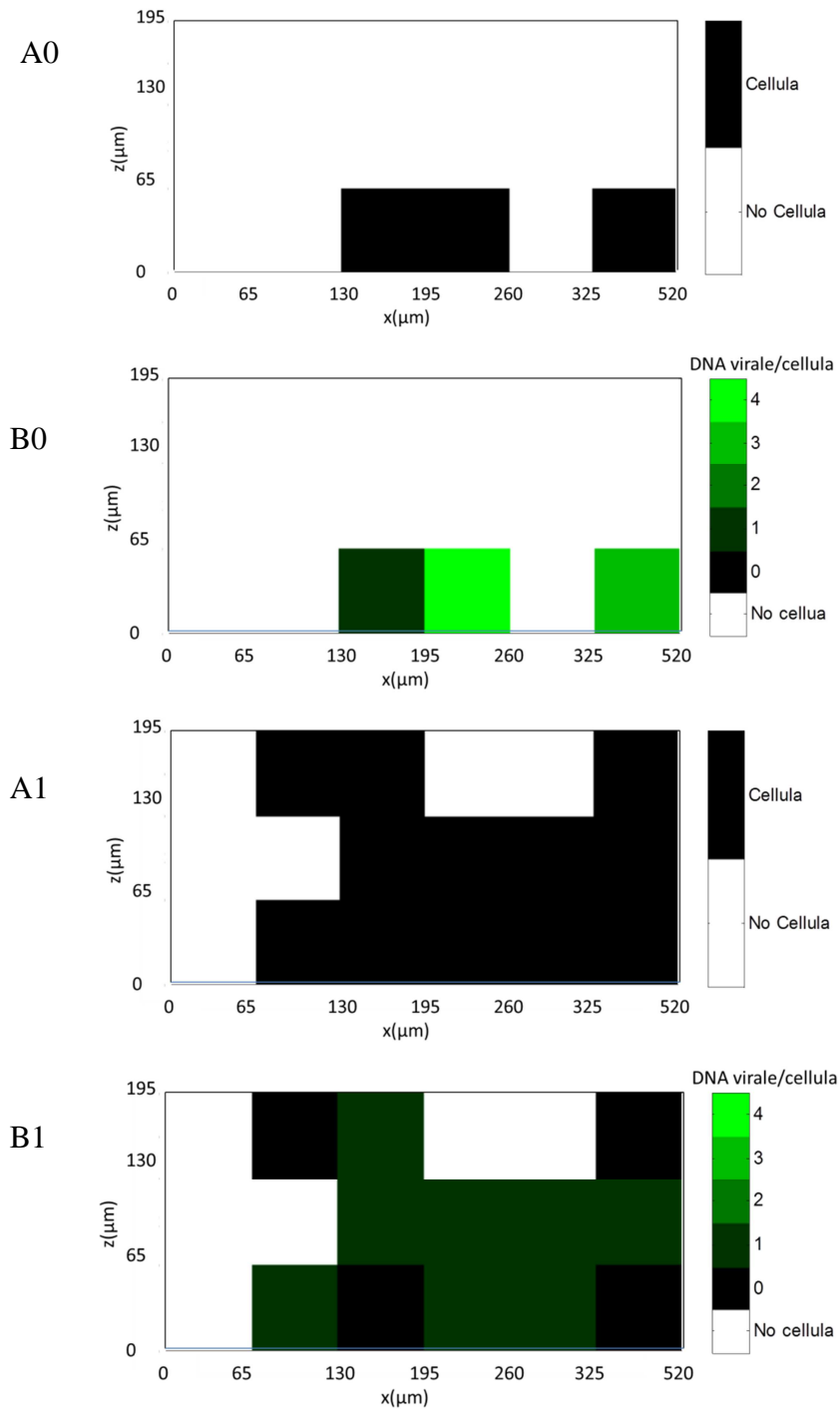


Figura 3.9 Rappresentazione delle matrici A0, A1, B0 e B1; considerando $t_{d_{tot}}=121$ ore.

Un aspetto importante, che si coglie osservando le matrici B0 e B1, è l'evidente diluizione nel tempo del DNA virale nelle cellule. Questo aspetto è evidente nell'istogramma che segue, in cui viene riportata, al tempo iniziale e finale, la percentuale di cellule che hanno il numero di virus indicato in ascissa.

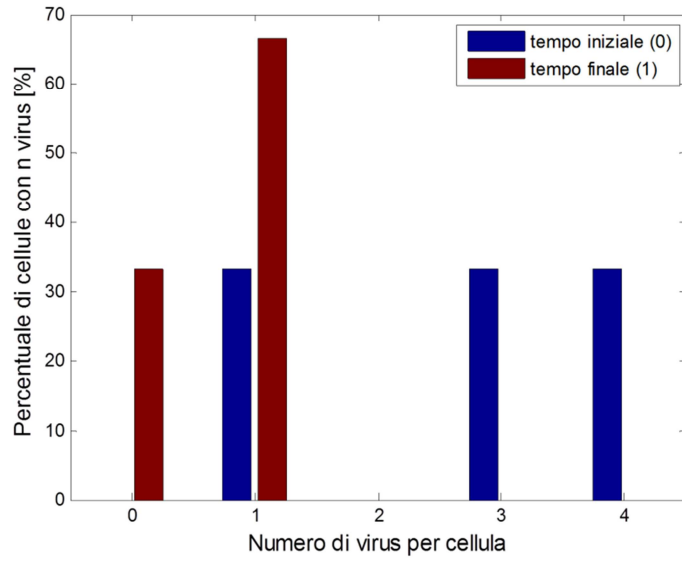


Figura 3.10 Istogramma che indica la diluizione del numero di virus per cellula avvenuta dopo un tempo pari a t_{d_tot} .

3.3.2 Bilanci di materia di mRNA e della Proteina

Per quantificare la sintesi di mRNA e di proteina conseguente alla presenza di DNA esogeno nella cellula si è risolto un sistema di equazioni differenziali ordinarie (ODE) che rappresentano in forma matematica i bilanci di materia di mRNA e della proteina associata. Questi bilanci assumono la forma generale:

ACCUMULO = PRODUZIONE – DEGRADAZIONE, in particolare

$$\begin{cases} \frac{dmRNA(t)}{dt} = K_{trascrizione} DNA(t) - K_{deg.mRNA} mRNA(t) \\ \frac{dP(t)}{dt} = K_{traduzione} mRNA(t) - K_{deg.P} P(t) \end{cases} \quad (3.8)$$

Dove K_i sono le costanti cinetiche che caratterizzano i processi intracellulari, i cui valori ricavati dalla letteratura sono riportati in Tabella 3.1, $mRNA$ e P rappresentano il numero di molecole per cellula di mRNA e proteina, rispettivamente.

Anche in questo caso, per studiare più accuratamente questa fase, si è realizzato un algoritmo indipendente per risolvere il sistema di ODE relativo ad una singola cellula. Le condizioni iniziali poste sono:

$$\begin{cases} mRNA(t=0) = 0 \\ P(t=0) = 0 \end{cases} \quad (3.9)$$

Mentre per il DNA si è generata una sequenza temporale fittizia di numeri del tipo [5 5 5 5 5 ... 3 3 3 3... 1 1 1 1... 0 0 0 0...], dove la dimensione del vettore corrisponde al tempo t_{d_tot} . L'istante in cui si ha un cambiamento indica che è avvenuta una duplicazione anche se la

cellula simulata ha mantenuto tutte le molecole di RNA e proteina. La soluzione numerica del sistema di ODE 3.11 per una cellula è rappresentata in Figura 3.11.

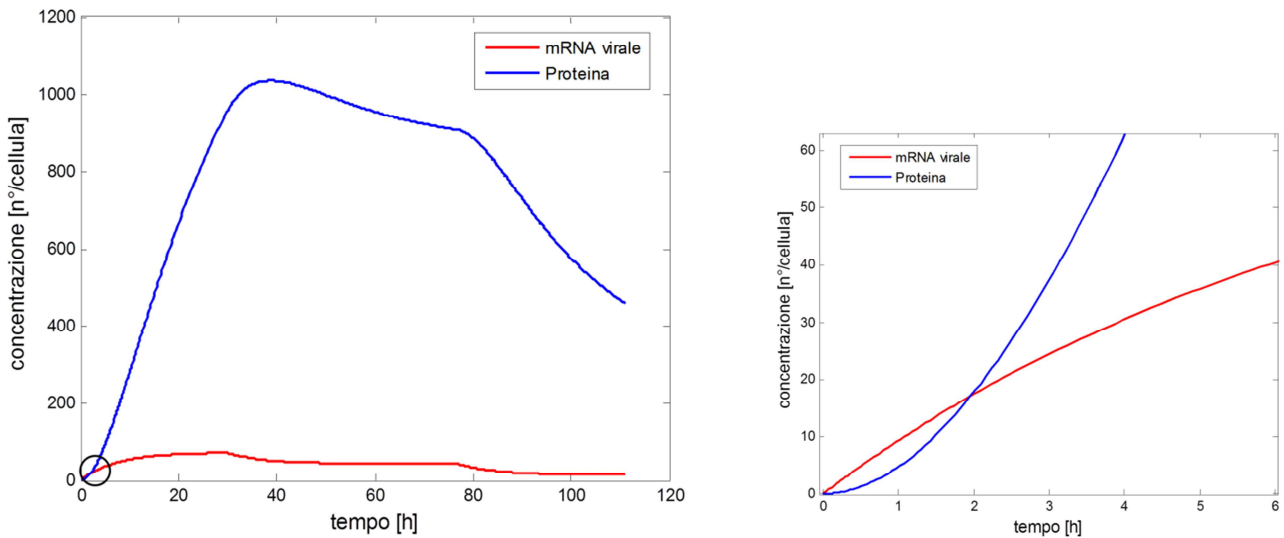


Figura 3.11 A sinistra il profilo temporale di mRNA virale e della proteina associata in una cellula che si duplica variando il suo contenuto di DNA virale; a destra gli stessi andamenti agli istanti iniziali.

Dalla figura si può osservare che il numero di molecole di proteina per cellula è molto maggiore rispetto a quello di mRNA. Inoltre si nota che l'andamento dell'mRNA è costante per alcuni istanti di tempo perché raggiunge lo stato stazionario molto più rapidamente. La Figura 3.12 mostra il confronto tra la risoluzione del bilancio microscopico considerando l'mRNA una variabile continua o discreta.

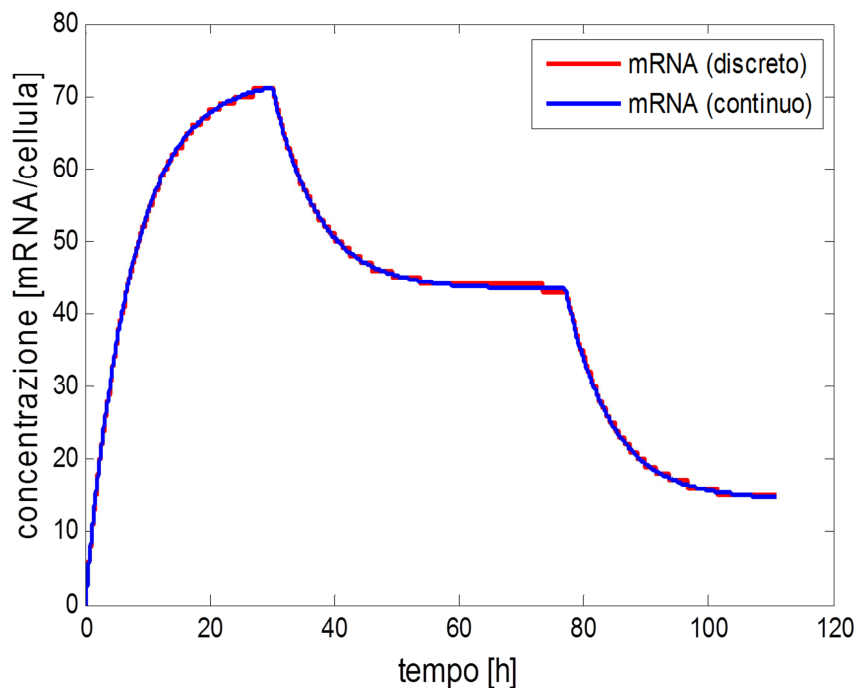


Figura 3.12 Confronto fra mRNA virale risolto con un approccio deterministico e stocastico

Dalla Figura 3.12 si vede come anche nel caso dell'mRNA, il cui numero di molecole per cellula è inferiore a quello delle proteine, la soluzione continua approssima bene quella discreta.

Questa analisi ha permesso di studiare il comportamento nel tempo della produzione e del consumo dell'mRNA virale e della proteina associata. Tale studio giustifica la scelta di trattare l'evoluzione temporale dell'mRNA secondo un approccio deterministico, nonostante la sua natura intrinsecamente discreta.

3.3.3 Bilanci di materia integrati con la duplicazione cellulare

Lo step finale di questa fase di sviluppo del modello è quello di integrare la risoluzione delle ODE (Equazioni 3.11), che rappresentano i bilanci per l'mRNA virale e per la proteina associate, con la duplicazione cellulare. Infatti, il DNA virale compare nel termine di produzione del bilancio dell'mRNA. Il passo successivo consiste nel risolvere le ODE per ogni cellula della coltura microfluidica usando la distribuzione temporale del DNA virale che deriva dall'algoritmo della duplicazione.

Innanzitutto, dopo aver generato le matrici A e B per indicare la posizione delle cellule e il contenuto di DNA in esse, si introducono le matrici C e D che indicano rispettivamente il numero di molecole di mRNA e di proteina presente in ogni cellula. Si è risolto il sistema ODE analiticamente, considerando la variabile DNA come una costante dal momento che varia solo ad ogni duplicazione, quindi con un tempo caratteristico molto più lungo di quelli relativi ai processi di variazione del numero di molecole di mRNA e proteine. Si ottengono così le due equazioni risolutive:

$$\begin{aligned}
 mRNA(t) &= f_1(t, DNA, mRNA(t=0)) = \frac{DNA(e^{K_{deg RNA} t} - 1)K_{trascr} + K_{deg RNA} \cdot RNA0}{K_{deg RNA} e^{K_{deg RNA} t}} \\
 P(t) &= f_2(t, DNA, mRNA(t), mRNA(t=0), P(t=0)) = \\
 &= \{DNA[K_{deg P} e^{K_{deg P} t} - K_{deg RNA} e^{K_{deg RNA} t} + (K_{deg RNA} - K_{deg P})e^{(K_{deg P} + K_{deg RNA})t}] \cdot \\
 &\cdot K_{trad} \cdot K_{trasc} + K_{deg P} \cdot K_{deg RNA} (K_{trad} \cdot RNA0(-e^{K_{deg P} t}))(-K_{deg P} P0 + K_{deg RNA} P0 + \\
 &+ K_{trad} RNA0)\} / \{e^{(K_{deg P} + K_{deg RNA})t} K_{deg P} K_{deg RNA} (K_{deg RNA} - K_{deg P})\}
 \end{aligned} \tag{3.10}$$

Dal punto di vista dell'implementazione dell'algoritmo, all'istante di tempo t e per ogni cellula presente nella coltura microfluidica, avente un numero di molecole di DNA virale pari a DNA, si determinano, tramite le Equazioni 3.10, mRNA e P. Il valore della variabile DNA corrisponde alla quantità di DNA virale che una cellula contiene all'istante di tempo precedente. L'andamento temporale dell'mRNA e della proteina dipende non solo dai tempi caratteristici delle Equazioni 3.10, ma anche da come varia il numero di DNA virale nelle cellule in seguito alla loro duplicazione. All'istante di tempo in cui avviene la duplicazione, oltre a distribuirsi il contenuto di DNA virale nelle cellule figlie, si ripartisce anche la quantità di mRNA e di proteina. Si è utilizzato lo stesso approccio di distribuzione simmetrica,

descritta precedentemente, per i tre tipi di molecole, ma con varianza distinta per le tre variabili (DNA virale, mRNA e proteina). In Figura 3.13 e 3.14 è possibile osservare come, per ogni cellula, la duplicazione influenza il profilo temporale dell'mRNA e della proteina producendo una discontinuità.

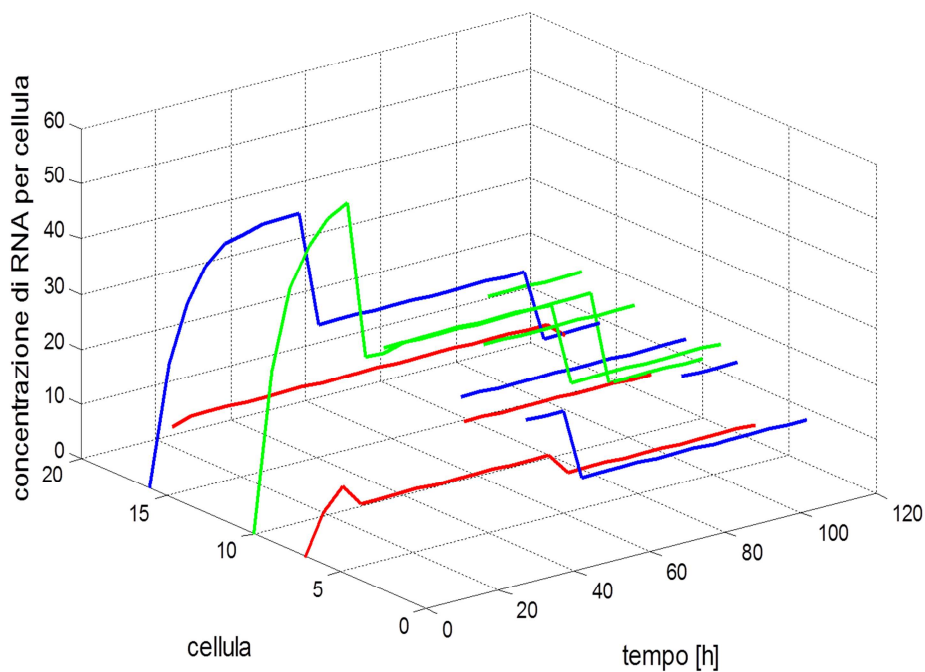


Figura 3.13 Andamento temporale dell'mRNA tenendo conto della duplicazione cellulare; con $\Delta t=5h$

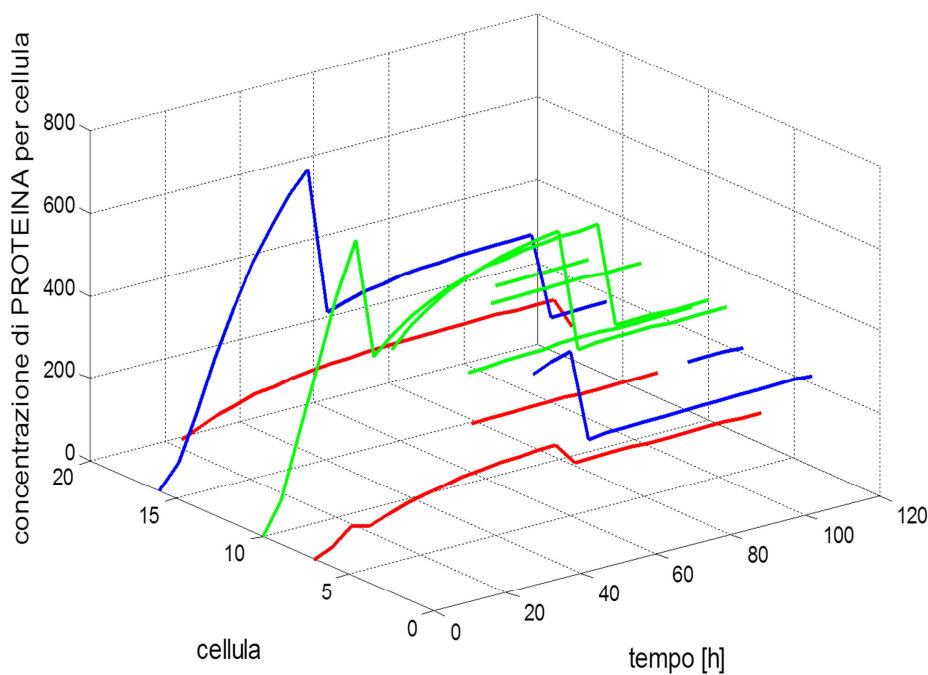


Figura 3.14 Andamento temporale della proteina tenendo conto della duplicazione; con $\Delta t=5h$.

Osservando i grafici riportati nelle Figure 3.13 e 3.14 si osserva che l'effetto della duplicazione è più marcato rispetto ai termini di generazione che compaiono nei bilanci microscopici per l'mRNA e per la proteina. Infatti è evidente la discontinuità negli istanti di tempo in cui avviene la duplicazione.

3.4 Infezioni sequenziali

Per ottenere il maggior numero possibile di cellule *iPS* dalla popolazione cellulare infettata e per il mantenimento dello stato staminale è necessario che il livello di espressione dei fattori di trascrizione sia elevato e prolungato nel tempo. Come si è visto nel paragrafo precedente la duplicazione produce una notevole diluizione del contenuto di DNA virale e con esso anche mRNA e proteina che si è prodotta nella cellula madre fino all'istante della duplicazione. L'entità della diluizione dipende dalla distribuzione asimmetrica che regola la ripartizione di DNA virale, mRNA e proteina. Per mantenere un livello di espressione elevato si eseguono infezioni multiple. I cicli di infezione vengono ripetuti a vari *time-point* ed a *MOI* diversi. Il numero di infezioni da eseguire durante un intero esperimento, i *time-point* di infezione ed i relativi *MOI* sono variabili che nel modello matematico costituiscono 3 gradi di libertà. Prendendo in considerazione un singolo fattore, l'evoluzione temporale di un esperimento viene rappresentata in Figura 3.15.

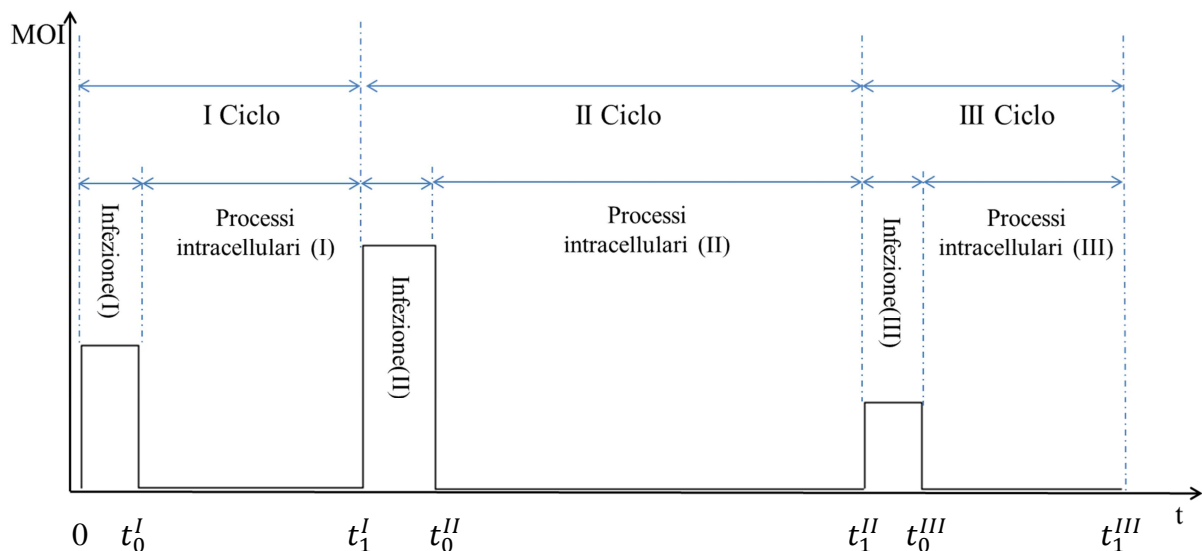


Figura 3.15 Rappresentazione schematica delle infezioni sequenziali con indicata la nomenclatura adottata per i *time-point*, considerando 3 cicli di infezione.

Dalla figura emerge che ogni infezione può essere condotta ad *MOI* diversi, mentre la loro durata rimane costante: 2 minuti per infuse, 90 minuti di statica e 2 minuti di outflow. Il tempo che intercorre tra una infezione e l'altra deve essere scelto in modo tale da limitare

l'effetto di diluizione dovuto alla duplicazione cellulare, ma abbastanza grande da permettere ai processi intracellulari di esprimere adeguatamente il fattore di trascrizione. La nomenclatura adottata per collocare nel tempo ogni fase dell'intero processo è la seguente:
 t_j^i con $j=0:1$ $i=1:n^\circ$ cicli.

3.5 Infezione multifattoriale

Per simulare l'espressione episodica multifattoriale è necessario predisporre il modello matematico in modo tale da modellare non solo infezioni multiple ma anche l'introduzione dei 4 fattori di trascrizione. L'espressione di *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* e *c-Myc* permette alla cellula di attivare i meccanismi di remodeling che consentono di tornare allo stato staminale. Un esempio di esperimento con infezione multifattoriale è riportato in Figura 3.16.

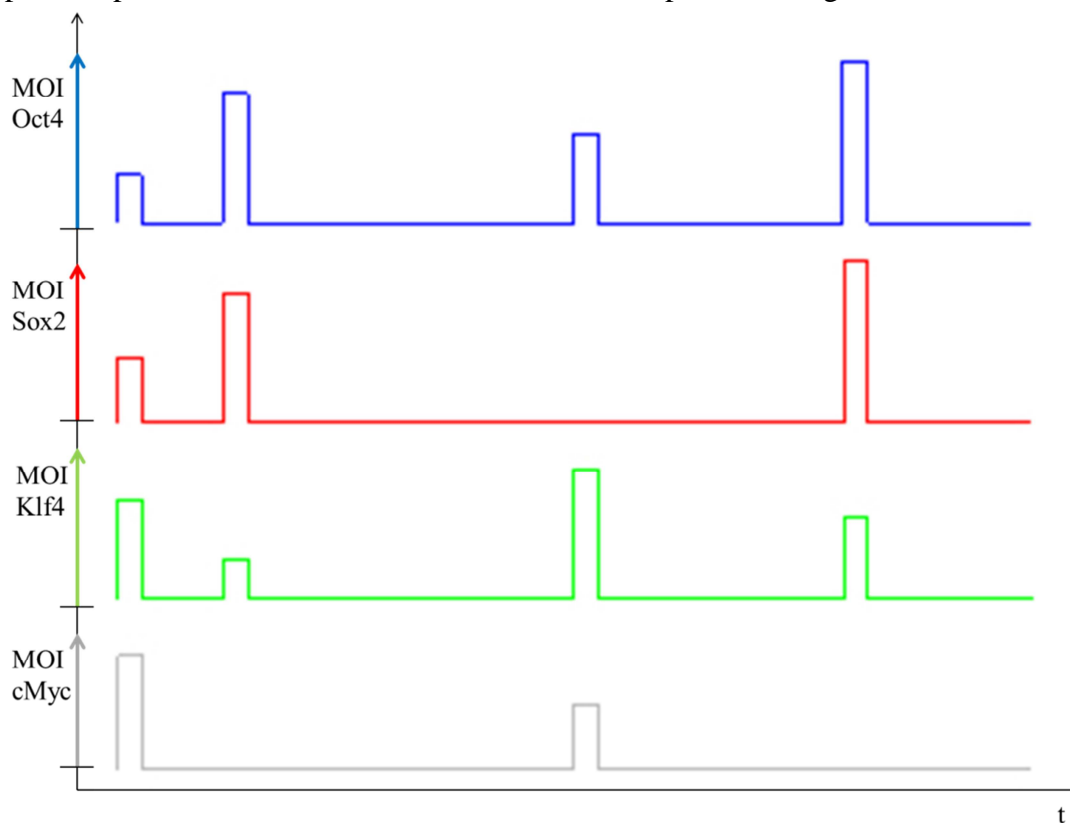


Figura 3.16 Sviluppo temporale di un esperimento con MOI che può variare ad ogni ciclo di infezione, in ordinata è indicato la MOI di ogni fattore di trascrizione.

Ad ogni ciclo le cellule vengono infettate con una sospensione caratterizzata da 4 MOI generalmente differenti. In questo modo è possibile infettare le cellule con rapporti stechiometrici virali più noti in letteratura, per esempio MOI 3(Oct4):1(Sox2):1(Klf4):1(cMyc). In particolare si può anche non effettuare un'infezione ad un certo ciclo e per un tipo di virus, condizione verificata per $MOI_j^i = 0$ con $j=1:4$ e $i=1:n^\circ$ cicli di infezione.

Le combinazioni che si possono ottenere, tra numero di cicli di infezione rapporti stechiometrici tra i 4 fattori ed i relativi MOI sono numerose. È in questi termini che il modello stocastico sviluppato serve da supporto tecnico: il programma implementato in MATLAB funge da “laboratorio virtuale” per eseguire una progettazione sperimentale (*experimental design*). Analizzando i risultati che fornisce il modello, è possibile selezionare una serie di condizioni operative da testare in laboratorio.

3.5.1 Metodo di implementazione nel software

Il modello è stato sviluppato andando a modellare in maniera indipendente le diverse fasi dell’esperimento: infezione virale e processi intracellulari. Questo ha permesso di studiare in dettaglio l’algoritmo che traduce in linguaggio matematico i processi biologici e poterli ottimizzare in maniera indipendente. Una volta simulate queste fasi, esse sono state integrate in modo tale che i dati output del modello di infezione forniscano gli input del modello che descrive i processi intracellulari, come rappresenta la Figura 3.17.

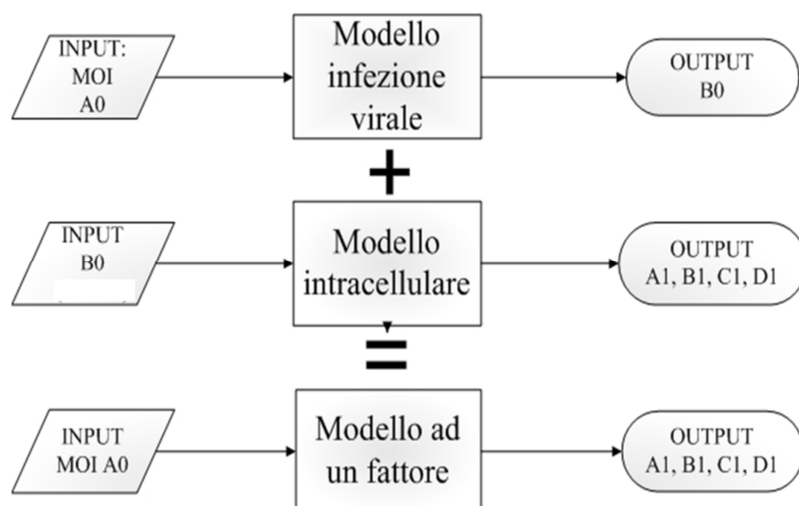


Figura 3.17 Fase di sviluppo del modello ad un fattore

A questo punto il programma è in grado di simulare l’espressione della popolazione cellulare per un fattore di trascrizione. Le infezioni con i 4 fattori sono state introdotte in parallelo per poi unire i risultati andando ad analizzare l’espressione proteica derivante dai 4 tipi di virus. Successivamente si è predisposto l’algoritmo in modo tale da poter simulare più infezioni in serie ed andando a salvare i risultati alla fine di ogni ciclo di infezione. L’algoritmo è rappresentato in Figura 3.18.

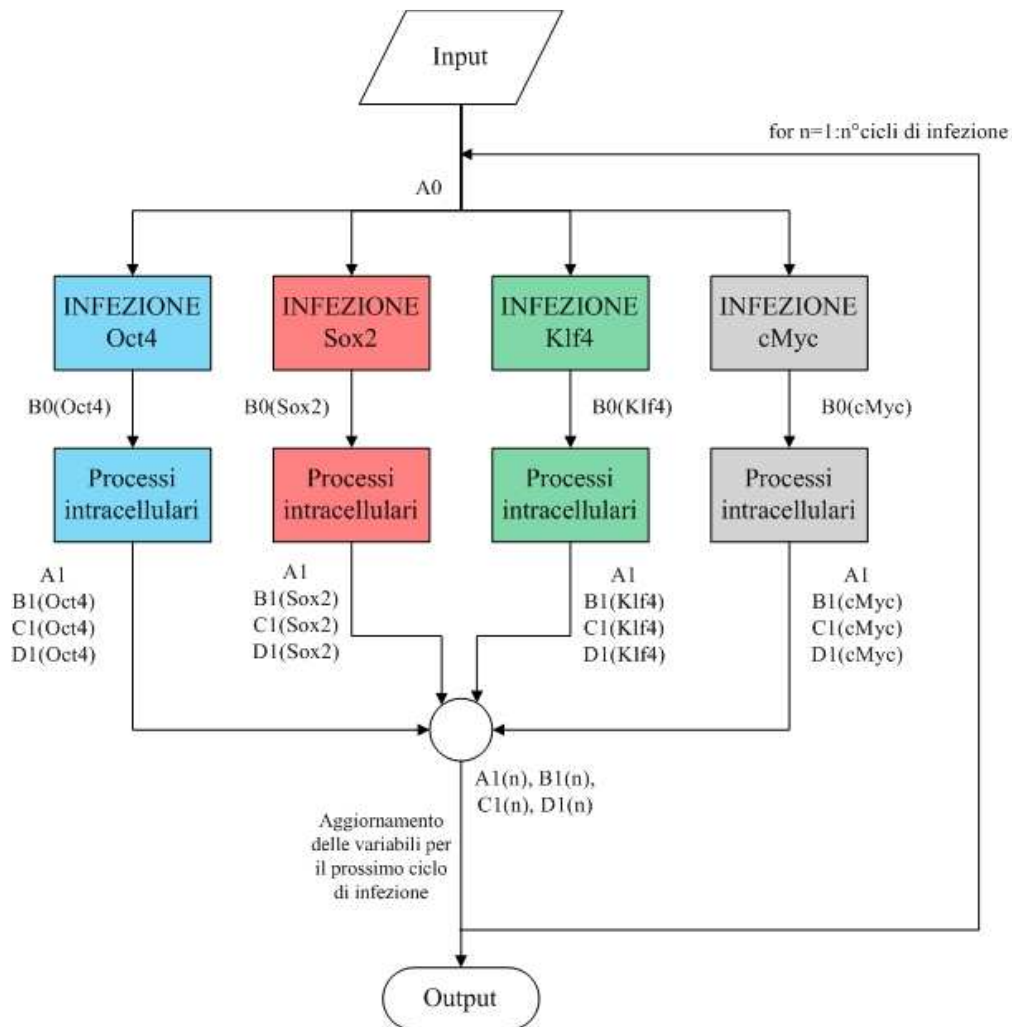


Figura 3.18 Diagramma di flusso che permette di simulare il processo di riprogrammazione fino all'espressione citoplasmatica dei quattro fattori con infezioni multiple.

Nel diagramma di flusso si parte da una popolazione cellulare identificata dalla matrice A_0 che viene infettata in modo differente dai 4 virus (a seconda di ciascun MOI). Dopo ogni blocco relativo all'infezione si ottengono 4 matrici B_0 diverse (matrici che rappresentano il numero di virus per cellula in tutta la popolazione) aventi la stessa griglia cellulare rappresentata da A_0 . Ogni matrice B_0 viene elaborata dal blocco dei processi intracellulari, ciascuno dei quali elabora in modo separato l'espressione di mRNA e di proteina a seconda del tipo di fattore. I risultati vengono salvati ogni 5 ore di simulazione (considerando che il tempo tra un'infezione e l'altra è dell'ordine delle decine di ore). È importante precisare che, mentre i processi di sintesi di mRNA e proteina sono gestiti in maniera indipendente, la duplicazione cellulare evolve nel tempo allo stesso modo in tutti e 4 i casi, sebbene ogni blocco venga eseguito in parallelo. Questa condizione è necessaria per unire i risultati in maniera coerente facendo in modo che la griglia sia la stessa. Come discusso nel paragrafo 3.3.1.1 il posizionamento di una delle cellule figlie avviene in modo casuale nella griglia

rappresentata dalla matrice A_0 . Per fare in modo che ciascuno dei 4 blocchi dei processi intracellulari elaborino la stessa informazione su A_0 si è fissato il *seed* relativo alla generazione di numeri casuali che determina la posizione delle cellule figlie. In questo modo la matrice A_1 viene aggiornata ad ogni time-point nello stesso modo e questo consente di considerare in maniera indipendente i processi intracellulari caratteristici di ogni tipo di fattore facendo riferimento alla stessa popolazione cellulare. Fisicamente questo vuol dire assumere che non vi sia alcun genere di interazione né tra il moto dei 4 tipi di virus nella sospensione né nei processi di trascrizione e traduzione che portano l'espressione dei 4 fattori. Nel riprodurre la duplicazione cellulare nel tempo simulato si è assunto che durante la fase di infezione, che dura 94 minuti (2 minuti di infuse, 90 di statica e 2 di outflow), nessuna cellula si duplichi. Perciò la legge logistica non è stata implementata nella *function* che regola l'infezione virale. Questa considerazione è giustificata dal fatto che il tempo di duplicazione ottenuto da *fitting* di dati sperimentali è di 37 ore (Figura 2.19) che è nettamente maggiore rispetto la durata dell'infezione; inoltre il tempo di discretizzazione adottato per simulare i processi intracellulari Δt è di 5 ore.

3.6 DNA binding

Dopo aver simulato i cicli di infezione, compresi i processi intracellulari, il modello fornisce la quantità di ciascuno dei quattro fattori di trascrizione (FT) che viene espresso nel citoplasma di ogni cellula della popolazione. I processi biologici che seguono comprendono la traslocazione dei quattro fattori nel nucleo cellulare e quindi l'attacco di essi (binding) ai promotori dei geni target, che sono stati identificati in letteratura [Kim and Orkin *et al.*, 2008]. Orkin *et al.*, studiando l'intero genoma di cellule embrionali murine, hanno identificato i promotori dei geni target dei fattori che regolano la riprogrammazione delle cellule somatiche: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* e *c-Myc*. Una volta che questi 4 fattori si sono legati ai promotori target vengono attivati i complessi meccanismi di *remodeling* genetico che portano la cellula allo stato staminale. Questi geni target sono riportati in Appendice F. Questi dati forniti in letteratura sono stati impiegati nel modello stocastico per tracciare una mappatura di quei promotori che vengono occupati, con varie combinazioni, dai fattori sintetizzati nel citoplasma. La Figura 3.19 mostra il numero di promotori target comuni a più fattori.

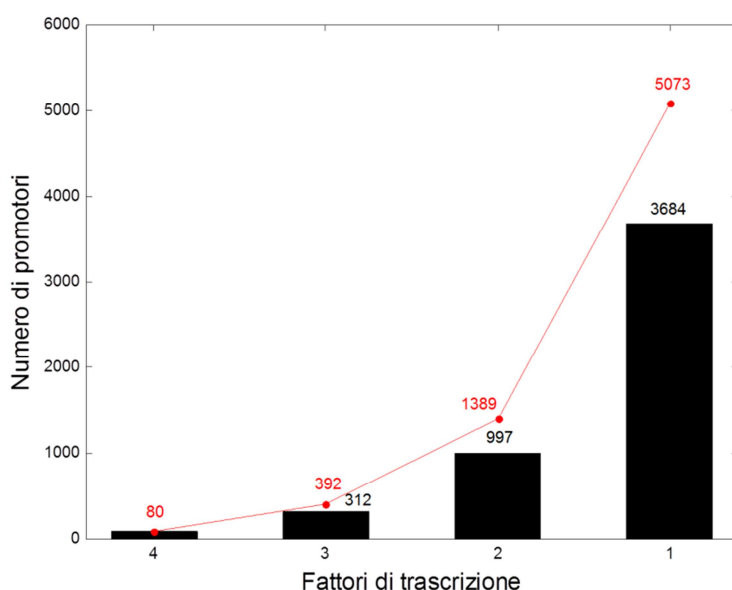


Figura 3.19 Numero di target comuni a più fattori. L'ordinata rappresenta il numero di promotori target occupati dai fattori di trascrizione. I punti rossi rappresentano i promotori target accumulati.

La Figura 3.19 mostra che in confronto ai 5073 target che vengono attaccati in diverse combinazioni dai quattro fattori, il 60% vengono occupati da solo uno dei quattro fattori. Tutte le possibili combinazioni con cui Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc si attaccano ai promotori dei geni target vengono riportate in Figura 3.20.

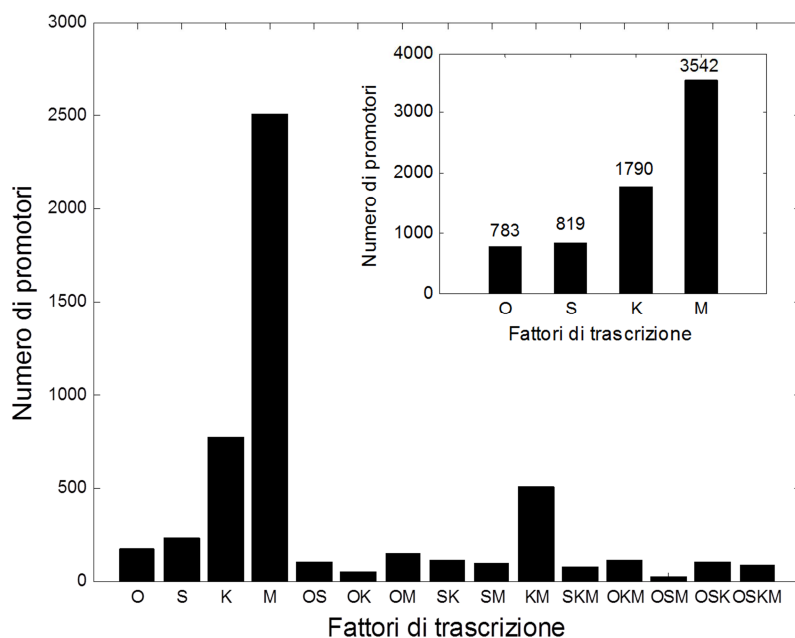


Figura 3.20 Numero di promotori che vengono occupati dalle possibili combinazioni. Il box rappresenta in forma di istogramma la tabella 3.1 [Kim and Orkin et al., 2008]. Nomenclatura: O=Oct4, S=Sox2, K=Klf4, M=c-Myc, OS=Oct4-Sox2, OM=Oct4-c-Myc, SK=Sox2-Klf4, KM=Klf4-c-Myc, SKM=Sox2-Klf4-c-Myc, OKM=Oct4-Klf4-c-Myc, OSM=Oct4-Sox2-c-Myc, OSKM=Oct4-Sox2-Klf4-c-Myc.

Si può interpretare la Figura 3.20 con il seguente esempio: delle 783 proteine di Oct4 che si attaccano ai promotori, 250 si legano singolarmente (in ascissa O), 101 si legano con Sox2 (OS), 46 con Klf4 (OK), 148 con c-Myc (OM), 108 si legano sia con Klf4 che con c-Myc (OKM), 26 con Sox2 e c-Myc(OSM), 101 con Sox2 e Klf4(OSK) e 80 si legano con gli altri tre (OSKM). Dal punto di vista biologico i quattro tipi di fattori di trascrizione prodotti nel citoplasma traslocano nel nucleo e si possono legare ai promotori dei geni target sia indipendentemente gli uni dagli altri sia secondo meccanismi di cooperazione. Questo concetto viene rappresentato in Figura 3.21.

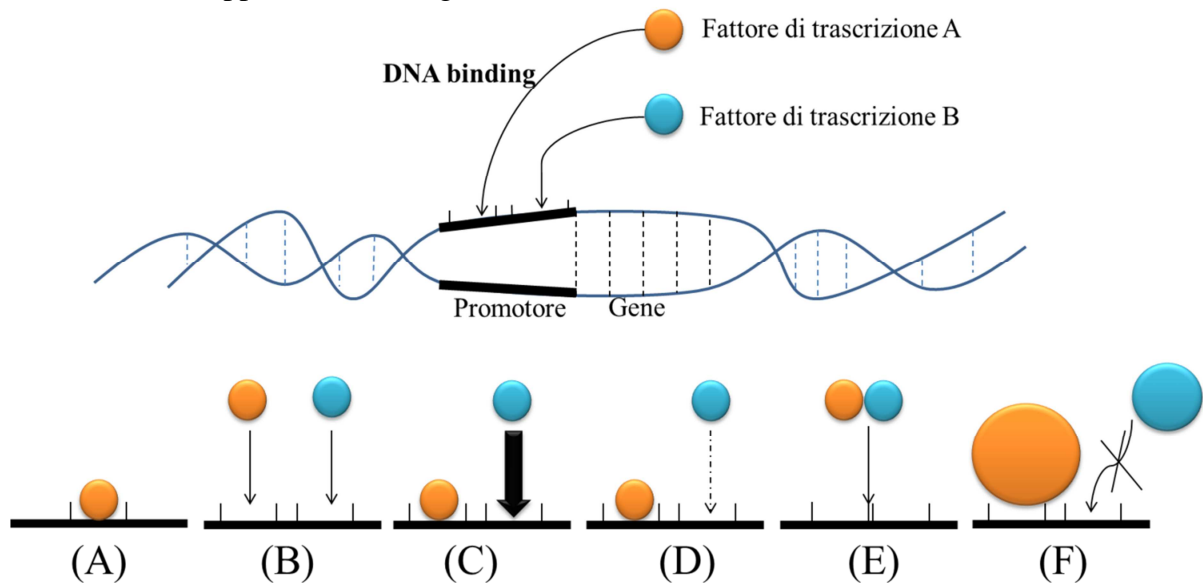


Figura 3.21 Meccanismi cooperativi che intervengono nel DNA binding: A) Probabilità del fattore A di attaccarsi al promotore; B) Probabilità di attacco indipendente tra i fattori; C) Meccanismo cooperativo positivo; D) Meccanismo cooperativo negativo; E) Meccanismo di attacco tramite formazione di etero-dimero; F) Occlusione di attacco causato dall'ingombro sterico di un fattore.

La letteratura mostra che, in riferimento ai 4 fattori di trascrizione di interesse, Oct4 e Sox2 interagiscono secondo un meccanismo cooperativo positivo (Figura 3.21 C), mentre Klf4 e c-Myc si legano ai promotori target in maniera indipendente dagli altri. La Figura 3.20 identifica i promotori dei geni target dei 4 fattori di trascrizione di interesse. Queste identificazioni costituiscono i dati input dell'ultima parte del modello stocastico, ovvero quella che descrive i meccanismi di DNA binding delle proteine espresse nel citoplasma in seguito ai cicli di infezioni simulati.

3.7 Parametri del modello matematico

Fino ad ora si è descritto il modello stocastico sviluppato e come l'algoritmo implementato traduce in linguaggio matematico i meccanismi cellulari che intervengono nel processo di riprogrammazione. In Tabella 3.1 vengono riportati i parametri del modello, con il relativo valore e significato, mentre in Tabella 3.2 vengono indicati i gradi di libertà del modello.

Tabella 3.1 Parametri utilizzati nel modello.

Nome Variabile	Simbolo	Valore	Oggetto matematico	Riferimenti bibliografici
Diametro cellulare	d_cell	65 μm	Scalare	Ricavato sperimentalmente
Portata infuse e outflow	Qtot	6 $\mu\text{L}/\text{min}$	Scalare	
Coefficiente di diffusione del virus e medium	D_vf	3,67 $\mu\text{m}^2/\text{s}$	Scalare	[Andrews et al]
Probabilità di adsorbimento	p [†]	0.0079 s ^{-0.5}	Scalare	Ricavato sperimentalmente
Costante cinetica di trascrizione di DNA	K_transcription	1.98 s ⁻¹	Scalare	[Reddy et al., 1999]
Costante cinetica di degradazione mRNA	K_deg_mRNA	0,1368 s ⁻¹	Scalare	[Jackson et al., 2000]
Costante cinetica di traduzione di mRNA	K_translation	1,008 s ⁻¹	Scalare	[Yildirim et al., 2003]
Costante cinetica di degradaione della proteina	K_deg_prot	0,0504 s ⁻¹	Scalare	[Bachmair et al., 1986]
Tempo di duplicazione	td	37 h	Scalare	Ricavato sperimentalmente
Concentrazione cellulare di confluenza	Kconc	234 cell/mm ²	Scalare	Ricavato sperimentalmente

Tabella 3.2 Nomenclatura.

Nome Variabile	Simbolo
Griglia cellulare	A
Numero di DNA virale nella popolazione cellulare	B
Numero di molecole di mRNA nella popolazione cellulare	C
Numero di proteine nella popolazione cellulare	D

Tabella 3.3 Gradi di libertà.

Nome Variabile	Simbolo
Numero cicli di infezione	n_infezioni
Rapporti stechiometrici	rapporti_stech
Multiplicity of infection	MOI
Tempo inter-infezione	ti_i
Concentrazione cellulare iniziale	Conc_semina

La Tabella 3.3 indica che i gradi di libertà del sistema sono: $n_{infezioni}$, $rapporti_{stech}$, MOI , t_{i_i} e $Conc_{semina}$. In generale i gradi di libertà sono le variabili da fissare nel sistema di equazioni per ottenere una soluzione univoca. Nel contesto di questa tesi le variabili citate costituiscono le condizioni operative sperimentali su cui si può agire per correlare il rilascio del DNA virale ai meccanismi dei fattori di trascrizione esogeni che regolano il remodeling cellulare mediante binding al DNA cellulare. I risultati del modello stocastico permetteranno di caratterizzare questa correlazione affinché si possa massimizzare l'efficienza di riprogrammazione, che è l'obiettivo finale del progetto in corso al laboratorio BioERA.

Nel prossimo capitolo verranno mostrati i risultati delle simulazioni eseguite.

Capitolo 4

Risultati del modello

In questo capitolo vengono mostrati i risultati elaborati dai dati *output* che fornisce il modello stocastico. Questi risultati fanno riferimento alle condizioni nominali di simulazione riportate nel paragrafo 4.1. Ogni paragrafo di questo capitolo è dedicato al post-processing di una determinata fase del processo ed alla relativa analisi. Infine verranno riportati alcuni grafici significativi che evidenziano la variazione stocastica a cui sono soggetti i risultati.

4.1 Condizioni nominali di simulazione

Le simulazioni sono state condotte fissando i gradi di libertà del modello. In particolare in Tabella 4.1, sono indicati i valori attribuiti alle variabili operative. Inoltre, si sono svolte prove a due MOI diversi.

Tabella 4.1 Valori dei gradi di libertà

Variabile	Valore
Concentrazione di semina, <i>Conc_semina</i>	$80 \cdot 10^{-6}$ cellule/ μm^2
Rapporti stechiometrici, <i>rapporti_stec</i>	3(Oct4) : 1(Sox2) : 1(Klf4) : 1(c-Myc)
N° cicli di infezione, <i>n_infezioni</i>	2
Durata dei processi intracellulari, <i>ti_i</i>	(121, 121) h
MOI (prima simulazione)	1 [n°virus/cellula]
MOI (seconda simulazione)	20 [n°virus/cellula]

I risultati che seguono fanno riferimento alle condizioni operative riportate in Tabella 4.1.

4.2 Duplicazione cellulare

In riferimento all'equazione logistica (Equazione 2.6) viene mostrata in Figura 4.1 l'aumento del numero di cellule della popolazione cellulare coltivata nel canale microfluidico.

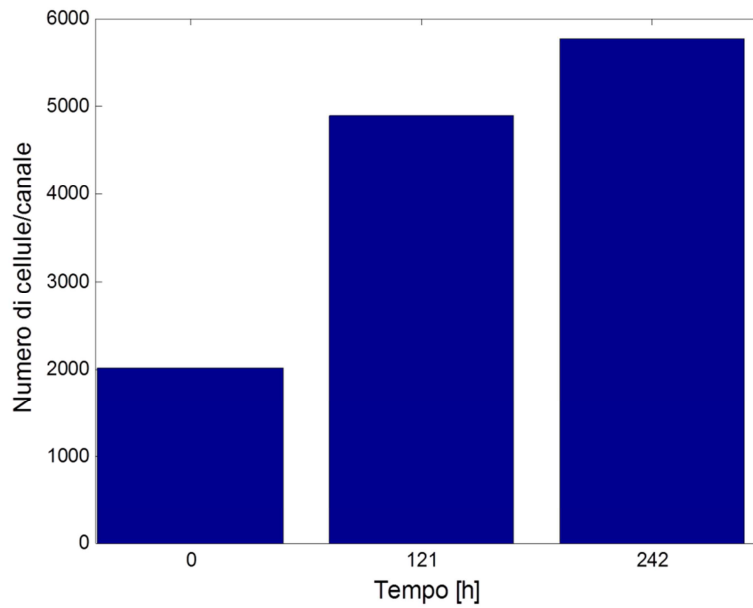


Figura 4.1 L'istogramma indica il numero di cellule presenti nella coltura cellulare simulata all'istante iniziale, dopo il primo ed il secondo ciclo di infezione (rispettivamente t_1^I e t_1^{II} di Figura 3.15).

Dalla Figura 4.1 emerge che partendo da un numero di cellule nel canale iniziale pari a 2000, dopo 121 ore dalla prima infezione il numero di cellule aumenta del 112%, mentre dopo altre 121 ore dalla seconda infezione l'incremento è nettamente inferiore: 8%. Questo tipo di evoluzione è dovuto all'andamento della legge logistica caratterizzata qualitativamente da una sigmoide (Figura 2.15): infatti dopo 121 ore dalla prima infezione il numero di cellule per unità di superficie raggiunge quasi la concentrazione di confluenza $K_{conc} = 234 \text{ cellule/mm}^2$. Per questo motivo la derivata prima di tale andamento diminuisce molto in quanto la curva di crescita tende ad assumere un valore costante.

La Figura 4.2 rappresenta la simulazione della crescita cellulare all'interno del canale microfluidico (matrice A) agli stessi istanti di tempo della Figura 4.1.

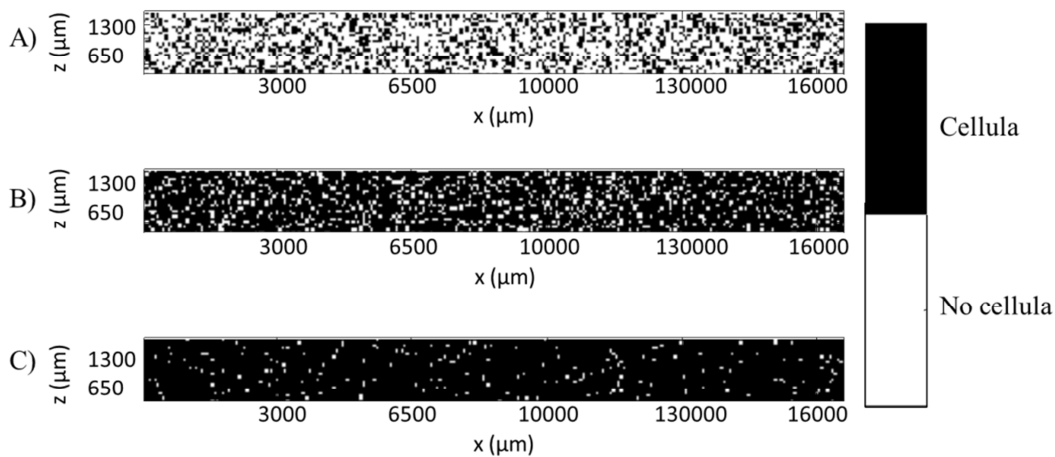


Figura 4.2 Rappresentazione della griglia di celle che simula la distribuzione spaziale delle cellule adese nel canale microfluidico; A) matrice $A(t_0^I)$, B) matrice $A(t_1^I)$, C) matrice $A(t_1^{II})$.

Dalla rappresentazione visiva della matrice A si comprende che tra t_0^I e t_1^I il numero di cellule aumenta molto perché questo periodo include la fase di crescita esponenziale, prima del punto di flesso della sigmoide (Figura 3.7), mentre nel periodo tra t_1^I e t_1^{II} si è quasi raggiunta la concentrazione di confluenza. Oltre alla duplicazione, i processi intracellulari implementati nel programma descrivono l'andamento temporale dell'mRNA virale e dei fattori di trascrizione esogeni. Si è assunto che la duplicazione cellulare non sia influenzata dalla quantità di mRNA virale né di proteina contenute nella cellula.

4.3 Rilascio di DNA virale nella popolazione cellulare

Nei 94 minuti in cui avviene l'infezione un certo numero di virus, muovendosi di moto browniano, è stato adsorbito sullo strato cellulare ed ha rilasciato nelle cellule il proprio DNA virale contenente i geni che codificano per i fattori di trascrizione. La quantità di cellule infettate è funzione della traiettoria che compiono i virus, della probabilità di infezione e dell'MOI. Dal momento che sono state simulate due condizioni per la MOI i risultati vengono mostrati separatamente.

4.3.1 DNA virale nella popolazione cellulare per MOI 1

La Figura 4.3 mostra l'andamento nel tempo della percentuale di cellule positive a ciascuno dei 4 fattori, ovvero quelle cellule che contengono almeno una molecola di DNA virale, ricordando che tale variabile è una quantità discreta. I risultati ottenuti fanno riferimento a 10 simulazioni eseguite.

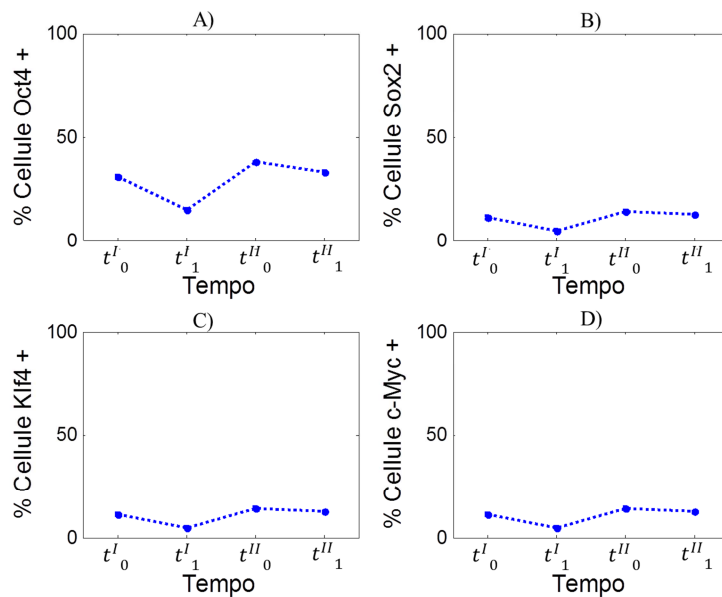


Figura 4.3 Profilo temporale della percentuale di cellule positive per MOI 1, con rapporti stechiometrici 3:1:1:1; A) Oct4, B) Sox2 C) Klf4 D) c-Myc. La barra di errore indica la deviazione standard di 10 simulazioni stocastiche eseguite.

Poiché l'infezione è stata condotta con rapporti stechiometrici 3:1:1:1, la percentuale di cellule positive a Oct4 è circa il doppio rispetto quelle positive a Sox2, Klf4 e c-Myc. Da questo risultato si comprende che non vi è una corrispondenza lineare tra MOI ed efficienza di infezione. Ciò è dovuto all'effetto stocastico del processo di infezione regolato dal moto dei virus. Dal momento che i rapporti stechiometrici tra Sox2, Klf4 e c-Myc sono pari a 1, si ottengono risultati *statisticamente equivalenti* per questi tre fattori. Questo concetto vale anche per i risultati che verranno analizzati in seguito. È possibile inoltre notare una diminuzione della percentuale di cellule positive che avviene tra i tempi t_0^I e t_1^I , e tra t_0^{II} e t_1^{II} . Questa diminuzione è dovuta alla duplicazione cellulare che porta ad una diluizione del DNA virale contenuto nelle cellule madri e che si ripartisce secondo la distribuzione in Figura 3.8. Perciò avviene una diminuzione del numero di cellule positive perché, per esempio, se all'istante 0 una cellula conteneva una molecola di DNA virale, dopo la sua duplicazione se ne è formata una con nessuna molecola di DNA contenuta all'interno e una con una molecola di DNA virale, di conseguenza aumenta il numero di cellule non positive. L'incremento che emerge tra t_1^I e t_0^{II} è dovuto alla somministrazione di nuovi virus durante il secondo ciclo di infezione. Si può notare che i risultati relativi alla percentuale di cellule positive hanno una bassa variabilità stocastica, essendo la deviazione standard bassa (in Figura 4.3 la barra di errore è più piccola del marker impiegato). Il basso valore della deviazione standard è dovuto al fatto che la variazione stocastica si distribuisce su un numero elevato di cellule, perciò le 10 simulazioni eseguite risentono poco della fluttuazione stocastica.

Un'analisi più precisa della quantità di DNA virale viene fornita dalla Figura 4.4 che indica la percentuale di cellule che contengono un certo numero di molecole di DNA virale, indicato in ascissa.

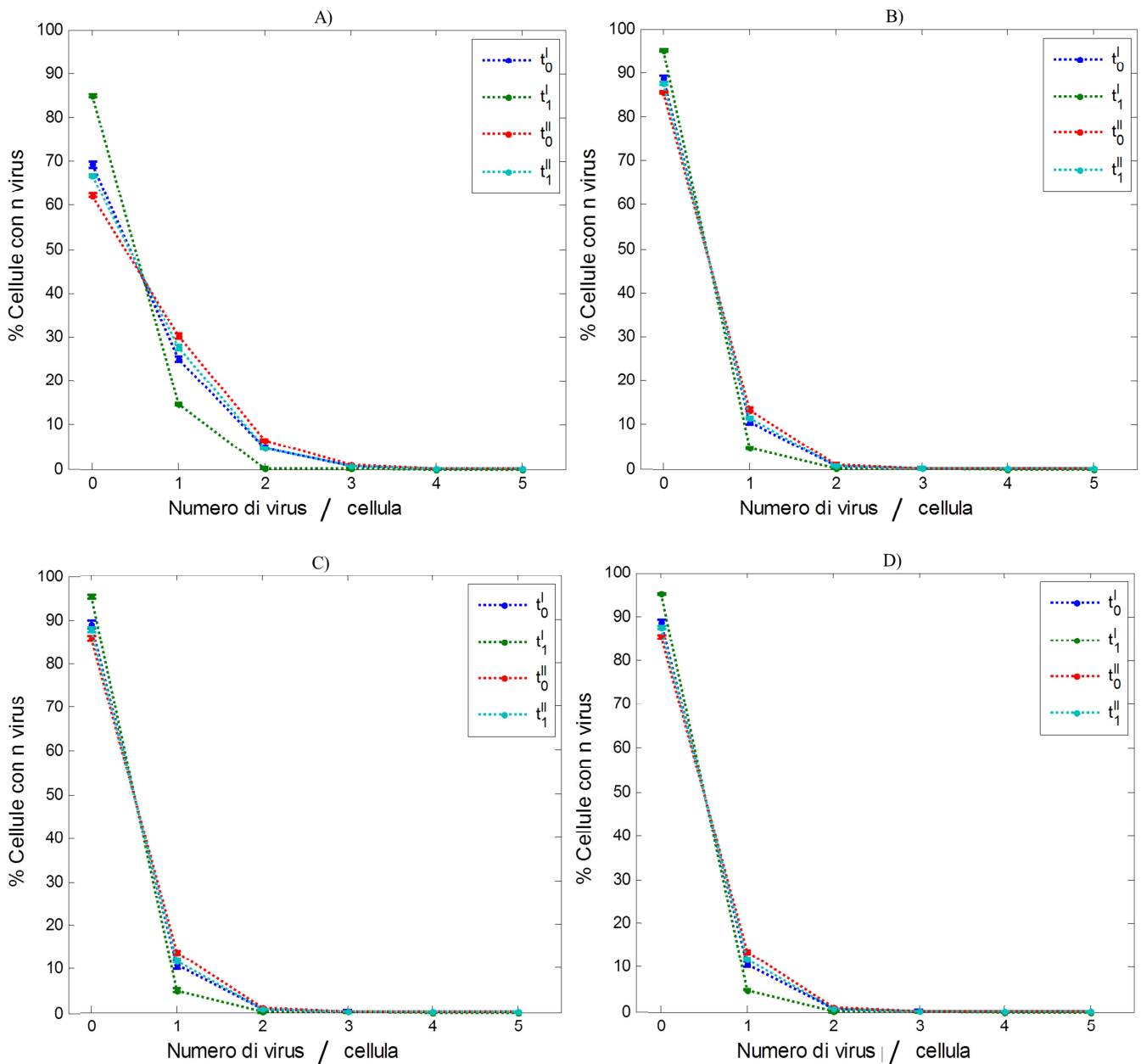


Figura 4.4 Percentuale di cellule presenti nella popolazione che contengono un certo numero di molecole di DNA virale indicato, in ascissa, per MOI 1; A) Oct4, B) Sox2 C) Klf4 D) c-Myc. La barra di errore indica la deviazione standard di 10 simulazioni stocastiche eseguite.

L'andamento qualitativo dei grafici della Figura 4.4 conferma i risultati presentati in Figura 4.3: si ha una diluizione della quantità di DNA virale contenuta nella popolazione tra il tempo t_0^I e t_1^I , e tra t_0^{II} e t_1^{II} con uno spostamento delle curve verso sinistra e un aumento del numero di cellule non contenenti nessun virus. Inoltre, gli andamenti per Sox2 Klf4 e c-Myc sono statisticamente equivalenti mentre per Oct4, fornito in eccesso rispetto agli altri fattori, è minore il numero di cellule non infettate ed è presente un numero di cellule significativo contenente 2 virus.

Analizzando il virus contenente Oct4, alla fine del II ciclo si ottiene un 30% della popolazione che è infetta da una sola molecola di DNA virale, mentre il 10% è infettato da 2 molecole di DNA. Focalizzandosi sul fattore Oct4, queste percentuali vanno diminuendo con l'aumento del numero di DNA virale all'interno della cellula: si va da un 40% delle cellule che hanno una molecola di DNA virale, ad un 3% che ne hanno cinque, ma per avere una tale quantità si è dovuto ricorrere al secondo ciclo di infezione. Osservando i grafici relativi agli altri tre fattori si nota, come ci si aspettava, che le percentuali di cellule positive al DNA virale contenente Sox2, Klf4 e c-Myc sono nettamente inferiori rispetto Oct4. In particolare il 10% della popolazione è positiva a una molecola di DNA di Sox2 mentre solo l'1% è positivo a 2 molecole. In generale il numero di molecole di DNA virale in tutti e quattro i casi è piccolo, questo è dovuto dal fatto che la MOI è 1. Perciò è statisticamente improbabile che una percentuale consistente di cellule abbia almeno 2 DNA virali per ciascuno dei 4 fattori di trascrizione. Si ricorda inoltre che questa condizione è necessaria, anche se non sufficiente, per indurre i meccanismi di *reprogramming*. Inoltre la diluizione per effetto della duplicazione cellulare è molto inferiore durante il secondo ciclo di infezione rispetto il primo. Ciò è dovuto dal fatto che già dopo il primo tempo di inter-infezione si è quasi raggiunta la concentrazione di confluenza.

Un dettaglio maggiore viene fornito dalle Figure 4.5-6-7 che rappresentano il substrato microfluidico, sul quale è adesa la popolazione cellulare. L'intensità del verde indica il numero di DNA virale presente in ciascuna cellula, mentre le zone colorate in nero rappresentano la posizione delle cellule che non hanno molecole di DNA.

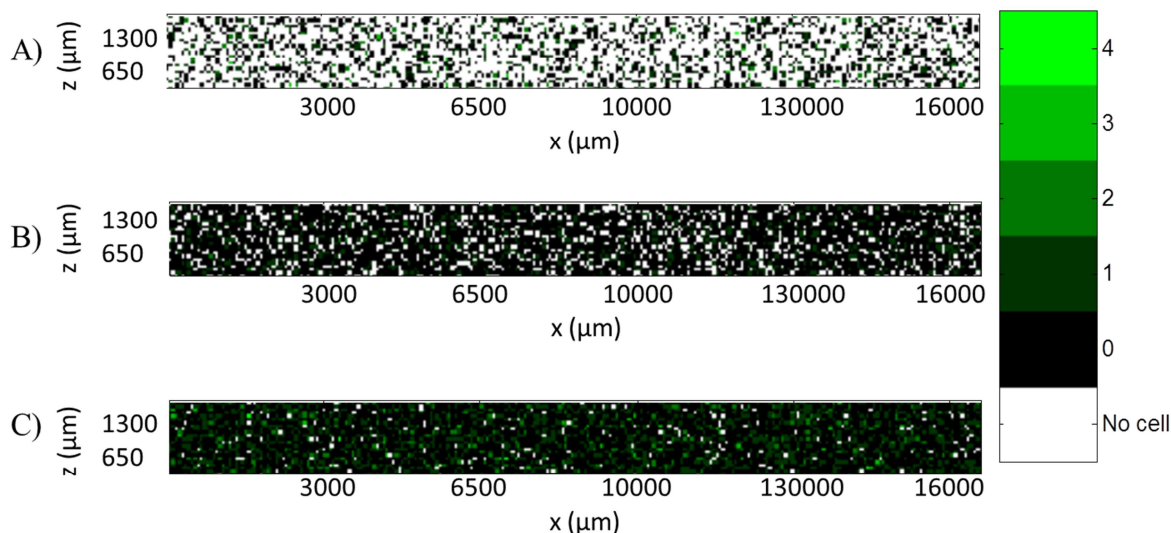


Figura 4.5 Numero di molecole di DNA, che codifica per Oct4, contenuto in ogni cellula della popolazione adesa sul substrato microfluidico all'inizio ed al termine di ogni ciclo di infezione con MOI 3; A) matrice $B(t_0^I)$, B) matrice $B(t_1^I)$, C) matrice $B(t_1^{II})$.

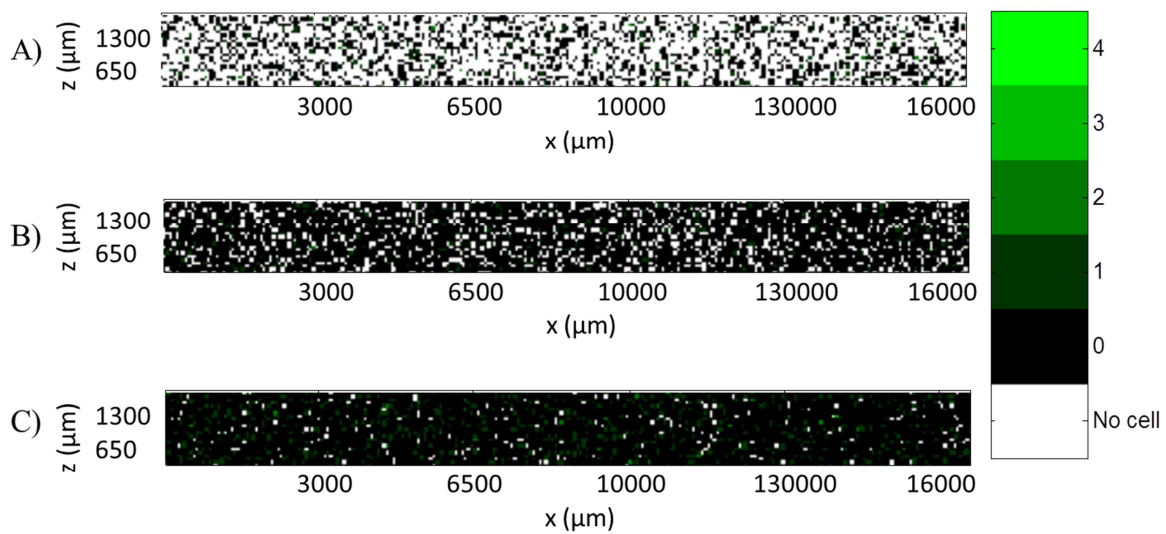


Figura 4.6 Numero di molecole di DNA, che codifica per Sox2, contenuto in ogni cellula della popolazione adesa sul substrato microfluidico all'inizio ed al termine di ogni ciclo di infezione con MOI 1; A) matrice $B(t_0^I)$, B) matrice $B(t_1^I)$, C) matrice $B(t_1^{II})$.

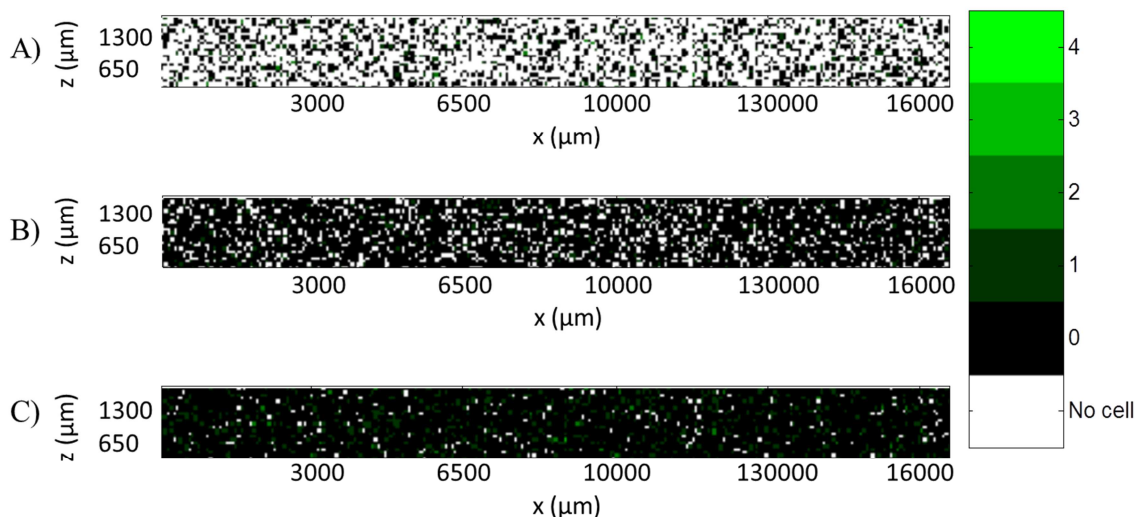


Figura 4.7 Numero di molecole di DNA, che codifica per Klf4, contenuto in ogni cellula della popolazione adesa sul substrato microfluidico all'inizio ed al termine di ogni ciclo di infezione con MOI 1; A) matrice $B(t_0^I)$, B) matrice $B(t_1^I)$, C) matrice $B(t_1^{II})$.

Comparando la Figura 4.5 con le Figure 4.6 e 4.7 si osserva che l'intensità del verde è più elevata nel primo caso. Questo è dovuto al fatto che mediamente il numero di molecole di DNA, che codificano per la proteina Oct4, contenuto in tutta la popolazione è maggiore. La Figura 4.5 mostra l'effetto del secondo ciclo di infezione che contribuisce ad aumentare non solo la percentuale delle cellule positive ma anche il numero di molecole presenti nelle cellule che si vanno a sommare a quelle che erano già contenute nel ciclo precedente. Questa caratteristica è meno visibile se si osservano le cellule aventi DNA relativo a Sox2 e Klf4 (Figure 4.6-7). Ciò è dovuto alla bassa MOI rispetto a quella relativa ad Oct4. Si nota anche

che i risultati che forniscono le due figure sono statisticamente equivalenti, ragion per cui si omette la rappresentazione che riguarda c-Myc. Si è visto che per aumentare il numero di molecole di DNA virale contenute nelle cellule si può agire su due variabili operative: aggiungere più cicli di infezione ed incrementare la MOI relativa a tutti e quattro i fattori.

4.3.2 DNA virale nella popolazione cellulare per MOI 20

Di seguito vengono illustrati lo stesso tipo di figure del caso precedente con MOI 1, simulando però una infezione con MOI 20 per tutti i cicli. Questa analisi serve per quantificare l'effetto che ha un aumento della MOI sul rilascio di DNA virale alle cellule presenti nel substrato microfluidico. La Figura 4.8 mostra la percentuale di cellule positive ai 4 fattori di trascrizione.

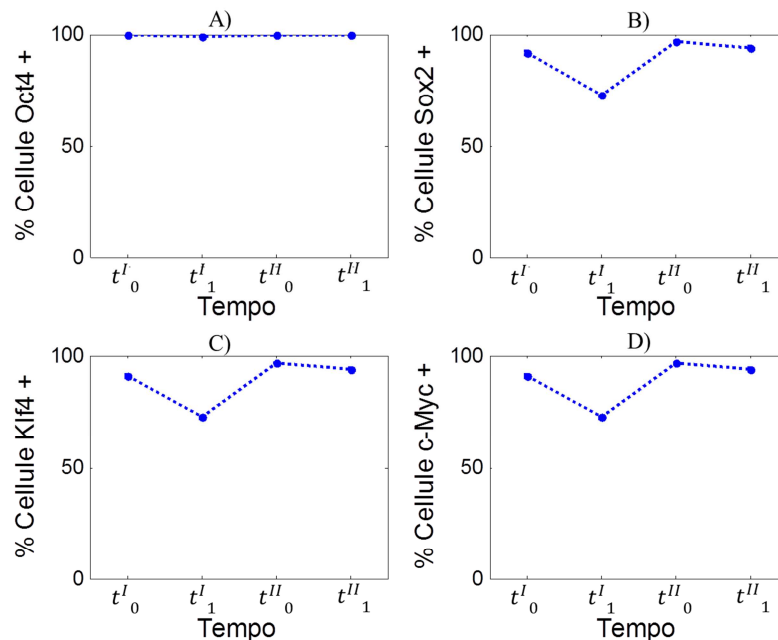


Figura 4.8 Profilo temporale della percentuale di cellule positive per MOI 20; A) Oct4, B) Sox2 C) Klf4 D) c-Myc. La barra di errore indica la deviazione standard di 10 simulazioni stocastiche eseguite.

La Figura 4.8 relativa a Oct4 mostra che ad ogni time point di campionamento tutta la popolazione risulta positiva ad almeno una molecola di DNA virale. Dato il maggior numero di virus presenti nel sistema anche dopo la duplicazione tutte le cellule hanno almeno una molecola di DNA alla fine del II ciclo di infezione. Una valutazione più precisa di quanto accade nel tempo infettando le cellule con MOI 20 viene fornita dalla Figura 4.9 che indica la percentuale di cellule aventi un certo numero di molecole di DNA virale.

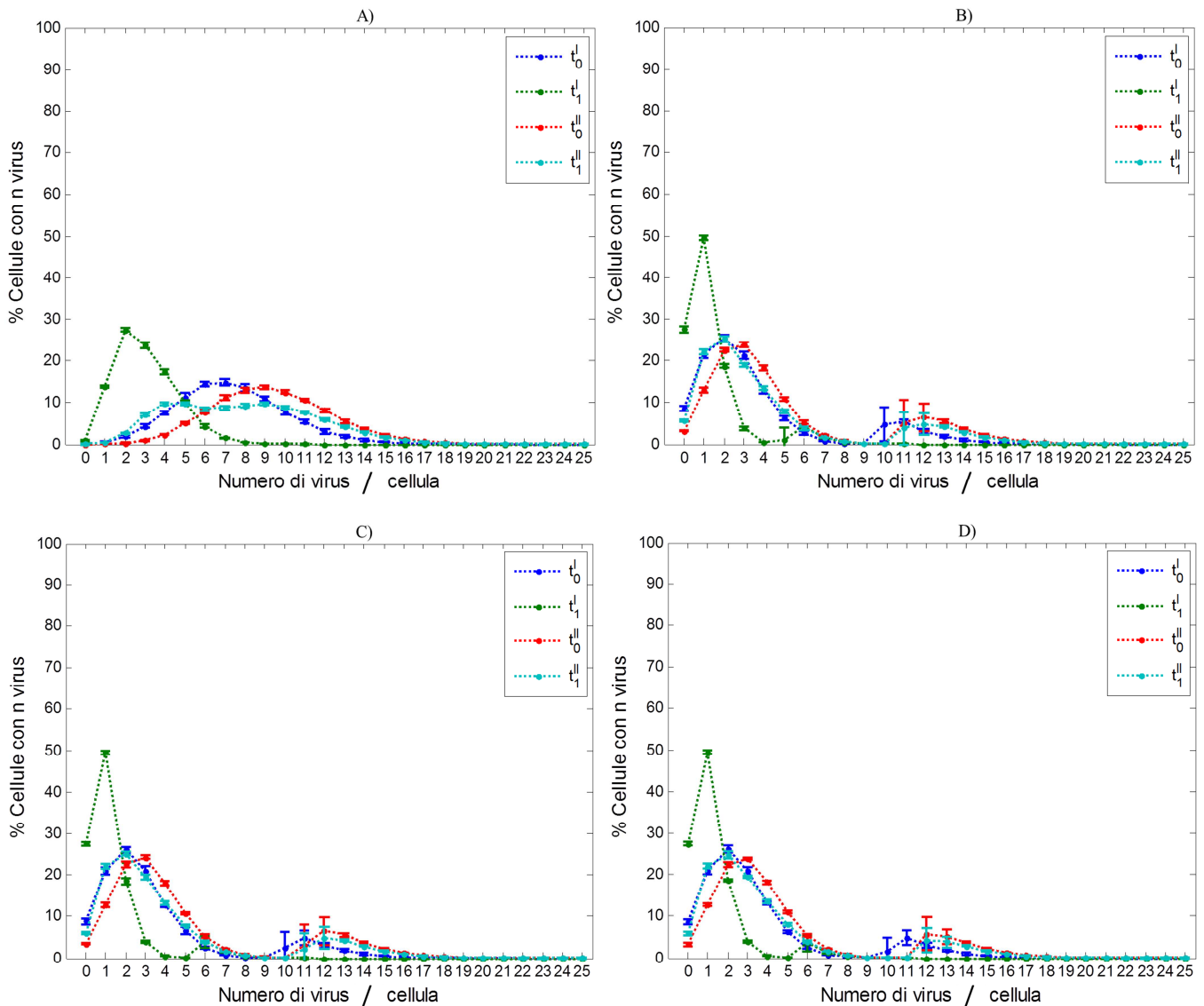


Figura 4.9 Percentuale di cellule presenti nella popolazione che contengono quel numero di DNA virale indicato in ascissa per MOI 20; A) Oct4, B) Sox2 C) Klf4 D) c-Myc. La barra di errore indica la deviazione standard di 10 simulazioni stocastiche eseguite.

Osservando i grafici si deduce che, in generale, più la MOI è elevata, più la media del numero di fattori di trascrizione contenuti nelle cellule aumenta. Infatti analizzando l'andamento di quella percentuale si può apprezzare una distribuzione assimilabile ad una gaussiana che caratterizza i modelli stocastici, in cui il centro di tale distribuzione può essere riconducibile alla media del DNA contenuto. Si riesce anche a quantificare l'effetto della duplicazione cellulare che porta ad una diminuzione della media del numero di molecole di DNA. Dopo la seconda infezione la media del numero di DNA virali contenuti nelle cellule si sposta verso un valore più elevato. Quantificando gli andamenti descritti relativi Oct4 si ha che:

- Al tempo t_0^I il 15% della popolazione contiene 7 molecole di DNA e questo numero è riconducibile alla quantità media di DNA contenuta in tutte le cellule;

- Al tempo t_1^I per effetto della duplicazione, il 30% della popolazione contiene 2 molecole di DNA;
- Al tempo t_0^{II} il 14% della popolazione contiene 9 molecole di DNA;
- Al tempo t_1^{II} la distribuzione diventa più eterogenea, infatti il 10% delle cellule contengono dalle 4 alle 9 molecole di DNA.

Per quanto riguarda l'infezione di Sox2, Klf4 e c-Myc, si possono distinguere due picchi, in cui il primo è dovuto all'effetto della diluizione per mezzo della duplicazione:

- Al tempo t_0^I il 25% della popolazione contiene 2 molecole di DNA virali ed il 5% ne contiene 11;
- Al tempo t_1^I il 50% della popolazione contiene 1 molecola di DNA virale ed il 4% ne contiene 6;
- Al tempo t_0^{II} il 25% della popolazione contiene 3 molecole di DNA virale ed il 6% ne contiene 12;
- Al tempo t_1^{II} il 25% della popolazione contiene 2 molecole di DNA virale ed il 5% ne contiene 12.

Le Figure 4.10-12 rappresentano il rilascio di DNA virale che è avvenuto all'inizio ed alla fine dei cicli di infezione per MOI=20.

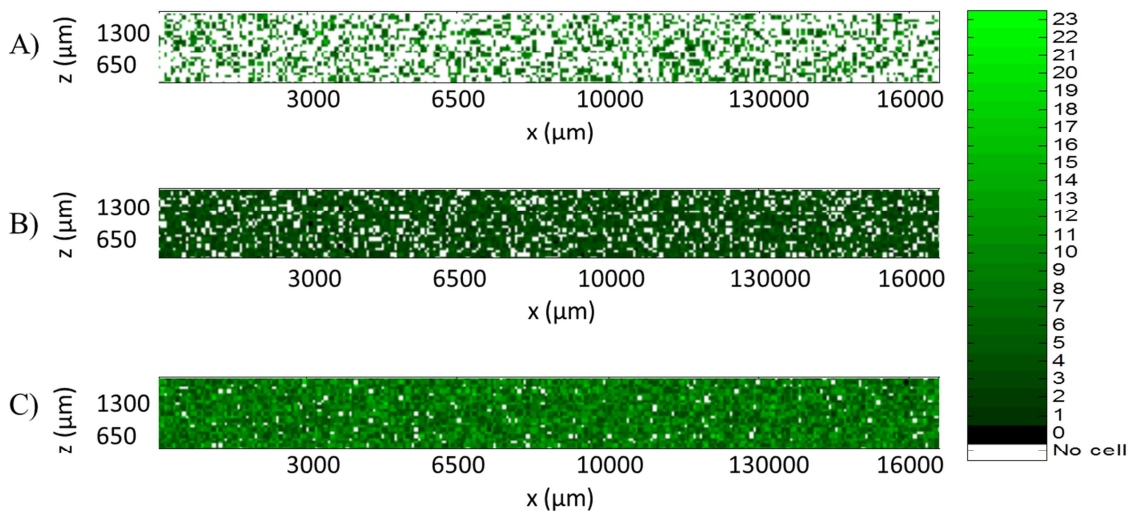


Figura 4.10 Numero di molecole di DNA, che codifica per Oct4, contenuto in ogni cellula della popolazione adesa sul substrato microfluidico all'inizio ed al termine di ogni ciclo di infezione con MOI 60; A) matrice $B(t_0^I)$, B) matrice $B(t_1^I)$, C) matrice $B(t_1^{II})$.

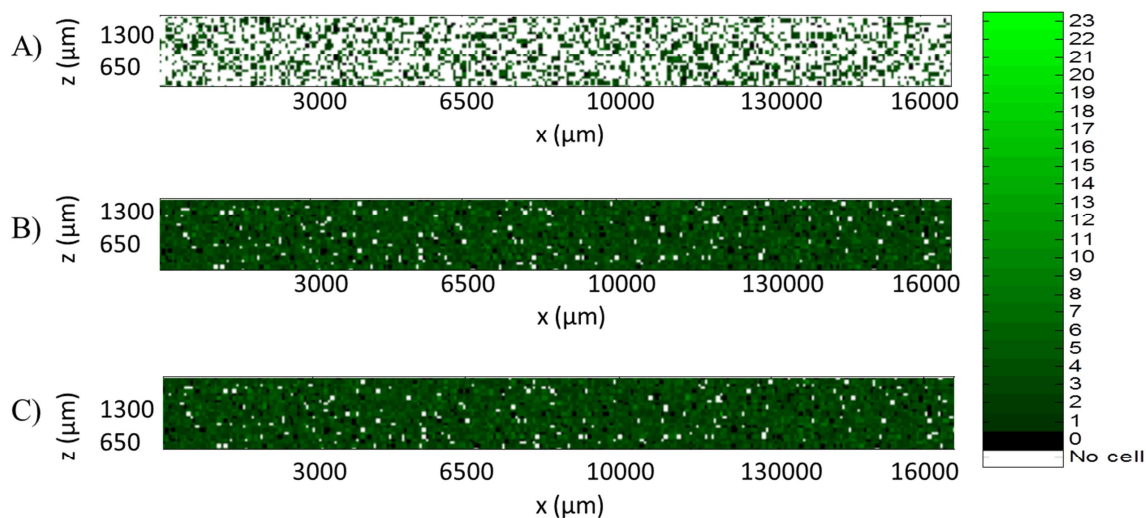


Figura 4.11 Numero di molecole di DNA, che codifica per Sox2, contenuto in ogni cellula della popolazione adesa sul substrato microfluidico all'inizio ed al termine di ogni ciclo di infezione con MOI 20; A) matrice $B(t_0^I)$, B) matrice $B(t_1^I)$, C) matrice $B(t_1^{II})$.

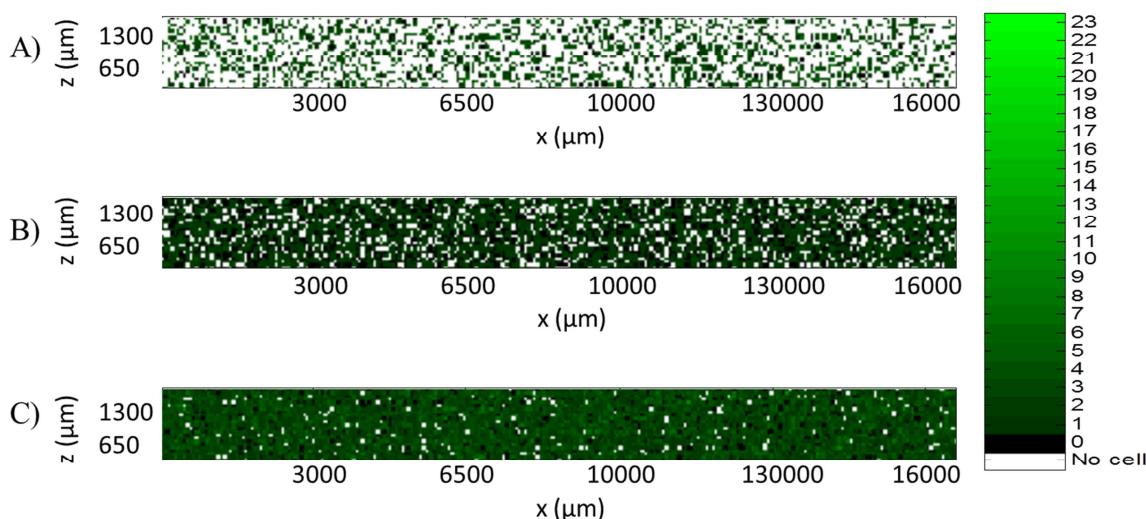


Figura 4.12 Numero di molecole di DNA, che codifica per Klf4, contenuto in ogni cellula della popolazione adesa sul substrato microfluidico all'inizio ed al termine di ogni ciclo di infezione con MOI 20; A) matrice $B(t_0^I)$, B) matrice $B(t_1^I)$, C) matrice $B(t_1^{II})$.

Si nota che rispetto alle Figure 4.5-7 il numero di DNA virale contenuto in tutte le cellule è nettamente maggiore, ciò è percepibile dall'intensità di verde della Figura 4.10 rispetto la Figura 4.5. Inoltre dato che in riferimento alla Figura 4.8 (relativa a Oct4) tutte le cellule sono positive, per cui in Figura 4.10 non compaiono cellule senza DNA virale contenuto (rappresentate dalle celle nere).

Dopo aver commentato gli andamenti dei grafici di Figura 4.3-12 si possono riassumere gli aspetti che caratterizzano la correlazione tra le condizioni operative di infezione (gradi di libertà del modello) ed il rilascio del DNA virale nelle cellule del substrato microfluidico:

- La duplicazione che avviene durante il primo ciclo di infezione diluisce il contenuto del DNA virale in modo più marcato rispetto a quello che si verifica nel secondo ciclo, questa diluizione dipende inoltre dal tempo scelto di interinfezione $t_{i,i}$, che costituisce un grado di libertà del modello;
- Se si esegue un'infezione con MOI elevata, migliora il rilascio virale quantificabile con il maggior numero di molecole di DNA che viene distribuito in tutta la popolazione cellulare.

4.4 Risultati ottenuti dai processi intracellulari

Una volta aver determinato il numero di molecole di DNA virale assorbite dalle cellule dopo il processo di infezione, viene prodotto nel nucleo cellulare l'mRNA che trasloca nel citoplasma e nei ribosomi vengono prodotte le proteine che codificano per i diversi fattori di trascrizione. Questi processi sono stati modellati con il sistema di ODE (Equazioni 3.8) e vengono riportati i risultati ottenuti da simulazioni condotte a MOI 1 e MOI 20.

4.4.1 Produzione di mRNA e proteina per MOI 1

Nel modello le informazioni contenute nelle matrici C1 e D1 riguardano rispettivamente il numero di molecole di mRNA e proteine che si sono prodotte in ciascuna cellula della popolazione durante il tempo di interinfezione. La Figura 4.13 mostra il numero di molecole di mRNA, contenute in ogni cellula presente nel canale microfluidico, prodotte alla fine dell'ultimo ciclo, mentre la Figura 4.14 mostra il numero di proteine tradotte.

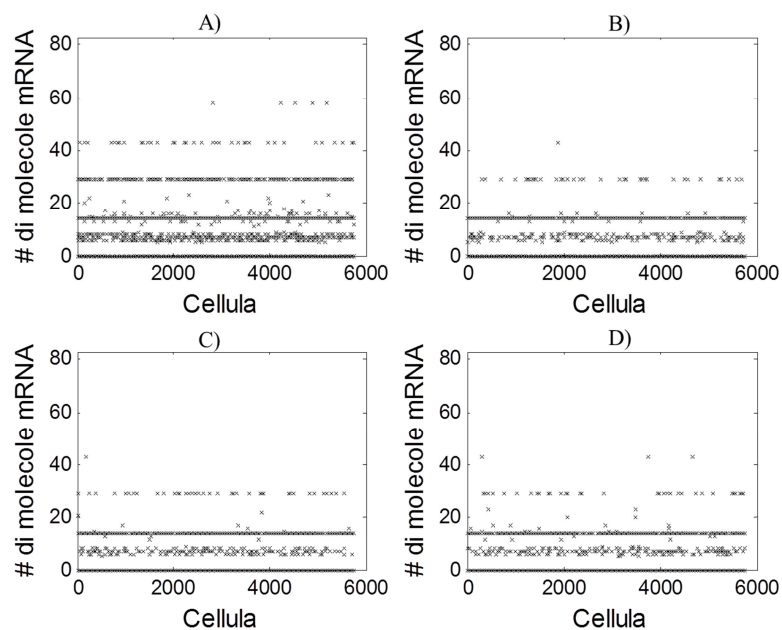


Figura 4.13 Numero di molecole di mRNA prodotte a partire d DNA virale presente in ogni cellula, MOI 1; A) Oct4, B) Sox2 C) Klf4 D) c-Myc.

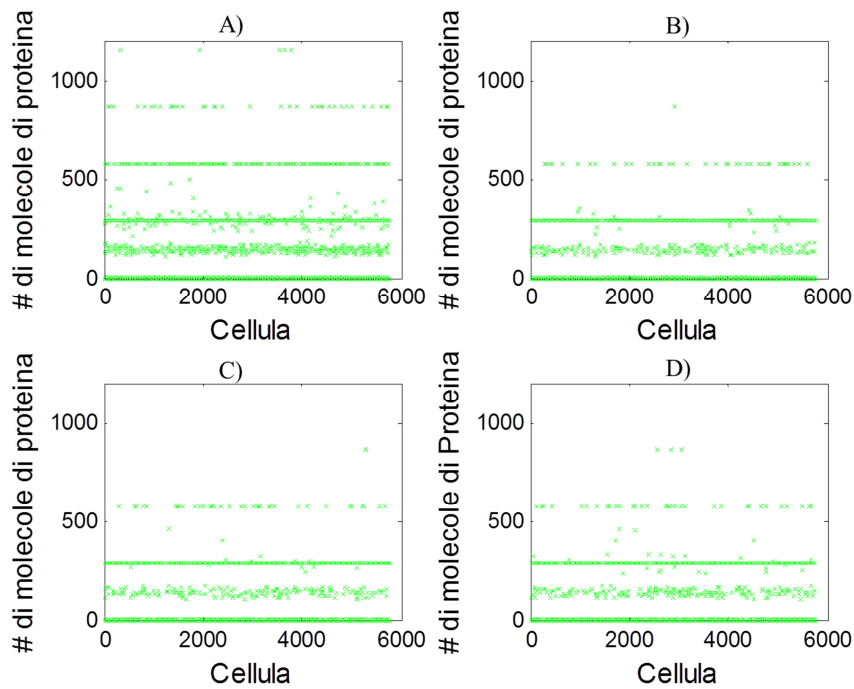


Figura 4.14 Numero di proteine prodotte in base al contenuto di mRNA sintetizzato nel nucleo, MOI 1; A) Oct4, B) Sox2 C) Klf4 D) c-Myc.

Osservando entrambe le figure si nota chiaramente che il numero di mRNA e di proteine si distribuisce su livelli. Ad ogni livello corrisponde uno specifico numero di DNA virale contenuto in quella cellula. Per esempio, interpretando le Figure 4.13 e 4.14 A, si nota che quelle cellule che contengono due molecole di DNA virale, una volta raggiunto lo stato stazionario, hanno 30 molecole di mRNA che a loro volta vengono tradotte in circa 600 proteine. La dispersione osservabile attorno al valore 8 molecole di mRNA/cellula è dovuto all'effetto della duplicazione: questo andamento indica una duplicazione che è avvenuta poco prima del termine del tempo di interinfezione. Perciò, per le cellule che si sono duplicate poco prima del termine del ciclo di infezione, il tempo di sintesi non è tale da far raggiungere lo stato stazionario del contenuto di mRNA e proteina e la quantità finale è riconducibile alla distribuzione che regola la suddivisione asimmetrica delle molecole alle cellule figlie. La Figura 4.15 mostra una rielaborazione dei dati forniti dalla Figura 4.14 al fine di evidenziare la media e la distribuzione del numero di proteine prodotte al termine di ogni ciclo di infezione, considerando l'eterogeneità cellulare.

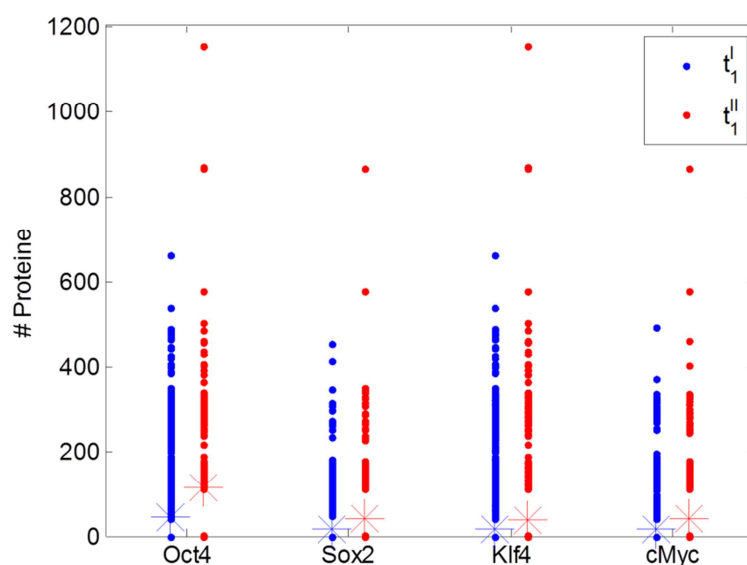


Figura 4.15 Distribuzione del numero di proteine presenti nella popolazione cellulare al termine di ogni ciclo di infezione, l'asterisco indica la media.

Dalla Figura 4.15 si nota l'effetto del rapporto stechiometrico ed i profili statisticamente equivalenti riguardo Sox2, Klf4 e c-Myc. L'aspetto più importante da considerare è l'elevata eterogeneità dei dati forniti dal modello che è dovuto al numero relativamente basso di proteine prodotte per infezioni a MOI 1, condizione che provoca un aumento della fluttuazione stocastica.

La Figura 4.16 mostra la percentuale di cellule positive ad un tipo di fattore di trascrizione (indicato in ascissa) ed il simbolo OSKM indica la percentuale di cellule della popolazione che sono positive a tutti e quattro i fattori di trascrizione. Inoltre sono state condotte 10 simulazioni per studiare la fluttuazione stocastica dei risultati.

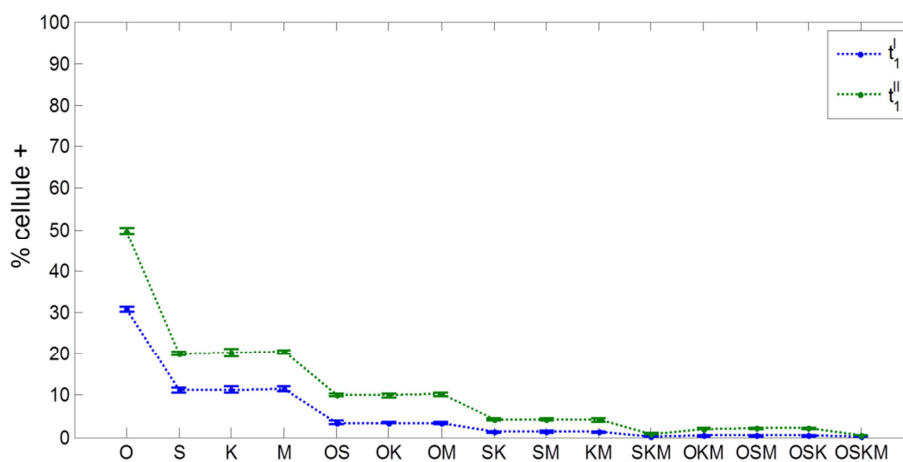


Figura 4.16 Andamento della percentuale di cellule positive ai tipi di fattori di trascrizione indicati in ascissa, MOI 1. La barra di errore indica la deviazione standard di 10 simulazioni stocastiche eseguite. Nomenclatura: O=Oct4, S=Sox2, K=Klf4, M=c-Myc, OS=Oct4-Sox2, OM=Oct4-c-Myc, SK=Sox2-Klf4, KM=Klf4-c-Myc, SKM=Sox2-Klf4-c-Myc, OKM=Oct4-Klf4-c-Myc, OSM=Oct4-Sox2-c-Myc, OSKM=Oct4-Sox2-Klf4-c-Myc.

Si può osservare l'effetto dell'infezione con un maggior numero di virus contenenti geni che codificano per Oct4 rispetto a quelli che codificano per gli altri tre. Al termine del primo ciclo di infezione il 30% della popolazione è positivo ad Oct4 ed un 10% è positivo a Sox2, Klf4 e c-Myc, mentre al termine del secondo ciclo di infezione le percentuali aumentano passando da un 50% di cellule positive a Oct4 ad un 20% positivo agli altri tre. L'infezione con basso MOI comporta che una bassa percentuale di cellule sia positiva a tutti e 4 i fattori (OSKM), che al termine del secondo ciclo non supera il 2%. Infatti per la quantità di virus presenti nel sistema la probabilità che una cellula venga infettata da tutti e quattro i fattori è bassa.

4.4.2 Produzione di mRNA e proteina per MOI 20

La Figura 4.17 mostra il numero di molecole di mRNA contenute nelle cellule, sottoposte a infezione con MOI=20, al termine del secondo ciclo di infezione, mentre la Figura 4.18 indica la distribuzione di proteina nelle medesime condizioni.

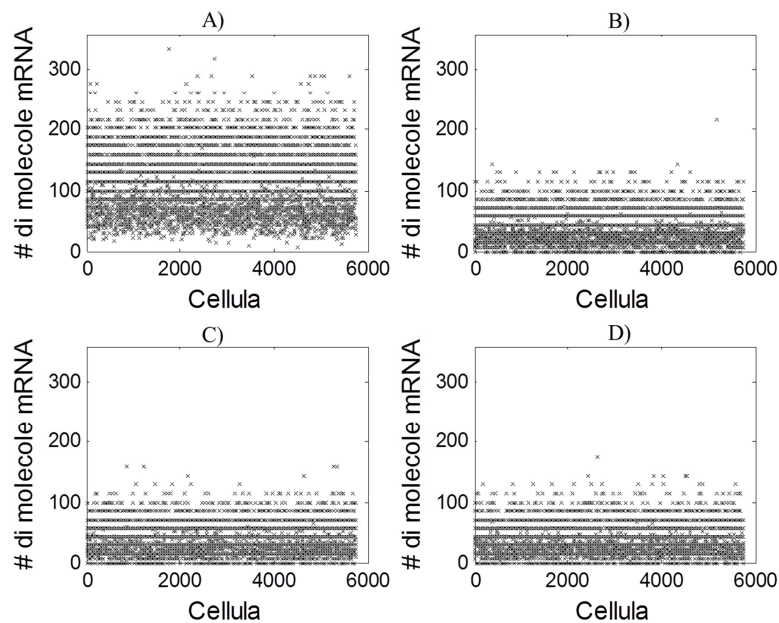


Figura 4.17 Numero di molecole di mRNA prodotte a partire d DNA virale presente in ogni cellula, MOI 20; A) Oct4, B) Sox2 C) Klf4 D) c-Myc.

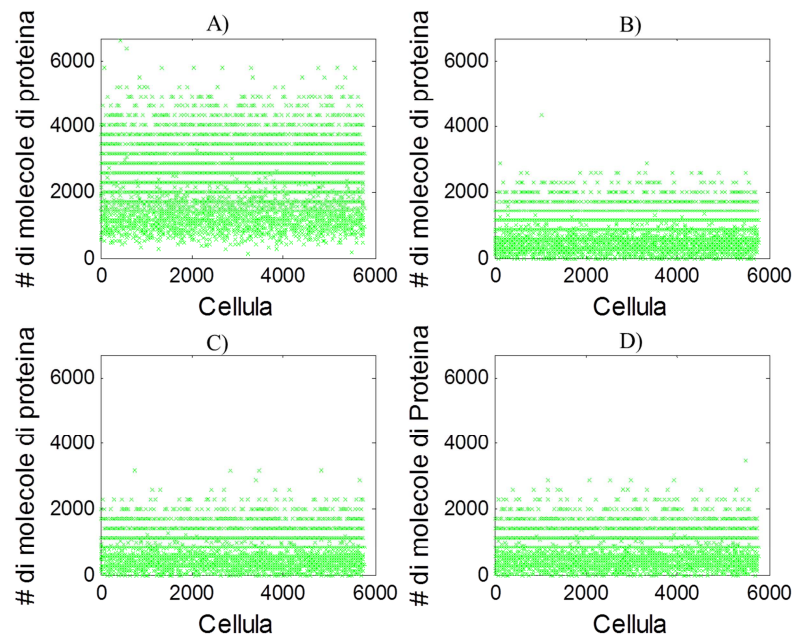


Figura 4.18 Numero di proteine prodotte in base al contenuto di mRNA sintetizzato nel nucleo, MOI 20; A) Oct4, B) Sox2 C) Klf4 D) c-Myc.

Osservando entrambe le figure emerge che il numero di molecole di mRNA e proteina contenuto nelle cellule si distribuisce su livelli più ravvicinati, rispetto a quelli ottenuti da infezioni a MOI 1, avvicinandosi a risultati con una distribuzione continua. Questo indica che la stocasticità intrinseca che caratterizza i processi intracellulari può essere descritta su ampia scala con modelli continui impiegando ODEs. La Figura 4.19 indica il numero di proteine contenute nella cellula al termine di ogni ciclo di infezione.

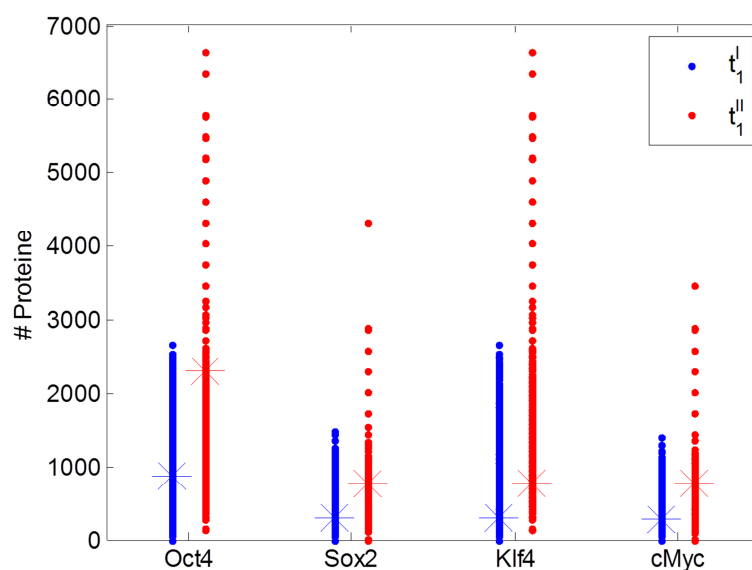


Figura 4.19 Distribuzione del numero di proteine presenti nella popolazione cellulare al termine di ogni ciclo di infezione, l'asterisco indica la media.

La Figura 4.19 mostra che alla fine del secondo ciclo la media su ogni cellula del numero di proteine è di 2200 mentre per Sox2, Klf4 e c-Myc è di 900.

La Figura 4.20 mostra la percentuale di cellule positive alle combinazioni possibili di virus.

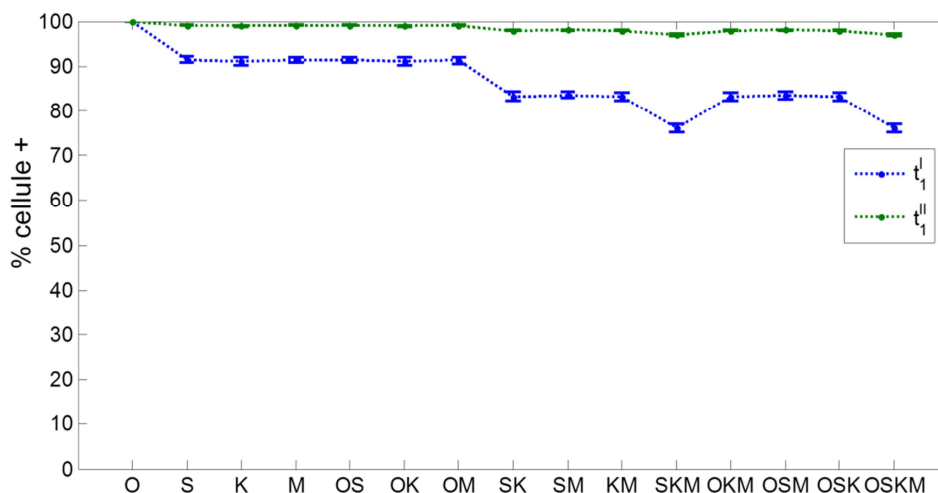


Figura 4.20 Percentuale di cellule positive ai tipi di fattore di trascrizione indicati in ascissa, MOI 20. La barra di errore indica la deviazione standard di 10 simulazioni stocastiche eseguite. Nomenclatura: O=Oct4, S=Sox2, K=Klf4, M=c-Myc, OS=Oct4-Sox2, OM=Oct4-c-Myc, SK=Sox2-Klf4, KM=Klf4-c-Myc, SKM=Sox2-Klf4-c-Myc, OKM=Oct4-Klf4-c-Myc, OSM=Oct4-Sox2-c-Myc, OSKM=Oct4-Sox2-Klf4-c-Myc.

Confrontando la Figura 4.20 con la 4.16 si nota l'effetto di una infezione con MOI più elevato. Alla fine del primo e del secondo ciclo di infezione tutte le cellule risultano positive a Oct4. L'effetto di un MOI relativamente basso per gli altri tre tipi di virus è limitato: al termine del primo ciclo di infezione il 91% della popolazione è positivo a Sox2 Klf4 e c-Myc, mentre dopo il secondo ciclo questa percentuale si alza fino al valore di 98%. La percentuale di cellule positive a tutti e quattro i fattori è nettamente più elevata rispetto ai risultati ottenuti per MOI 1: al primo ciclo si ha un 76% mentre al secondo ciclo si raggiunge il 97%. Inoltre la percentuale di cellule positive a Sox2, Klf4 e c-Myc è inferiore rispetto alle altre tre combinazioni terziarie. Ciò è dovuto al minore MOI di Sox2, Klf4 e c-Myc che rende inferiore la probabilità che le cellule siano infettate da tutti quei tipi di virus.

La Figura 4.21 riassume le considerazioni fatte in merito al modello deterministico impiegato per descrivere i processi intracellulari (considerando anche l'espressione citoplasmatica della proteina). Viene rappresentato l'andamento del numero di cellule contro il numero di molecole di proteine.

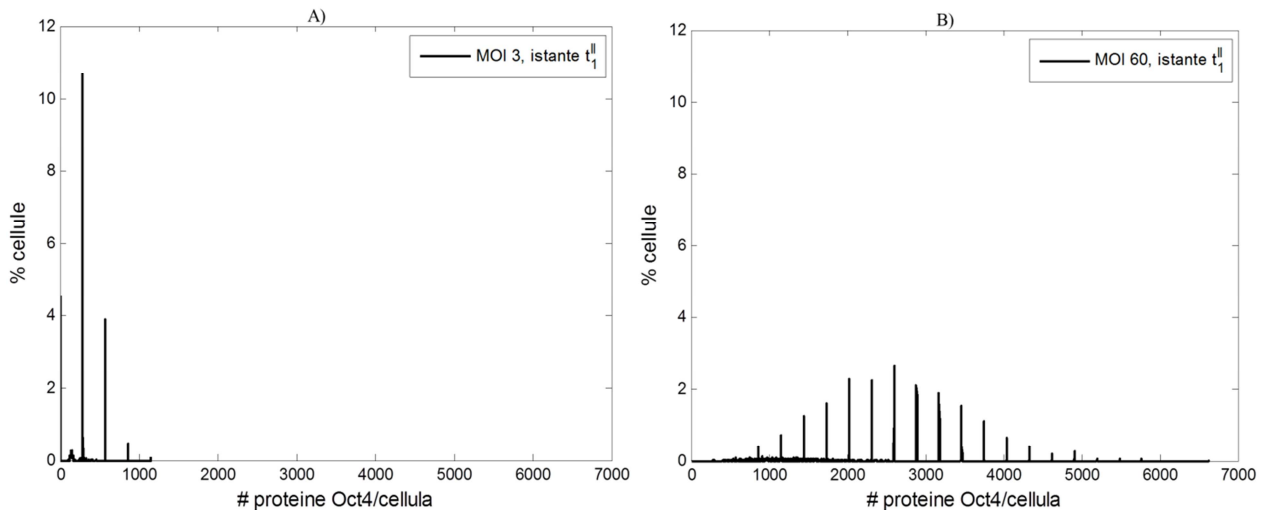


Figura 4.21 Andamento del numero di cellule rispetto il numero di molecole di proteine, elaborazione dei dati forniti in Figura 4.14 e 4.18.

La figura mostra l'effetto dell'utilizzo di un modello deterministico impiegato per descrivere i processi intracellulari, simulando infezioni multiple a MOI 1 e MOI 20. A bassi valori di MOI la distribuzione è discreta ed il numero di molecole si ripartisce su livelli determinati dallo stato stazionario. In particolare con MOI 1 circa 600 cellule contengono 300 molecole di proteina Oct4, mentre per MOI 20, 150 cellule contengono 2800 molecole di Oct4. L'effetto della duplicazione sulle distribuzioni in Figura 4.21 si nota dalla fluttuazione stocastica presente per un numero basso di molecole (150 e 1000 per MOI 1 e MOI 20 rispettivamente). Ad alti valori di MOI la distribuzione sembra avvicinarsi di più ad un andamento continuo. Questo indica che su ampia scala il modello deterministico è in grado di descrivere i processi biologici intrinsecamente stocastici. I dati sperimentali forniti dalla letteratura [Kim and Orkin *et al.*, 2008] confermano i profili qualitativi riportati in Figura 4.21 per MOI 20.

4.5 Risultati del DNA binding

Una volta che sono stati prodotti nel citoplasma (nei ribosomi) i quattro fattori di trascrizione, questi ultimi traslocano nel nucleo e, secondo i meccanismi intrinsecamente stocastici descritti nel paragrafo 3.6, si legano ai promotori dei geni target. In riferimento alla Figura 3.21, che indica il numero di promotori che vengono occupati dalle possibili combinazioni, si è simulato il comportamento stocastico delle proteine che si legano ai promotori dei geni target.

4.5.1 DNA binding per MOI 1

La Figura 4.22 mostra il numero di promotori che vengono attaccati dai rispettivi fattori di trascrizione con varie combinazioni

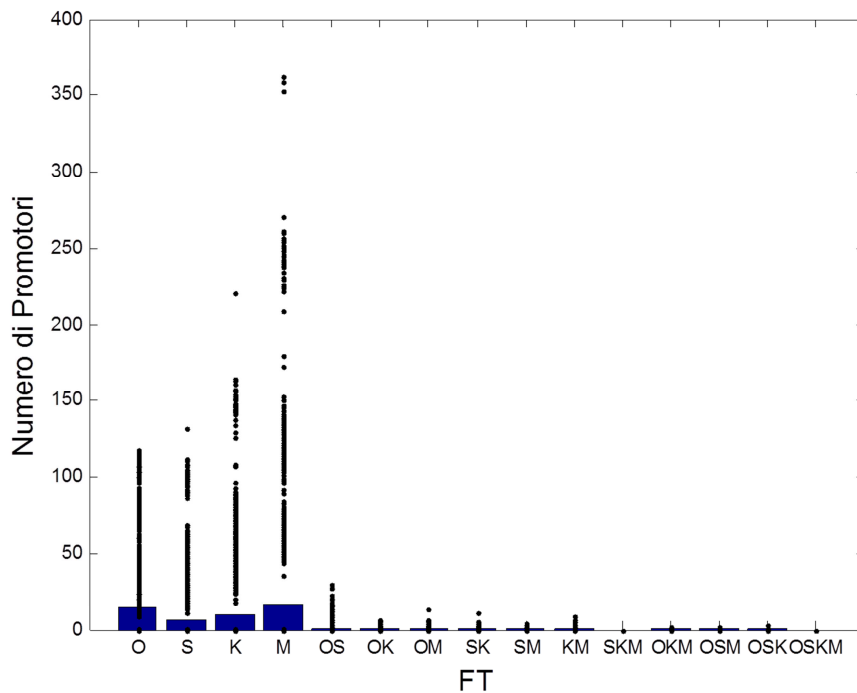


Figura 4.22 Numero di promotori che vengono occupati dai fattori di trascrizione, prodotti nel citoplasma, secondo varie combinazioni, MOI 1.

Comparando la Figura 4.22 con la 3.20 si nota che dall'infezione con MOI basso si ottiene un modesto numero di promotori occupati, rispetto a quelli possibili. I dati fanno riferimento all'intera popolazione cellulare, perciò la variazione dei risultati ottenuti è alta per effetto dell'elevata fluttuazione stocastica caratteristica dei bassi valori di MOI.

Il processo di DNA *binding*, che avviene per ogni tipo di fattore di trascrizione, può essere rappresentato nella Figura 4.23. Questa permette di visualizzare il profilo genetico di ogni cellula al termine dell'ultimo ciclo di infezione. In ordinata sono indicati tutti i promotori del DNA mentre in ascissa tutte le cellule della popolazione. In bianco vengono riportati i promotori che non sono target relativi ad uno specifico fattore di trascrizione, in nero i promotori target sui quali non si è legato il fattore di trascrizione, mentre in verde vengono indicati i promotori target sui quali si è legato una proteina secondo i meccanismi del DNA *binding*.

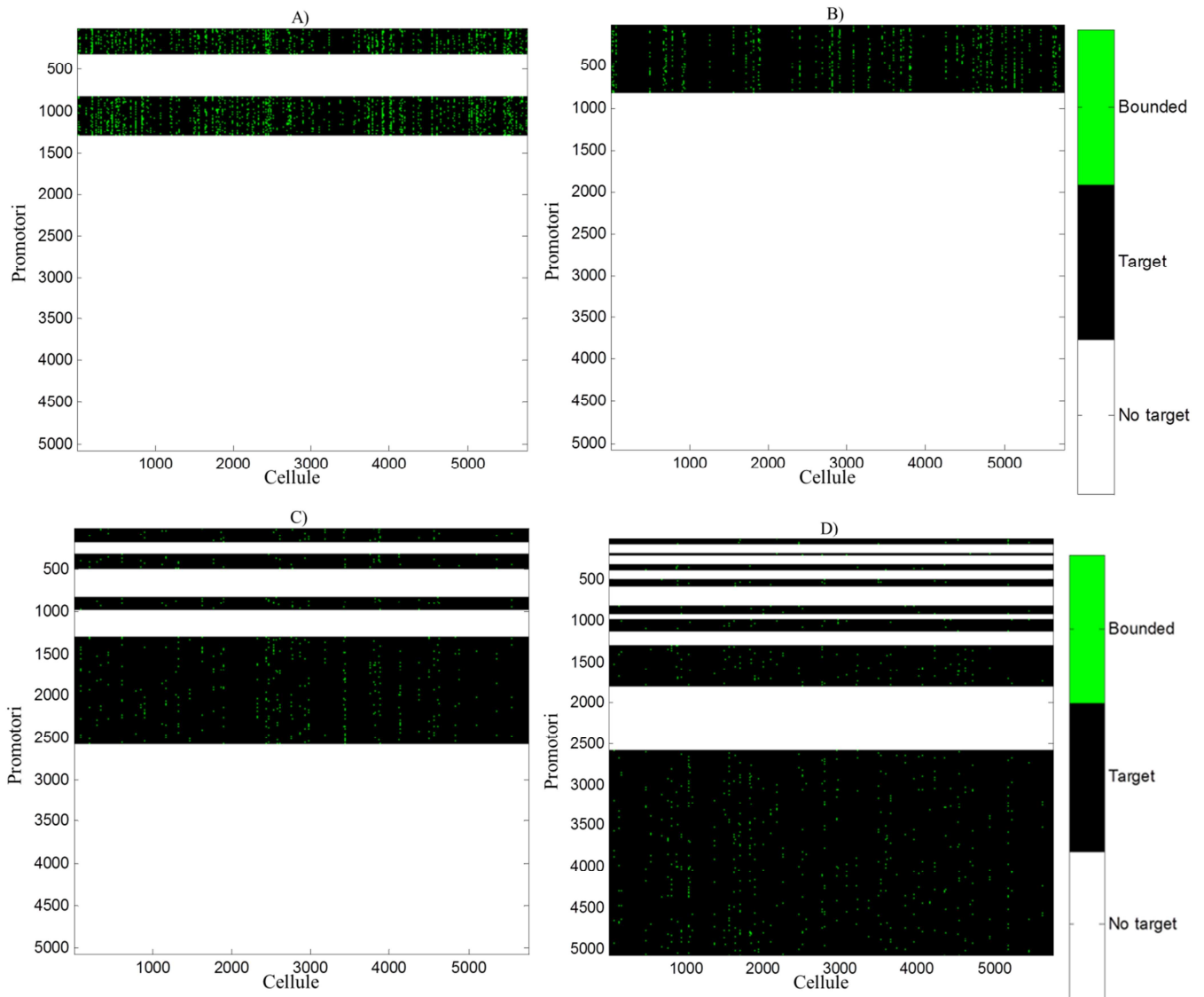


Figura 4.23 Profilo genetico relativo ai promotori target per MOI 1; A) *Oct4*, B) *Sox2*, C) *Klf4*, D) *c-Myc*.

La Figura 4.24 indica l'andamento quantitativo ricavato dalle Figure 4.23 A, B, C, D: la figura mostra la percentuale di cellule che hanno nel loro DNA i fattori di trascrizione legati ai loro promotori target, indicati in ascissa per ogni tipo di fattore di trascrizione.

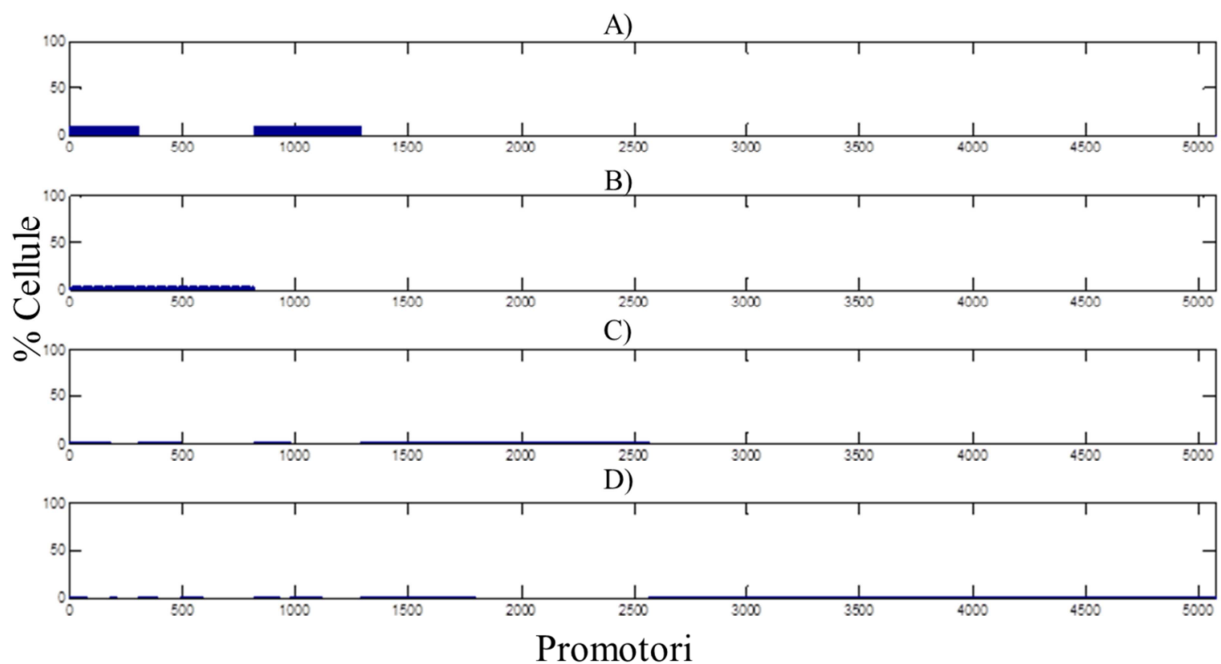


Figura 4.24 Percentuale di cellule in cui i fattori di trascrizione si sono legati ai promotori dei geni target, *MOI 1*; A) *Oct4*, B) *Sox2* C) *Klf4* D) *c-Myc*.

Interpretando la Figura 4.24 (relativa ad *Oct4*) si ha che il 10% della popolazione cellulare contiene un DNA ai cui promotori target si è legata una molecola di *Oct4*. Quindi queste proteine sono traslocate nel nucleo e si sono legati ai relativi promotori secondo i meccanismi di DNA *binding* descritti nel paragrafo 3.6. Per quanto riguarda *Sox2* invece l'8% della popolazione cellulare contiene quel fattore di trascrizione nei promotori dei geni target. Queste percentuali sono relativamente basse per effetto di infezioni con *MOI* piccolo.

4.5.2 DNA binding per *MOI 20*

Per *MOI 20* il numero di promotori che vengono attaccati dai fattori di trascrizione secondo varie combinazioni è riportato in Figura 4.25.

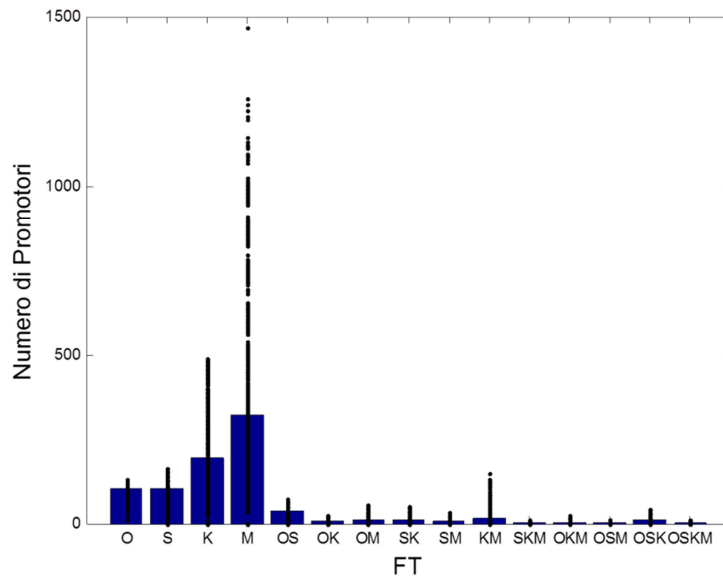


Figura 4.25 Numero di promotori che vengono occupati dai fattori di trascrizione, prodotti nel citoplasma, secondo varie combinazioni, MOI 20.

Comparando la Figura 4.25 con la 4.22 si nota l'effetto di un MOI alto: il numero di promotori ai quali si sono legati i fattori di trascrizione è maggiore e la variabilità è più limitata in quanto i risultati risentono meno della fluttuazione stocastica. Un altro aspetto rilevante al fine di aumentare l'efficienza di riprogrammazione è l'aumento del numero di promotori che contengono tutti e quattro i fattori. Emerge inoltre una considerazione importante della simulazione stocastica: il numero di promotori ai quali è attaccato sia Oct4 che Sox2 è maggiore rispetto a tutte le altre combinazioni binarie. Questo indica che il modello simula in modo appropriato i meccanismi cooperativi positivi che avvengono fra Oct4 e Sox2 nella fase del DNA *binding* (Figura 3.21C). I risultati del DNA *binding* per MOI 20 vengono riportati nella Figura 4.26 che illustra il profilo genetico relativo ai promotori target dei quattro fattori di interesse.

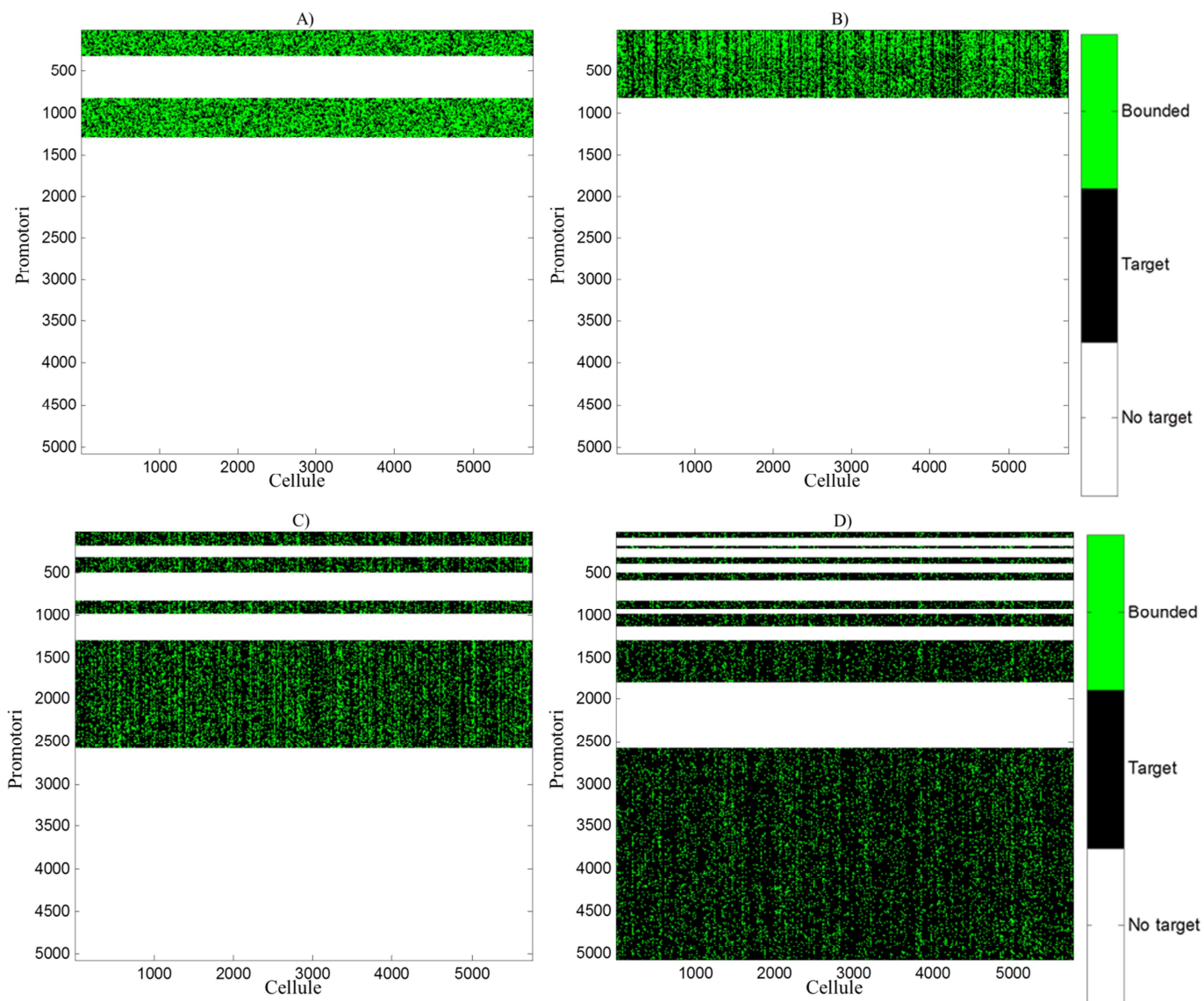


Figura 4.26 Profilo genetico relativo ai promotori target per MOI 20; A) *Oct4*, B) *Sox2*, C) *Klf4*, D) *c-Myc*.

La quantificazione dei profili genetici illustrati viene riportata in Figura 4.27.

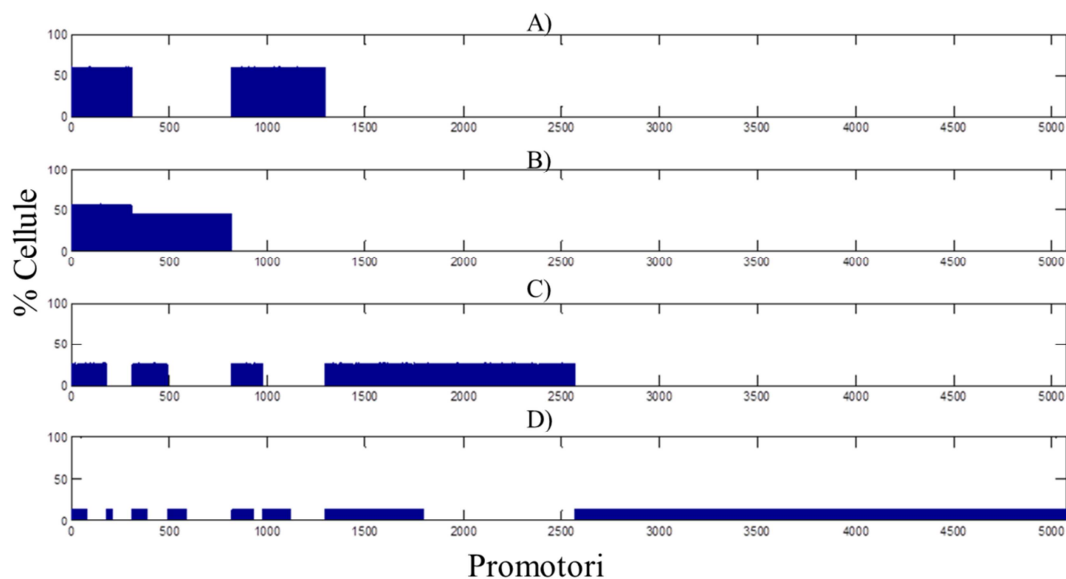


Figura 4.27 Percentuale di cellule in cui i fattori di trascrizione si sono legati ai promotori dei geni target, MOI 20.

Comparando la Figura 4.24 con la 4.27 emerge che in quest'ultima le percentuali sono aumentate fino al 60%, a prova dell'aumento della MOI. Per ogni fattore di trascrizione, la disposizione in cui sono riportati i promotori dei geni è analoga. Questo significa che è possibile identificare (analizzando dall'alto verso il basso la Figura 4.27) i promotori target in comune per i diversi fattori di trascrizione. In particolare, si può notare che la percentuale di cellule in cui si sono legate le proteine Oct4 ai promotori target è del 60%, questo valore è analogo per i promotori target di Sox2 che sono in comune a quelli di Oct4. Focalizzando l'attenzione sui promotori di Sox2, si nota che questa percentuale diminuisce per i promotori che sono target solo di Sox2. Questa discontinuità permette di caratterizzare il contributo del meccanismo di DNA *binding* di tipo cooperativo positivo per quei promotori che sono target dei fattori Oct4 e Sox2. La percentuale di cellule in cui Klf4 si lega ai suoi promotori è del 30%, mentre per c-Myc è del 20%.

Capitolo 5

Analisi di sensitività

In questo capitolo viene valutato l'effetto sul DNA binding conseguente a variazioni delle condizioni operative di infezione. Pertanto viene svolta un'analisi di sensitività rispetto alle condizioni operative che costituiscono i gradi di libertà del modello stocastico. Tale analisi viene eseguita rispetto ad uno stato nominale preso come riferimento, presentato nel paragrafo 5.1. Verrà studiato l'effetto delle singole variabili operative in termini di espressione dei fattori di trascrizione e di binding ai promotori di specifici geni sul DNA, non solo in termini medi ma anche tenendo conto dell'eterogeneità prodotta nella popolazione cellulare.

5.1 Simulazione di riferimento

Per condurre l'analisi di sensitività si è fissata una simulazione di riferimento, caratterizzata dalle condizioni riportate in Tabella 5.1.

Tabella 5.1 Valori dei gradi di libertà per la simulazione di riferimento.

Variabile	Valore
Concentrazione di semina, Conc_semina	$80 \cdot 10^{-6}$ cellule/ μm^2
N° cicli di infezione, n_infezioni	2
Durata dei processi intracellulari, ti_i	(121, 121) h
MOI	20 [n°virus/cellula]

Di seguito viene riportato una rielaborazione dei risultati ottenuti nel capitolo 4 alle condizioni indicate in Tabella 5.1. Tutti i risultati presentati in questo capitolo fanno riferimento alla stechiometria 3 (Oct4) : 1 (Sox2) : 1 (Klf4) : 1 (c-Myc), risultata ottimale da studi di letteratura [Paparetrou et al., 2009]. Quindi alle condizioni nominale Oct4 ha MOI 60 e Sox2 ha MOI 20. La Figura 5.1 mostra la percentuale di cellule che contiene un certo numero di molecole di Oct4 e Sox2 al termine dell'ultimo ciclo di infezione.

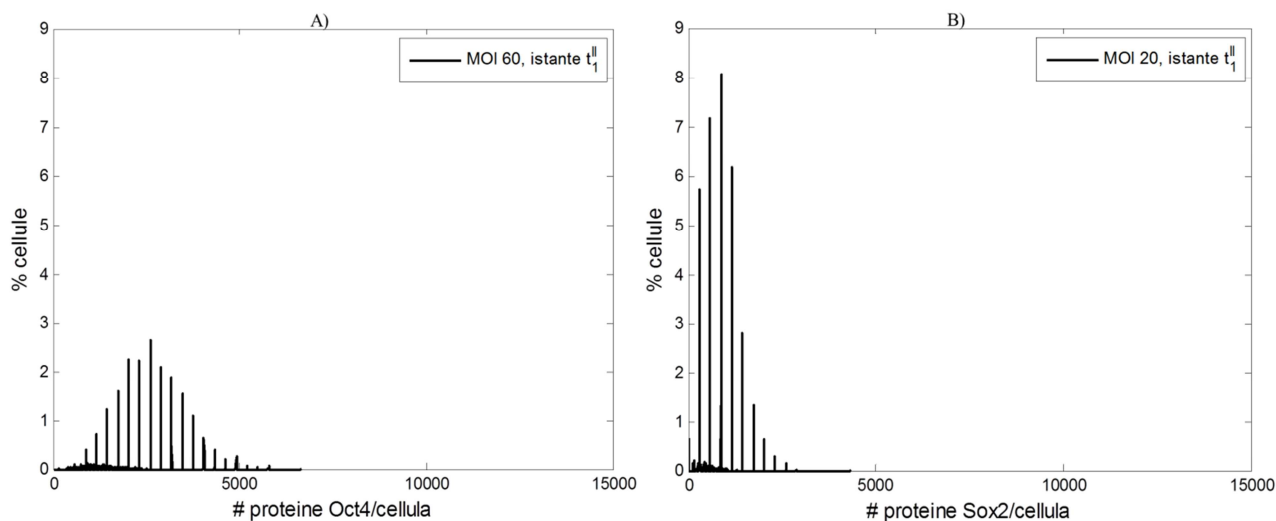


Figura 5.1 Andamento Distribuzione del numero di molecole di fattori di trascrizione per cellula nella popolazione cellulare. Condizione di riferimento riportata in Tabella 5.1; A) Oct4, B) Sox2.

Dalla Figura 5.1 emerge che per MOI 60 il punto di massimo della distribuzione è costituito dal 2,5% della popolazione cellulare contenente 2800 molecole di Oct4, mentre per MOI 20 dall'8% delle cellule contenente 1000 molecole di Sox2. Tuttavia calcolando la media pesata su tutta la popolazione cellulare del numero delle proteine Oct4 e Sox2 per cellula si ottengono valori di 2296 e 797, rispettivamente. Questi valori sono molto inferiori a quelli del punto di massimo. In Figura 5.1 si nota che la distribuzione di proteine è costituita da una distribuzione ben definita di tipo gaussiano a livelli discreti e da una distribuzione con livelli molto ravvicinati a bassi numeri di proteine per cellula. Questa seconda distribuzione è dovuta all'effetto della duplicazione cellulare, che produce cellule con un limitato numero di proteine, ed include la maggior parte delle cellule presenti nella popolazione. per questo la media dell'intera distribuzione è molto inferiore a quella della distribuzione di tipo gaussiano. Ad MOI più elevati, è il caso di Oct4 rispetto a Sox2, il contenuto di proteine per cellula mediamente aumenta e la percentuale di cellule che contiene un certo numero di proteine diminuisce rendendo la distribuzione più eterogenea. È possibile quantificare l'eterogeneità della popolazione cellulare mediante il calcolo della deviazione standard pesata, che vale 1035 per Oct4 e 483 per Sox2. Ad MOI più elevati la deviazione standard è maggiore, quindi la distribuzione di proteine nella popolazione cellulare è più eterogenea. Calcolando il coefficiente di variazione, CV , delle distribuzioni riportate in Figura 5.1, è possibile normalizzare la deviazione standard, σ_w , rispetto alla media, \bar{x}_w , secondo l'equazione:

$$CV = \frac{\sigma_w}{\bar{x}_w} = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N w_i (x_i - \bar{x}_w)^2}{\sum_{i=1}^N w_i}}}{\frac{\sum_{i=1}^N x_i w_i}{\sum_{i=1}^N w_i}} \quad (5.1)$$

dove w_i rappresenta la percentuale di cellule avete un numero di proteine per cellula pari a x_i . quindi, all'aumentare della MOI, il CV è maggiore, dimostrando che l'aumento della media (al denominatore nell'Equazione 5.1) influisce maggiormente sul CV rispetto all'aumento della deviazione standard (al numeratore).

La Figura 5.2 riporta una rielaborazione dei dati presentati nella Figura 4.28. La percentuale di binding è definita come il numero di promotori ai quali una certa combinazione di fattori di trascrizione si lega rispetto al numero totale di promotori target per quella combinazione che sono stati identificati in letteratura [Kim and Orkin et al., 2008], secondo l'equazione:

$$\text{Percentuale di binding} = \frac{\text{numero di promotori attaccati}}{\text{numero di promotori target}} \cdot 100\% \quad (5.2)$$

In Figura 5.2 viene riportata la percentuale di binding per ciascuna combinazione di fattori di trascrizione (FT) che possono attaccarsi ad uno stesso promotore. Per esempio, considerando i promotori ai quali si possono legare Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc (OSKM), si possono distinguere cinque casi:

- Nessun FT si lega ad un promotore (in rosso in Figura 5.2);
- Un tipo di FT si lega al corrispondente promotore (in arancione in Figura 5.2);
- Due tipi di FT si legano ai corrispondenti promotori (in verde in Figura 5.2);
- Tre tipi di FT si legano ai corrispondenti promotori (in azzurro in Figura 5.2);
- Tutti e quattro i FT si legano ai relativi promotori, (in blu in Figura 5.2).

Questa visualizzazione mostra il binding del DNA effettivo da parte dei fattori di trascrizione rispetto a quello di saturazione dei promotori disponibili. Per motivi di visualizzazione, i grafici a barre della Figura 5.2 riportano soltanto i dati medi su tutta la popolazione cellulare.

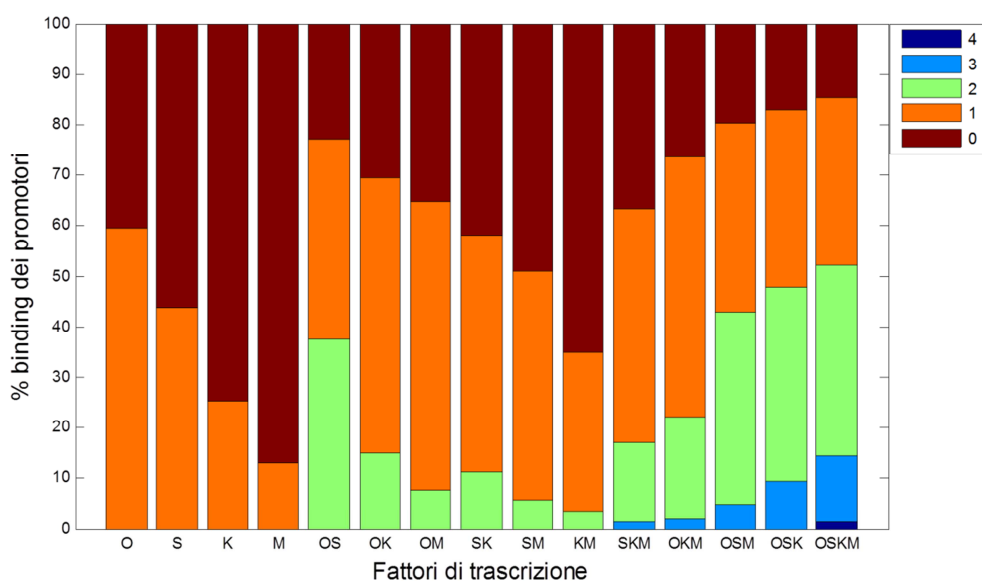


Figura 5.2 Percentuale di binding alla condizione di simulazione di riferimento. La legenda indica il numero di fattori di trascrizione attaccati ad uno stesso promotore.

Si può notare che il 60% dei promotori disponibili per l'attacco di Oct4, rilasciato a MOI 60, viene occupato. Nel caso di Sox2, Klf4 e c-Myc, tutti rilasciati con MOI 20, la percentuale di binding differisce da fattore a fattore, a causa del diverso numero di promotori a cui questi fattori possono legarsi. Il numero di promotori target per Sox2, Klf4 e c-Myc è 234, 770 e 2507 rispettivamente, per questo la percentuale di binding è minore passando da Sox2 a c-Myc. In generale, confrontando i dati riportati in Figura 3.20, maggiore è il numero di promotori target relativo alle possibili combinazioni di fattori, minore è la percentuale di binding.

Osservando la percentuale di binding relativa ai promotori target sia per Oct4 che per Sox2 (OS), l'80% di questi promotori vengono occupati ed in particolare il 40% dei promotori ha 2 fattori di trascrizione legati ed il rimanente 40% ha un solo fattore. Sebbene il numero di promotori target per Oct4-Sox2 sia maggiore rispetto quelli relativi a Oct4-Klf4 (101 e 46 rispettivamente) la percentuale di binding di OK è del 70%. Questa deviazione dal comportamento generale descritto precedentemente è dovuto alla regolazione del binding secondo un meccanismo cooperativo positivo tra Oct4 e Sox2 (Figura 3.21C). Tale effetto è evidente anche confrontando la percentuale di binding di OS e SK (aventi un numero di promotori target pari a 101 e 106, rispettivamente). Si nota che il 40% dei promotori disponibili per OS vengono occupati dai relativi due fattori di trascrizione, mentre per SK tale percentuale si riduce al 10%.

Un risultato di cui si terrà particolare conto nell'analisi di sensitività è la percentuale di binding dei promotori OSKM, in particolare la percentuale di quelli che hanno tutti e quattro i

FT attaccati. Alle condizioni nominali di simulazione si ha che il 2 % dei promotori relativi a OSKM vengono occupati dai quattro fattori.

Di seguito si analizzerà l'effetto di una variazione nelle principali variabili operative (MOI, 60 e 20) sul profilo genetico conseguente all'infezione. In particolare, gli output del modello considerati saranno quelli analizzati nelle Figure 5.1 e 5.2 per il caso nominale.

5.2 Analisi di sensitività

Per eseguire l'analisi di sensitività sono stati modificati i gradi di libertà elencati in Tabella 5.1. Ogni simulazione è caratterizzata da una singola modifica dei gradi di libertà rispetto alla condizione nominale, al fine di quantificare l'effetto di quella variabile sul numero di proteine per cellula e sulla percentuale di binding. Le simulazioni sono state eseguite variando le seguenti condizioni rispetto al caso nominale:

- MOI 60 e 40;
- Tre e quattro cicli di infezione;
- Tempo di durata dei processi intracellulari tra due infezioni consecutive pari a 24 h e 48 h.

5.2.1 Variazione della MOI

5.2.1.1 MOI 60

La simulazione condotta a MOI 60 è finalizzata a quantificare l'effetto di un aumento della MOI sul numero di proteine contenute nella popolazione cellulare e sulla percentuale di binding. La Figura 5.3 mostra la distribuzione della percentuale di cellule che contengono un certo numero di molecole di Oct4 e Sox2.

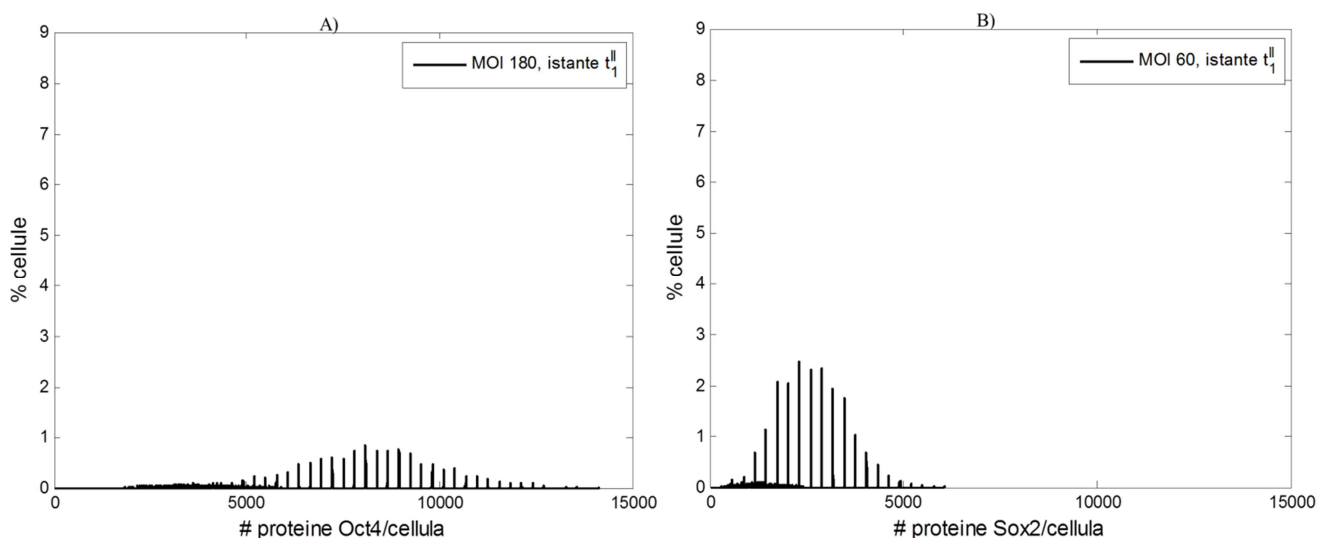


Figura 5.3 Distribuzione del numero di molecole di fattori di trascrizione per cellula nella popolazione cellulare. MOI 60; A) Oct4, B) Sox2.

Confrontando la Figura 5.1 con la 5.3 si possono osservare gli stessi andamenti qualitativi passando da Oct4 a Sox2. In particolare, mediando su tutta la popolazione cellulare, il numero di molecole di Oct4 per cellula è di 6871, mentre di Sox2 è di 2292. In generale, confrontando gli andamenti della percentuale di cellule che contengono un certo numero di molecole di Oct4 e Sox2, si notano i seguenti aspetti:

- La media del numero di molecole Oct4 per cellula è sempre maggiore della media del numero di molecole di Sox2;
- La percentuale di cellule contenenti un numero di molecole pari alla media aumenta passando da Oct4 a Sox2.

Questi andamenti sono dovuti al rapporto stechiometrico di Oct4 rispetto a Sox2 che viene mantenuto 3:1. La distribuzione attorno alla media è quantificabile mediante la deviazione standard: per Oct4 (Figura 5.3A) si ha un valore di 2521, mentre per Sox2 (Figura 5.3B) si ottiene un valore pari a 1031. Questi dati indicano che per MOI più alti la deviazione standard è maggiore e ciò indica che l'eterogeneità del contenuto di fattori di trascrizione sulla popolazione cellulare è più elevata.

La Figura 5.4 indica la percentuale di binding dei promotori che contengono un numero di fattori di trascrizione che va da 0 a 4. Gli asterischi rappresentano i valori ottenuti relativi alla condizione di riferimento (MOI 20 in Figura 5.2) e le frecce evidenziano la variazione ottenuta.

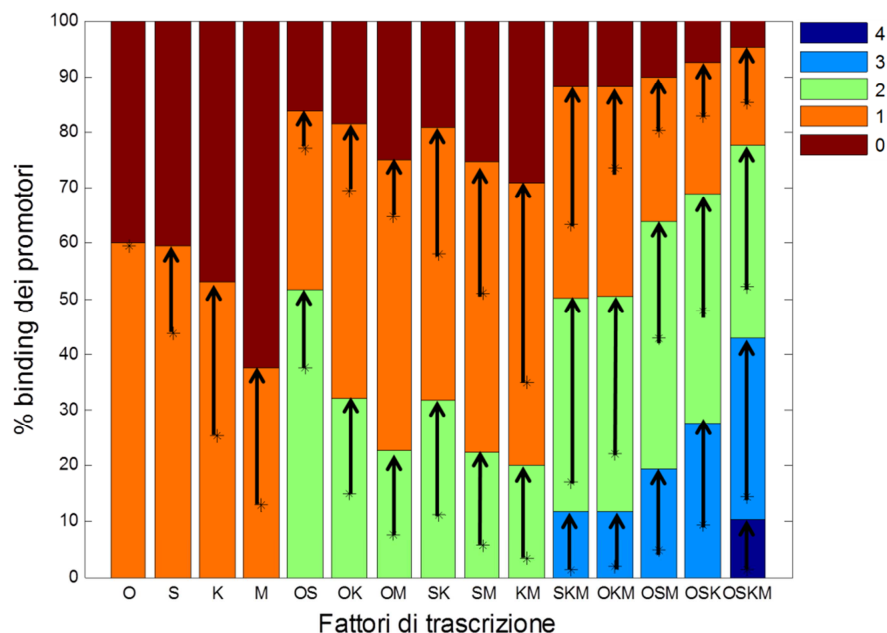


Figura 5.4 Percentuale di binding per MOI 60. Gli asterischi indicano i valori della simulazione di riferimento. La legenda indica il numero di fattori di trascrizione attaccati ad uno stesso promotore.

In generale, si può osservare che per MOI maggiori la percentuale di binding aumenta considerevolmente in tutti i casi. L'unica eccezione è costituita dai promotori target per il solo

Oct4, in questo caso vi è un aumento trascurabile della percentuale di binding rispetto la condizione di riferimento. Ciò è dovuto al metodo di implementazione del processo di DNA binding. In particolare si è assunto che i fattori di trascrizione abbiano il 60% di probabilità di legarsi ai promotori target. Perciò è statisticamente improbabile che la percentuale di binding superi il valore della probabilità impostata.

5.2.1.2 MOI 40

In Figura 5.5 viene riportata la percentuale di cellule contenenti un certo numero di molecole di Oct4 e Sox2 per cellula.

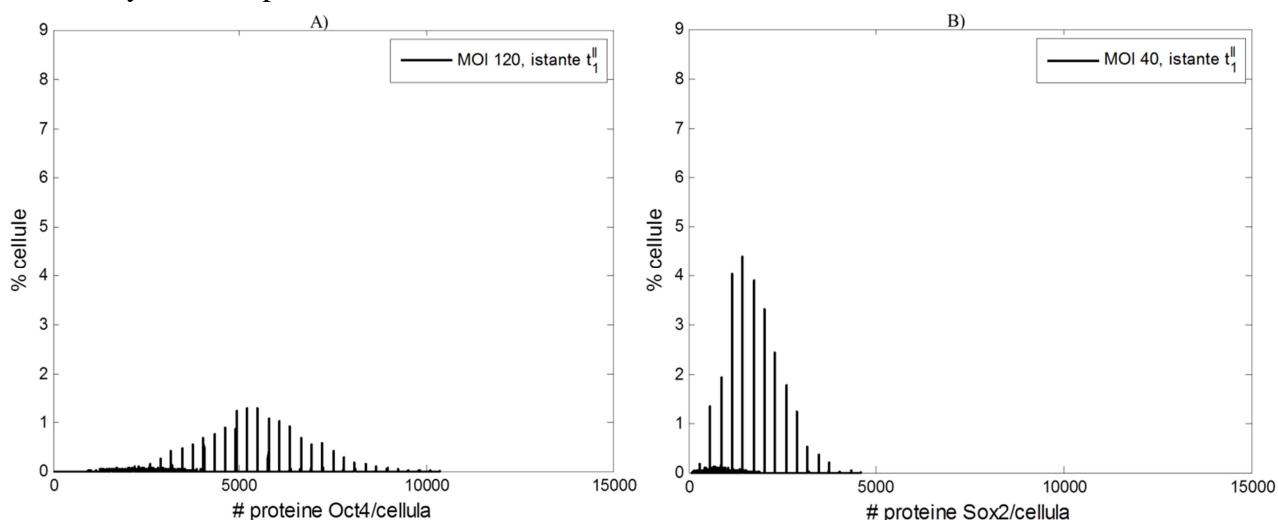


Figura 5.5 Distribuzione del numero di molecole di fattori di trascrizione per cellula nella popolazione cellulare. MOI 40; A) Oct4, B) Sox2.

Il profilo di distribuzione è qualitativamente analogo al caso riportato per MOI 60. La media pesata del numero di molecole di Oct4 per cellula è di 4607 mentre per Sox2 si ha un valore di 1535. Considerando Oct4, passando da MOI 180 a 120, la media del numero di molecole contenute nelle cellule diminuisce del 30%, mentre prendendo in considerazione Sox2 la diminuzione della media è del 35%.

La Figura 5.6 riporta i risultati della percentuale di binding. Si nota che l'aumento della percentuale è di poco inferiore al caso con MOI 60 (Figura 5.4). le condizioni qualitative sono analoghe al caso precedente.

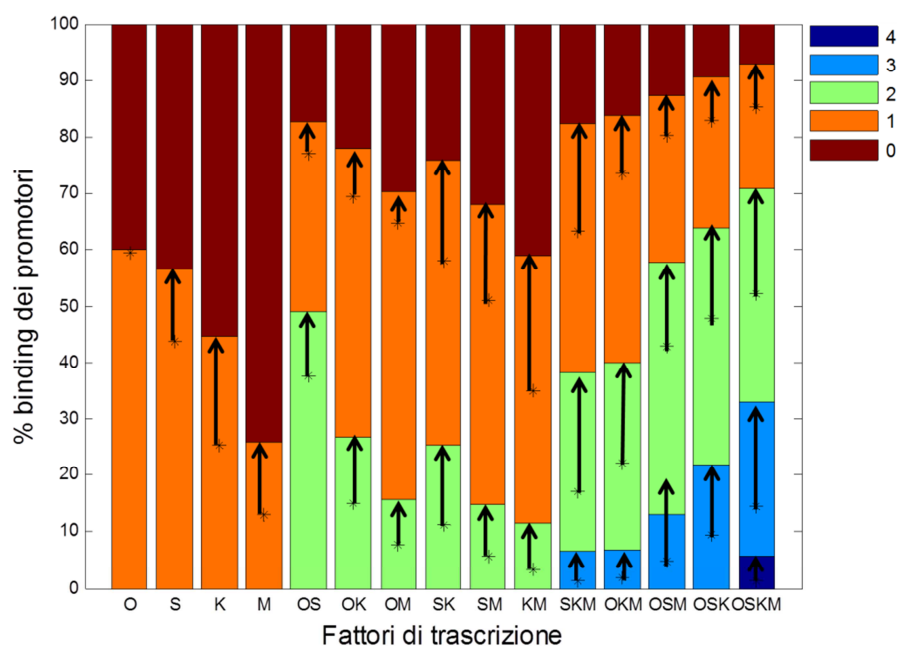


Figura 5.6 Percentuale di binding per MOI 40. Gli asterischi indicano i valori della simulazione di riferimento. La legenda indica il numero di fattori di trascrizione attaccati ad uno stesso promotore.

5.2.1.3 Eterogeneità della popolazione cellulare

Calcolando il coefficiente di variazione (Equazione 5.1), CV, per le distribuzioni relative alla percentuale di cellule che contengono un certo numero di proteine, è possibile valutare la variazione dell'eterogeneità in funzione della modifica dell'MOI. La Figura 5.7 indica come varia il CV in funzione dell'MOI.

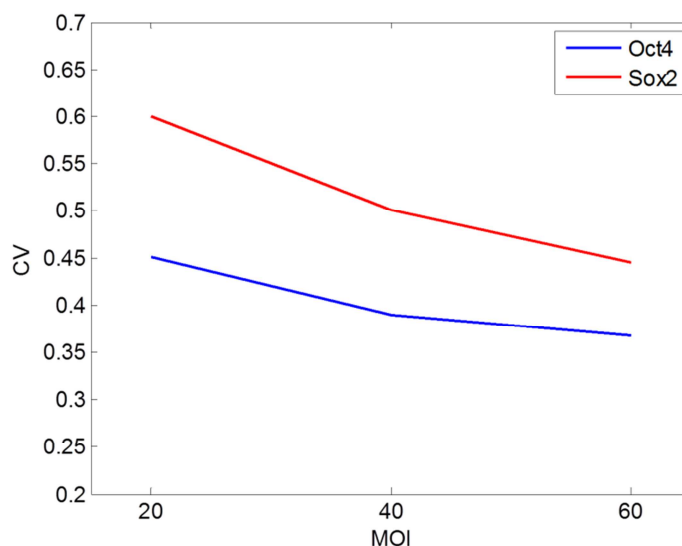


Figura 5.7 Coefficiente di variazione della percentuale di cellule che contengono un certo numero di proteine in funzione dell'MOI.

Dalla Figura 5.7 emerge che aumentando l' MOI il coefficiente di variazione diminuisce. Questo andamento è dovuto alla normalizzazione della deviazione standard rispetto alla media. Infatti, l'andamento risulta opposto per la deviazione standard, che aumenta all'aumentare della MOI.

5.2.2 Variazione del numero di cicli di infezione

5.2.2.1 Tre cicli di infezione

Si è voluto studiare l'effetto di un maggior numero di cicli di infezioni sulla produzione cellulare di fattori di trascrizione e sul loro binding al DNA. In Figura 5.8 viene riportata la percentuale di cellule che contengono un certo numero di molecole di Oct4 e Sox2 per cellula.

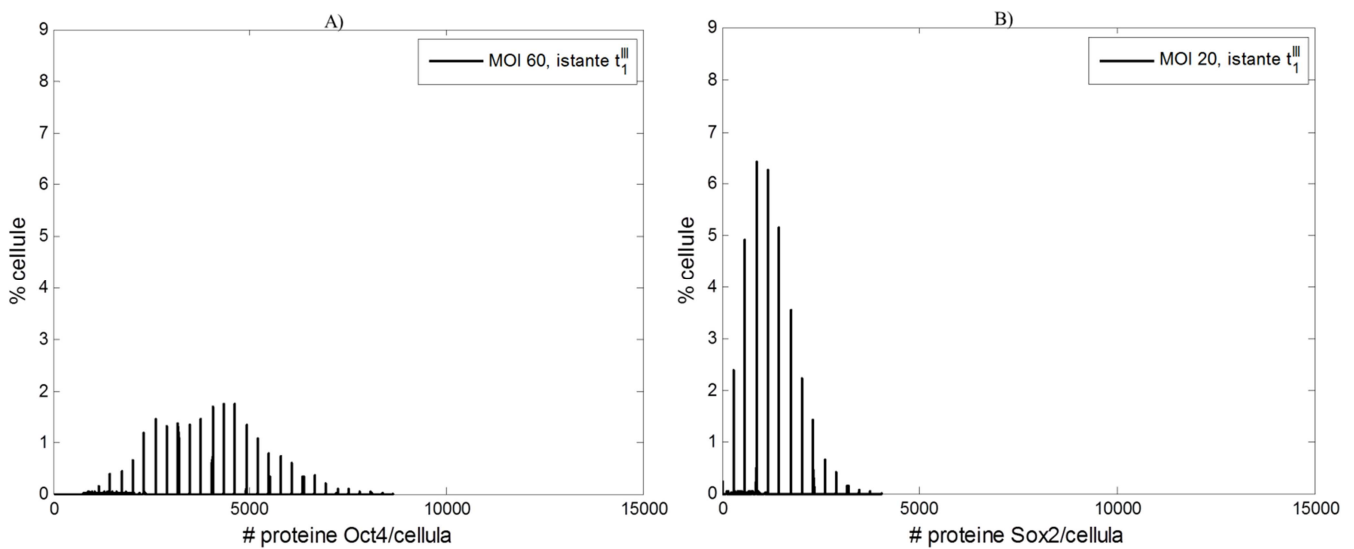


Figura 5.8 Distribuzione del numero di molecole di fattori di trascrizione per cellula nella popolazione cellulare. 3 cicli di infezione; A) Oct4, B) Sox2.

Il contenuto medio di tutta la popolazione del numero di proteine Oct4 e Sox2 è di 3978 e 1335, rispettivamente.

La Figura 5.9 rappresenta la percentuale di binding.

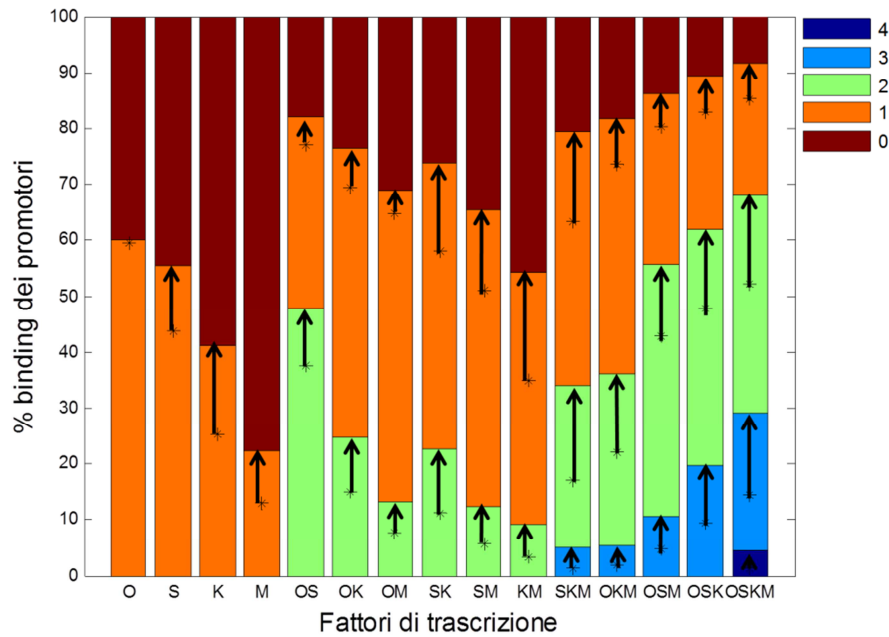


Figura 5.9 Percentuale di binding per 3 infezioni. Gli asterischi indicano i valori della simulazione di riferimento. La legenda indica il numero di fattori di trascrizione attaccati ad uno stesso promotore.

Osservando la Figura 5.9 e la Figura 5.6 si può notare che l'aumento della percentuale di binding dovuta all'aggiunta di un ciclo di infezione è confrontabile con l'aumento ottenuto a MOI doppio.

5.2.2.2 Quattro cicli di infezione

In Figura 5.10 viene riportata la distribuzione in percentuale del contenuto di proteine per cellula alla fine del quarto ciclo di infezione simulato.

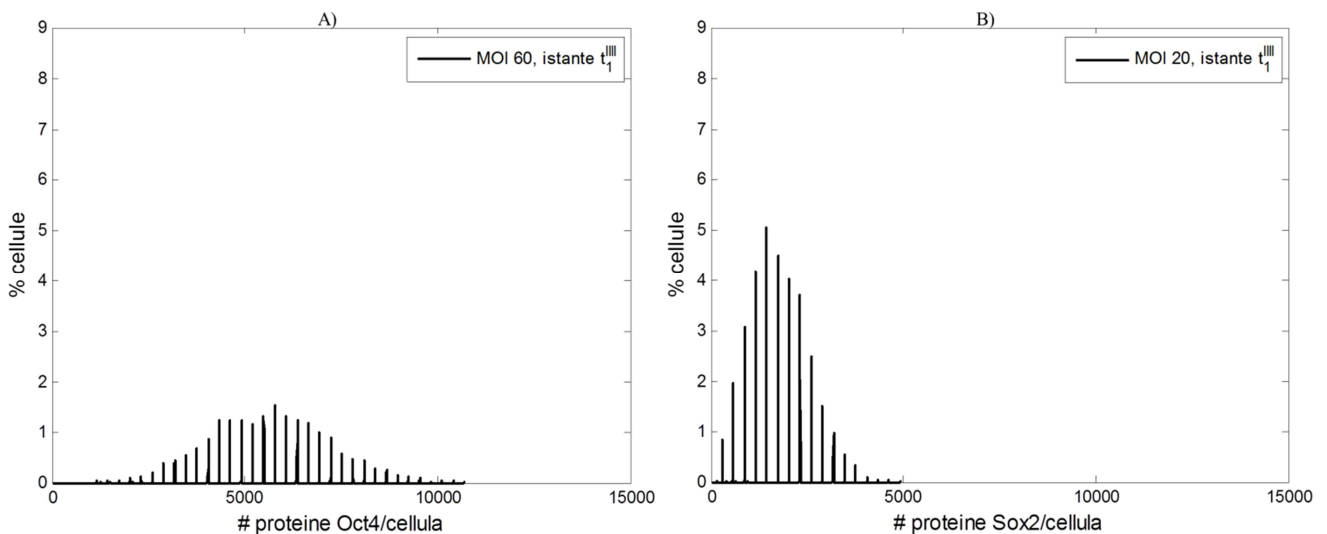


Figura 5.10 Distribuzione del numero di molecole di fattori di trascrizione per cellula nella popolazione cellulare. 4 cicli di infezione; A) Oct4, B) Sox2.

Qualitativamente il profilo di distribuzione della percentuale di cellule è analogo ai risultati analizzati per i 3 cicli di infezione. Confrontando la media del numero di proteine per cellule tra le 3 e le 4 infezioni si ottengono valori leggermente maggiori nel secondo caso. Questo si verifica perché il contenuto di proteine che vengono prodotte al quarto ciclo si somma a quelle presenti ai cicli precedenti. La deviazione standard è maggiore nel caso di Oct4 rispetto Sox2, si ha 1497 e 769, rispettivamente.

In Figura 5.11 viene riportata la percentuale di binding ottenuta al termine del quarto ciclo di infezione.

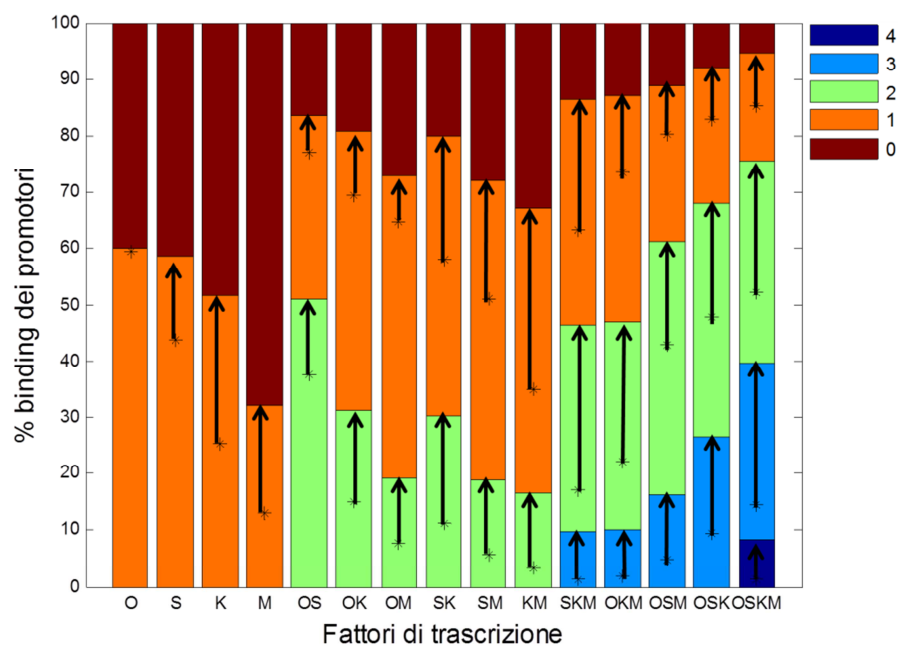


Figura 5.11 Percentuale di binding per 4 infezioni. Gli asterischi indicano i valori della simulazione di riferimento. La legenda indica il numero di fattori di trascrizione attaccati ad uno stesso promotore.

Confrontando la Figura 5.11 con la 5.9 emerge che l'aggiunta di un quarto ciclo di infezione aumenta di poco la percentuale di binding.

5.2.2.3 Eterogeneità della popolazione cellulare

La Figura 5.12 indica la variazione del coefficiente di variazione dei risultati di distribuzione del contenuto di proteina Oct4 e Sox2 in tutta la popolazione cellulare in funzione numero di cicli di infezione.

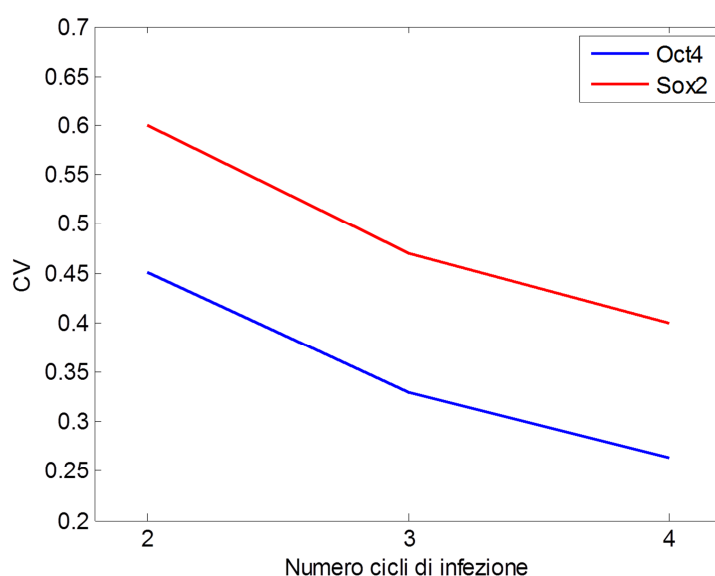


Figura 5.12 Coefficiente di variazione della percentuale di cellule che contiene un certo numero di proteine in funzione del numero di cicli di infezione.

Dalla Figura 5.12 emerge che aumentando i cicli di infezione il coefficiente di variazione diminuisce. Confrontando la Figura 5.12 con la 5.7 si può osservare che la variazione del CV è più marcata in funzione del numero di cicli di infezione rispetto all'MOI.

5.2.3 Variazione del tempo di inter-infezione

5.2.3.1 Tempo di inter-infezione di 24 h

La Figura 5.13 mostra la distribuzione della percentuale di cellule contenente proteine Oct4 e Sox2.

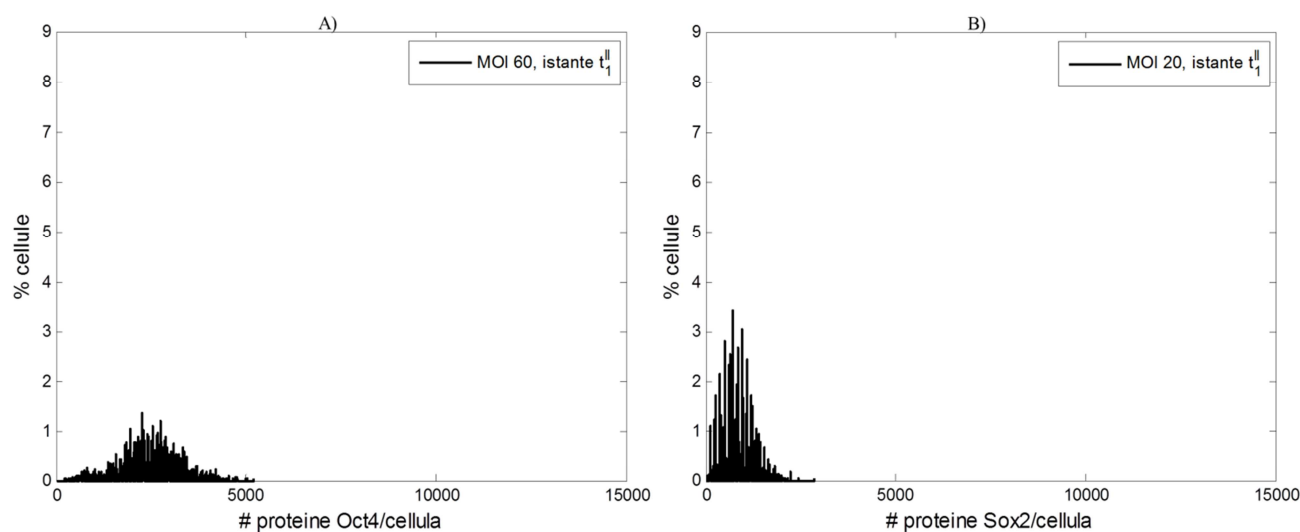


Figura 5.13 Distribuzione del numero di molecole di fattori di trascrizione per cellula nella popolazione cellulare. Tempo di inter-infezione di 24 h; A) Oct4, B) Sox2.

Confrontando la Figura 5.13 con i risultati relativi alla variazione di MOI e numero di infezioni si nota che diminuendo il tempo di inter-infezione il numero di proteine si distribuisce su livelli più ravvicinati. Inoltre, rispetto alla condizione di riferimento, una diminuzione del tempo dedicato all'evoluzione dei processi intracellulari non modifica in modo considerevole la media del contenuto di proteine per cellula. I risultati relativi al tempo di inter infezione di 24 h non vengono influenzati dalla duplicazione cellulare, infatti il tempo di duplicazione, determinato sperimentalmente, è di 37 h. In riferimento alla dinamica di produzione delle proteine 24 h non sono sufficienti per raggiungere lo stato stazionario e questo contribuisce a diminuire la percentuale di cellule che contengono un certo numero di proteine. Questo comportamento si riflette sulla percentuale di binding indicata in Figura 5.14.

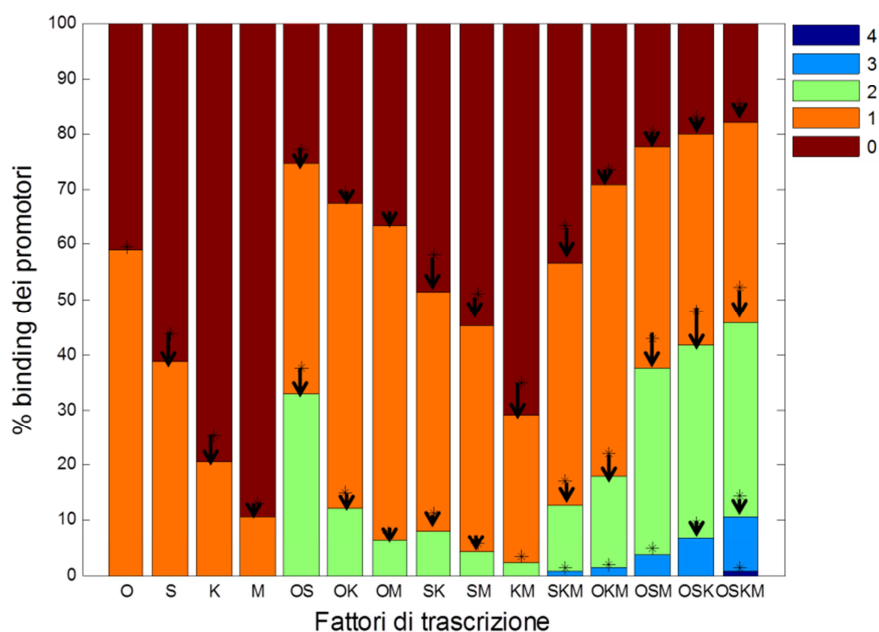


Figura 5.14 Percentuale di binding per un tempo di inter-infezione pari a 24 ore. Gli asterischi indicano i valori della simulazione di riferimento. La legenda indica il numero di fattori di trascrizione attaccati ad uno stesso promotore.

La Figura 5.14 mostra che diminuendo la durata del tempo di inter infezione si verifica una diminuzione della percentuale di binding rispetto il profilo ottenuto per un tempo di inter infezione di 121 h. Essenzialmente ciò è dovuto al limitato numero di proteine presente nelle cellule in quanto le 24 ore non sono sufficienti per produrre un numero di proteine considerevole.

5.2.3.2 Tempo di inter infezione di 48 h

Osservando la Figura 5.15 si può notare che la distribuzione è fortemente influenzata dalla duplicazione cellulare.

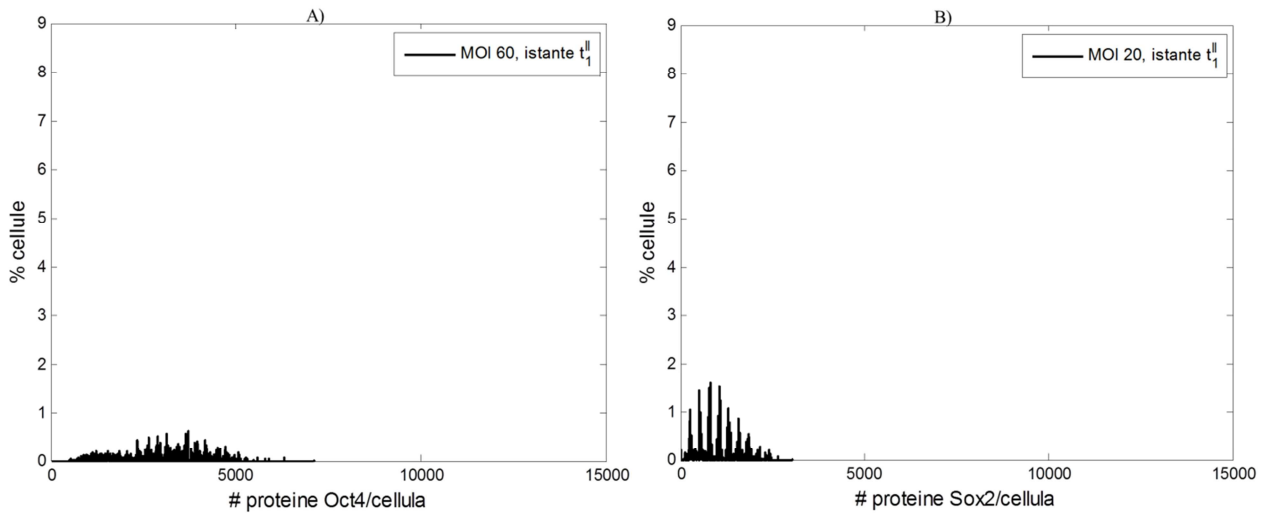


Figura 5.15 Distribuzione del numero di molecole di fattori di trascrizione per cellula nella popolazione cellulare. Tempo di inter-infezione di 48 h; A) Oct4, B) Sox2.

La media del numero di proteine Oct4 e Sox2 è di 2210 e 740 rispettivamente e questo indica che la duplicazione cellulare provoca uno spostamento verso sinistra della media della distribuzione. Infatti il tempo di inter infezione di 48 h è di poco superiore al tempo di duplicazione di 37 h, per cui è probabile che una consistente frazione di cellule si duplichi poco prima del termine del ciclo di infezione, quindi il numero di proteine si ripartisce in modo asimmetrico. Queste cellule che si duplicano non dispongono di tempo sufficiente per raggiungere lo stato stazionario di produzione della proteina. Questo fenomeno è meno evidente per un tempo di inter infezione di 121 h in quanto per elevati tempi le cellule raggiungono la concentrazione di confluenza, per cui la frazione di cellule che si duplicano è inferiore rispetto a quelle per tempo di inter infezione di 48 h.

La Figura 5.16 mostra la percentuale di binding.

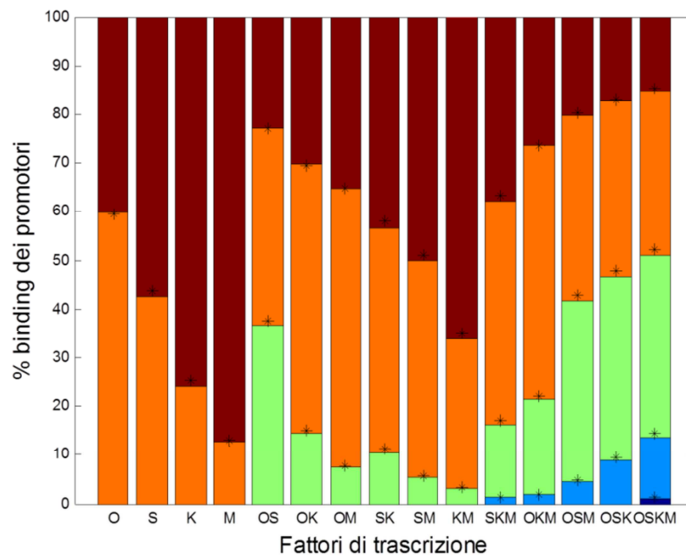


Figura 5.16 Percentuale di binding per un tempo di inter infezione pari a 48h. Gli asterischi indicano i valori della simulazione di riferimento.

Si può notare che l'andamento della percentuale di binding è pressoché analogo alla condizione di riferimento.

5.2.3.3 Eterogeneità della popolazione cellulare

La Figura 5.17 indica la variazione del coefficiente di variazione dei risultati di distribuzione del contenuto di proteina Oct4 e Sox2 in tutta la popolazione cellulare in funzione del tempo di inter infezione.

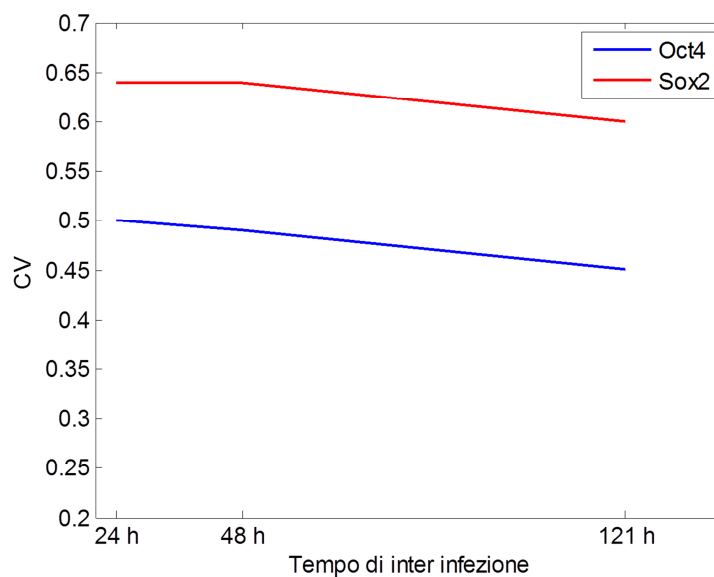


Figura 5.17 Coefficiente di variazione della percentuale del numero di cellule che contengono un certo numero di proteine in funzione del tempo di inter infezione.

Dalla Figura 5.17 emerge che aumentando i cicli di infezione il coefficiente di variazione diminuisce. In questo caso per tempi di inter infezione di 24 h e 48 h il valore di CV è quasi analogo, mentre per tempi di inter infezione pari a 121 h si osserva una leggera diminuzione.

5.3 Conclusioni sull'analisi di sensitività

L'analisi di sensitività è servita per comprendere come variando le condizioni sperimentali si influisca sul rilascio del DNA virale e di conseguenza, tramite DNA binding, sull'espressione proteica episomale. L'obiettivo sperimentale è quello di massimizzare l'efficienza di riprogrammazione, che è favorita da un elevato contenuto dei fattori di trascrizione presente nelle cellule. Inoltre, avere una eterogeneità della popolazione cellulare bassa aumenta la qualità delle cellule prodotte, che forniscono una risposta più omogenea in studi biologici successivi. Dal punto di vista matematico queste condizioni vengono ottenute con un elevato valore della media della distribuzione della percentuale di cellule che contengono un certo

numero di proteine e da un basso valore della deviazione standard, in modo tale da avere un profilo genetico il più omogeneo possibile in tutta la popolazione cellulare.

Si è visto che aumentando la MOI e il numero dei cicli di infezione si ottiene un considerevole incremento della percentuale di binding. La media del contenuto di proteine per cellula aumenta, tuttavia anche la deviazione standard della distribuzione del numero di proteine per cellula aumenta rendendo la popolazione più eterogenea. I valori più alti del coefficiente di variazione si sono osservati per tempi di inter-infezione inferiore alle 121 ore, perché, con una durata dei processi di intracellulari che va dalle 24 h alle 48 h, l'effetto del mancato raggiungimento dello stato stazionario nella produzione di proteine e della duplicazione cellulare rispettivamente producono un aumento dell'eterogeneità delle cellule. Infatti il tempo di inter-infezione di 48 h è di poco superiore al tempo di duplicazione, perciò è molto probabile che una consistente frazione di cellule si duplichi poco prima del termine del ciclo di infezione, provocando una suddivisione asimmetrica del contenuto di proteine, tale comportamento contribuisce ad aumentare l'eterogeneità della popolazione cellulare. Simulando processi caratterizzati da un numero di infezioni di tre e quattro si è potuto constatare una notevole diminuzione del coefficiente di variazione per il secondo caso. Questo risultato suggerisce che per rendere più omogenea possibile la distribuzione del contenuto proteico nelle cellule è opportuno aumentare il numero di infezioni.

L'analisi di sensitività è servita per comprendere come intervenire sulle variabili del modello stocastico fornendo un valido strumento per condurre una progettazione degli esperimenti (*experimental design*). Si è potuto notare che per migliorare il livello di espressione episomale è necessario agire sulla MOI e sul numero dei cicli di infezioni. Per esempio un aumento della MOI porta un incremento della percentuale di binding e del contenuto medio delle proteine per cellula, inoltre, eseguire 4 cicli di infezione limita l'effetto dell'eterogeneità della popolazione cellulare che caratterizza il processo di infezione a MOI elevati. Da queste considerazioni emerge che conviene, per esempio, condurre un esperimento a MOI 180:60:60:60, 4 cicli di infezione e tempo di inter infezione di 121 h. In conclusione, utilizzando il modello stocastico sviluppato come supporto tecnico è possibile eseguire un *experimental design* sulla base delle considerazioni effettuate dall'analisi di sensitività.

Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato sviluppato un modello stocastico per simulare il processo di riprogrammazione cellulare per ottenere cellule iPS tramite l'approccio dell'infezione virale transiente in piattaforma microfluidica.

Si è tradotto in linguaggio matematico la dinamica di infezione di quattro tipi di vettori adenovirali, ciascuno dei quali contiene i geni che codificano i fattori di trascrizione Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc, ed i processi intracellulari. In particolare, si è simulata la sintesi di mRNA e proteina integrata con la duplicazione cellulare ed il DNA binding dei quattro fattori di trascrizione ai promotori dei geni target sul DNA, tenendo conto del meccanismo cooperativo positivo tra i fattori Oct4 e Sox2. Alcuni parametri del modello sono stati fissati in modo arbitrario, tuttavia una validazione sperimentale sarà svolta prossimamente nel laboratorio BioERA. Si sono analizzati inoltre aspetti riguardanti l'implementazione dell'algoritmo nel software di calcolo MATLAB.

Il modello ha permesso di ottenere una correlazione tra le variabili operative (MOI, rapporti stechiometrici tra i quattro fattori, numero e durata dei cicli di infezione) ed il rilascio del DNA virale e quindi l'espressione episomale dei quattro fattori esogeni, necessaria per la riprogrammazione cellulare.

È stata svolta un'analisi di sensitività per analizzare come ciascuna condizione operativa influisca sulle proprietà medie e distribuite della popolazione cellulare. Questo studio fornisce una valida base di partenza per condurre un'analisi multi parametrica che identifichi condizioni sperimentali ottimali (*experimental design*).

Data la complessità dei processi di remodeling del DNA che portano all'effettiva riprogrammazione cellulare, si è ritenuto di simulare la prima fase di questo processo, dal rilascio di fattori esogeni al loro binding sul DNA, lasciando all'analisi sperimentale la caratterizzazione della seconda fase di ottenimento di cellule staminali pluripotenti indotte. Oltre che dall'insufficienza dei dati sperimentali, questa scelta è motivata dal fatto che le condizioni operative sotto il controllo dell'operatore sono principalmente legate al rilascio dei fattori esogeni che in cascata controllano i processi intracellulari.

La validazione sperimentale del modello stocastico sviluppato in questa tesi e l'analisi delle condizioni di DNA binding che favoriscono l'ottenimento di cellule staminali pluripotenti indotte costituiscono gli obiettivi futuri del progetto di ricerca in corso nel laboratorio BioERA.

Nomenclatura

d_cell	=	Diametro delle cellule (μm)
n_z	=	Numero di celle lungo z (-)
n_x	=	Numero di celle lungo x (-)
H	=	Altezza microcanale (μm)
W	=	Larghezza microcanale (μm)
L	=	Lunghezza microcanale (μm)
Conc_semina	=	Concentrazione di semina ($\text{cellule}/\mu\text{m}^2$)
Ncell_t0	=	Numero di cellule iniziale
Vol_medium	=	Volume del microcanale (μm^3)
n_infezioni	=	Numero di infezioni (-)
n_FT	=	Numero di fattori di trascrizione (-)
ti_i	=	Tempo totale dei processi di inter-infezione (h)
rapporti_stech	=	Rapporti stechiometrici fra i fattori di trascrizione (-)
MOI	=	Multiplicity of infection (-)
Qtot	=	Portata inflow ($\mu\text{L}/\text{min}$)
tf_flow	=	Tempo di inflow (s)
t_infez	=	tempo di infezione (s)
v_mean	=	Velocità media del fluido ($\mu\text{m}/\text{s}$)
Q_virus_v	=	Portata di virus (numero virus/s)
D_vf	=	Coefficiente di diffusione dei virus nel medium ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
P1	=	Probabilità di infezione ($\text{s}^{0.5}$)
xdevst_virus	=	Deviazione standard della curva di distribuzione del contenuto di DNA virale (-)
xdevst_RNA	=	Deviazione standard della curva di distribuzione del contenuto di mRNA virale (-)
xdevst_P	=	Deviazione standard della curva di distribuzione del contenuto di Proteina (-)
K_transcription	=	Costante cinetica della trascrizione (h^{-1})
K_deg_mRNA	=	Costante cinetica della degradazione di mRNA (h^{-1})
K_translation	=	Costante cinetica di traduzione (h^{-1})
K_deg_protein	=	Costante cinetica di degradazione proteica (h^{-1})
td	=	Tempo di duplicazione (h)
Kconc	=	Concentrazione di confluenza (numero cellule/ μm^2)

delta_t	=	Tempo di discretizzazione della fase di infezione (s)
st_dev	=	Cammino libero medio dei virus (μm)
DeltaT	=	Tempo di discretizzazione dei processi intracellulari (h)
N0	=	Numero di cellule all'inizio dei cicli di infezione (-)
N1	=	Numero di cellule alla fine dei cicli di infezione (-)
A0	=	Matrice del substrato cellulare all'inizio del ciclo di infezione (-)
A1	=	Matrice del substrato cellulare al termine del ciclo di infezione (-)
B0	=	Matrice del numero di DNA virale per cellula all'inizio del ciclo di infezione (-)
B1	=	Matrice del numero di DNA virale per cellula al termine del ciclo di infezione (-)
C0	=	Matrice del numero di mRNA virale per cellula all'inizio del ciclo di infezione (-)
C1	=	Matrice del numero di mRNA virale per cellula al termine del ciclo di infezione (-)
D0	=	Matrice del numero di proteine per cellula all'inizio del ciclo di infezione (-)
D1	=	Matrice del numero di proteine per cellula al termine del ciclo di infezione
xpos	=	Coordinata x della posizione dei virus (μm)
ypos	=	Coordinata y della posizione dei virus (μm)
zpos	=	Coordinata z della posizione dei virus (μm)
stuck	=	Coordinate x z dei virus attaccati (μm)
t_stuck	=	Istante di attacco di ciascun virus (s)
cell_inf_FT_0	=	Percentuale di cellule positive ad ogni tipo di virus all'inizio del ciclo di infezione (%)
cell_inf_FT_1	=	Percentuale di cellule positive ad ogni tipo di virus al termine del ciclo di infezione (%)
D1_fase4	=	Matrice del contenuto dei 4 FT per ogni cellula (-)
Matrix_OS KM	=	Matrice dei promotori dei geni target (-)
No_gene	=	Numero totale dei promotori (-)
gene	=	Matrice dei promotori attaccati da ciascun fattore di trascrizione (-)
threshold	=	Probabilità di binding (-)
FT_dissolved	=	Numero di fattori di trascrizione ce non si sono legati ai promotori (-)
rand_vect	=	Vettori con elementi di numeri casuali che identificano la traiettoria del moto browniano (-)

DNA	=	Contenuto di DNA virale per singola cellula (-)
RNA	=	Contenuto di mRNA per singola cellula
P	=	Contenuto di proteina per singola cellula (-)
parent_virus	=	Numero di DNA virale presente nella cellula prima della duplicazione (-)
parent_RNA	=	Numero di mRNA presente nella cellula prima della duplicazione (-)
parent_P	=	Numero di proteine presenti nella cellula prima della duplicazione (-)
child1	=	Numero di DNA virale nella prima cellula figlia (-)
child2	=	Numero di DNA virale nella seconda cellula figlia (-)
child1RNA	=	Numero di mRNA nella prima cellula figlia (-)
child2RNA	=	Numero di mRNA nella seconda cellula figlia (-)
child1P	=	Numero di proteina nella prima cellula figlia (-)
child2P	=	Numero di proteina nella seconda cellula figlia (-)

Bibliografia

Andrews S., Bray D. *Stochastic simulation of chemical reactions with spatial resolution and single molecule detail*, Physical Biology; 2004, 1: 37–51.

Anekal et al. *Dynamics of virus spread in the presence of fluid flow*, Integr. Biol.; 2009, 1: 664-671.

Arino J, Wang L, Wolkowicz G. S. *An alternative formulation for a delayed logistic equation*, J Theor Biol; 2006, 241: 109-19.

Bachmair, A., Finley D., and Varshavsky A. *In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue*, Science; 1986, 234: 179–186.

Beebe D.J., Mensing G.A., and Walker G.M. *Physics and applications of microfluidics in biology*, Annual Review Biomedical Engineering; 2002, 4: 261-286.

Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M., *Adenovirus vectors for gene delivery*, Current Opinion in Biotechnology; 1999, 10: 440-447.

Blau C.A. *Current status of stem cell therapy and prospects for gene therapy for the disorders of globin synthesis*, Baillieres Clin Haematol; 1998, 11(1): 257–275.

Breslauer D.N., Lee P.J., and Lee L.P. *Microfluidics-based systems biology*, Molecular Biosystem; 2006, 2: 97-112.

Burns CJ, Persaud SJ, Jones PM. *Diabetes mellitus: A potential target for stem cell therapy*, Current Stem Cell Research; 2006; 1(2): 255–266.

Carter J. B., Saunders V. A., *Virology: principles and applications*, 2007.

Chen L., Liu L. *Current progress and prospects of induced pluripotent stem cells*, Science in China Series C: Life Sciences; 2009, 52: 622-636.

Chen X, Xu H, Yuan P, Fanf F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, et al. *Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells*, Cell; 2008; 133: 1106-1117.

- Chilakuru R., Ryu D., Yilma T., *Propagation of recombinant vaccinia virus in HeLa cells: adsorption Kinetics and replication in batch cultures*, Biotechnol Prog; 1991.
- Defer C., Belin M., Caillet B. M., Boulanger P., *Human-adenovirus – host cell interactions: Comparative study with members of subgroups B and C*, Virology; 1990.
- Dinh A., Theofanous T., Mitragotri S., *A Model for Intracellular Trafficking of Adenoviral Vectors*, Biophysical Journal; 2005, 89: 1574–1588.
- Endy D., Kong D., Yin J., *Intracellular kinetics of a growing virus: A genetically structured simulation for bacteriophage T7*, Biotechnology Bioengineering; 1997.
- English T.J., Hammer D. A., *Brownian adhesive dynamics (BRAD) for simulating the receptor-mediated binding of viruses*, Biophysical Journal; 2004.
- Einstein A., *Investigations on the Theory of the Brownian Movement*, 2011.
- Galdiero F., *Adenovirus aggregation and preservation in extracellular environment*, Arch. Virol., 1979.
- Gardner T.S., Cantor C.R., Collins, J.J, *Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli*, Nature; 2000, 403: 339–342.
- Hanna J., Saha K., Pando B., Vab Zon J., Lengner C. J., Creighton M. P., Van Oudenaarden A., Jaenisch R., *Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration*, Nature; 2009, 462: 595-601.
- Jackson D., A. Pombo A., and Iborra T. *The balance sheet for transcription: an analysis of nuclear RNA metabolism in mammalian cells*, FASEB Journal; 2000, 14: 242–254.
- Khalid A., Muhammad S. A., *Tracking Brownian motion through video microscopy*, LUMS School of Science and Engineering, 2010.
- Kim J, Cgu J. Shen X., Wang J. Orkin S. *An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells*, Cell 2008; 132: 1049-1061.
- Kim L., Toh Y., Voldman J., and Yu H. *A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells*, Lab on a chip; 2007, 7: 681-694.
- Ko M. S., Nakauchi H., Takahashi N. *The dose dependence of glucocorticoid-inducible gene expression results from changes in the number of transcriptionally active templates*, EMBO; 1990, 9: 2835-2842.
- Koern et al., *Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes*, Nature Reviews Genetics; 2005, 6: 451-464.
- Maherali N, et al. *A high-efficiency system for direct reprogramming of multiple somatic cells to pluripotency*, Cell Stem Cell; 2008, 3: 340-345.

Martin GR. *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*, Proc Natl Acad Sci U S A; 1981, 78(12): 7634-7638.

Mitrovic J. *A simple explicit equation for the saturation temperature of humid air*, Chemical Engineering Technology; 2011, 8: 1288-1294.

Moayeri M, Hawley TS, Hawley RG *Correction of murine hemophilia a by hematopoietic stem cell gene therapy*, Mol Ther; 2005, 12(6): 1034–1042.

Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. *Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration*, Nature Biotechnology; 2006, 24(6): 687–696.

Murray J. W., Bananis E., and Wolkoff A. W. *Reconstitution of ATP-dependent movement of endocytic vesicles along microtubules in vitro: an oscillatory bidirectional process*, Mol. Biol. Cell.; 2000, 11:419–433.

Murray, J. W., and A. W. Wolkoff. *Roles of the cytoskeleton and motor proteins in endocytic sorting*, Adv. Drug Deliv. Rev; 2003, 55: 1385–1403.

Muzenda E. Afolabi S. Belaid M. *A Simple Static Headspace Method for Phase Equilibrium Measurement* Proceeding of World Congress on Engineering and Computer Science; 2011.

Nielsen, E., F. Severin, J. M. Backer, A. Hyman, and M. Zerial *Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules*, Nature Cell Biology; 1999, 1:376–382.

Niwa H., Miyazaki J., Smith A. G. *Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells*, Nat Genet; 2000, 24: 372-376.

Osborne C.S., Chakalova L., Brown K.E., Carter D., Horton A., Debrand E., Goyenechea B., Mitchell J.A., Lopes S., Reik W., Fraser P., *Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription*, Nature Genetic; 2004, 36: 1065–1071.

Rao MS., *Stem sense: a proposal for the classification of stem cells*, Stem Cells Device; 2004, 13: 452-455.

Reddy, B., and J. Yin. *Quantitative intracellular kinetics of HIV-1*, AIDS Res. Hum. Retroviruses; 1999, 15: 273–283.

Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*, Cell; 2007, 131(5): 861–872.

Takahashi K, et al. *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*, Cell; 2007, 131: 861-872.

Toepke M., Beebe D. *PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications*, Lab on a Chip; 2006, 6: 1487-1486.

Waddington, C.H, *The Strategy of the Genes: a Discussion of Some Aspects of Theoretical, Biology* (London: Allen & Unwin); 1957.

Wansink D.G., Schul W., Van der Kraan I., Van Steensel B., Van Driel R., De Jong L, *Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus*, *Cell Biology*; 1993, 122: 283–293.

Wickham T., Granados R., Wood H., Hammer D., Shuler M., *General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces*, *Biophysical Journal*; 1990.

Yamanaka S., *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*, *Cell*; 2006, 126: 663-676.

Yamaoka T., *Regeneration therapy for diabetes mellitus*, *Expert Opinion Biology Theory*; 2003, 3(3): 425–433.

Yildirim, N., and M. C. Mackey *Feedback regulation in the lactose operon: a mathematical modeling study and comparison with experimental data*. *Biophysics Journal*; 2003, 84: 2841–2851.

Yu J, et al. *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*, *Science*; 2007, 318: 1917-1920.

Zhadanov V.P. *Intracellular viral kinetics limited by the supply of amino acids for synthesis of viral proteins*, *Elsevier*; 2009.

Zhou W, Freed C. R. *Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells*, *Stem Cells*; 2009, 27(11): 2667–2674.

APPENDICE A

In questa appendice viene riportato l'algoritmo principale di simulazione del processo di riprogrammazione cellulare che richiama le function, con i relativi input e output, che descrivono le singole fasi dell'intero processo di infezione virale. Inoltre viene riportato il codice di post-processing utilizzato per ottenere le figure della tesi.

A.1 Algoritmo principale

```
function SIMULAZIONE_RIPROGRAMMAZIONE_CELLULARE
clear all; clc; close all
format long g

%% NOTA BENE
% variabili "0_save" = subito dopo ogni infezione
% variabili "1_save" = subito dopo ogni periodo inter-infezione

%% Generatore di numeri random

% rand ('twister',1)
% randn('state',1)
%questo serve per stabilire la semina cellulare iniziale

%% Dati
% Mesh xz
d_cell= 65; %um
n_z=23;
n_x=259;
n_square=n_z*n_x; %numero di quadrati in cui è diviso il piano

% Geometria del volume simulato, e numero di cellule
H = 200; % um, in direzione y
W = d_cell*n_z; % um, in direzione z
L = d_cell*n_x; % um, in direzione x
Conc_semina = 80e-6; % cell/um2
Area_cell=L*W; % um2 area del substrato cellulare
Ncell_t0 = round(Area_cell*Conc_semina); % total cells in channel
Entrance_section= H*W; %um2 sezione di entrata medium e virus
Vol_medium=H*Area_cell; %um3

%-----
% INFEZIONE
n_infezioni = 2; %numero di infezioni multiple
n_FT = 4; %numero dei fattori di trascrizione
ti_i = 121*ones(1,n_infezioni); % [h] tempo totale dei processi inter-
infezione
rapporti_stech = [3 1 1 1]; % rapporti stechiometrici di infezione [Oct4
Sox2 Klf4 C-myc]
MOI = 20*ones(1,n_infezioni); % quantità di virus rispetto al numero di
cellule a t=0
MOI_v = zeros(n_infezioni,n_FT);
```

```

Conc_virus_in_v = zeros(n_infezioni,n_FT);
for n=1:n_infezioni
    for v=1:n_FT
        MOI_v(n,v) = MOI(n)*rapporti_stech(v);
        Conc_virus_in_v(n,v) = Ncell_t0*MOI_v(n,v)/Vol_medium; % [(virus
v)/um3]
    end
end

Qtot = 6; % uL/min
Qtot = Qtot*1e9/60; % um3/s
t0 = 0;
tf_flow = 2*60; % s, si riferisce al tempo di infusion
t_infez = 90*60; % s
tf = t_infez+2*tf_flow; % s, comprende il tempo di infuse, statica e
outflow: 2'+90'+2'
v_mean = Qtot/Entrance_section; % um/s, velocità media del fluido
v_max = 3/2*v_mean; % um/s, velocità massima
Q_virus_v = Qtot*Conc_virus_in_v; % virus/s portata di virus v all'n
infezione
N_virus_in_tot_v = Q_virus_v*tf_flow; %totale virus v entranti nel sistema
teorico all'n infezione

D_vf =3.67; %um2/s coefficiente di diffusione dei virus nel medium
P1 = 0.0079; % s^-0.5 coefficiente di proporzionalità tra probabilità di
infezione e t^0.5

n_virus_cell_max = round(max(max(MOI_v))*1.5); % contiene tutte le classi
superiori
Virus_tot_v = round(round(N_virus_in_tot_v)*1.3); % 1.3 tiene conto
dell'oscillazione stocastica nel # di virus entranti

time1 = zeros(1,n_infezioni);
time1(1) = tf/3600+ti_i(1);
if n_infezioni > 1
    for n = 2:n_infezioni
        time1(n) = time1(n-1)+tf/3600+ti_i(n); % h
    end
end

time0 = (time1-ti_i)*60; % min

% -----
% INTER-INFEZIONE
% Divisione cellulare con partizione asimmetrica
% Parametri input del processo di inter infezione
xdevst_virus = 10;
xdevst_RNA = 10;
xdevst_P = 10;

% Cinetiche dei processi inter-infezione
K_transcription = [1.98 1.98 1.98 1.98]; %(5.5E-4)*3600; % [1/h] velocità
caratteristica di trascrizione
K_deg_mRNA = [0.1368 0.1368 0.1368 0.1368]; %(3.8E-5)*3600; % [1/h]
velocità caratteristica di degradazione dell'mRNA virale
K_translation = [1.008 1.008 1.008 1.008]; %(2.8E-4)*3600; % [1/h]
velocità caratteristica di traduzione per ottenere la proteina
K_deg_protein = [0.0504 0.0504 0.0504 0.0504]; %(1.4E-5)*3600; % [1/h]
velocità caratteristica di degradazione della proteina

```

```

% Parametri del processo di duplicazione (equazione logistica) fittati da
dati sperimentali sui MEF
td = 37; % [h] tempo di duplicazione
%r = log(2)/td; % velocità di duplicazione
Kconc = 233.68; % [cellule/superficie] concentrazione di confluenza
K = round(Kconc*Area_cell*10^(-6)); %numero di cellule a confluenza
if K > n_square
    disp('ERROR!!');
end

%% Discretizzazione temporale
% INFEZIONE
% Si è scelto di suddividere il tempo di analisi in intervalli grandi che a
% loro volta sono suddivisi in altri più piccoli, in questo modo si decide
% di salvare i risultati solo sugli intervalli grandi
nt1 = 94; % numero degli intervalli grandi
nt2 = 34; % numero degli intervalli piccoli in ciascun intervallo grande
nt = nt1*nt2; %numero totali di intervalli piccoli, tipo ogni 0.1 s
delta_t = tf/nt; %verifica che sia più piccolo del tempo di infuse tf_flow
delta_t_big = delta_t*nt2; % s
s = sqrt(4*delta_t*D_vf); %um Verifica che sia piccolo abbastanza se
comparato a d_cell
if d_cell/s < 1
    disp('Check nt2!')
    errore
end

k_micro = P1*sqrt(delta_t); % adim; probabilità di infezione
nell'intervallo di tempo più piccolo
st_dev = sqrt(2*delta_t*D_vf); %um; cammino libero medio dei virus
Q_Deltat_v=Q_virus_v*delta_t; % quantità di virus v che passano
nell'intervallo piccolo delta_t all'n infezione

% INTER-INFEZIONE
DeltaT = 5; % h

%% Condizioni iniziali ed inizializzazioni
% Numero cellule nel canale e infettate
N0_save = zeros(1,n_infezioni); % # cell/ canale
N1_save = zeros(1,n_infezioni);
% c0_save = zeros(1,n_infezioni); % # cell/mm2
% c1_save = zeros(1,n_infezioni);

cell_inf_FT_0_save = zeros(n_infezioni,n_FT);
cell_inf_FT_1_save = zeros(n_infezioni,n_FT);

% Matrice A, contenente la posizione delle cellule
cell_pos = zeros(n_square,1);
while sum(cell_pos) < Ncell_t0
    index = ceil(n_square*rand); %ceil arrotonda per eccesso
    cell_pos(index,1) = 1;
end
A_t0 = zeros(n_z,n_x); % posizione delle cellule, matrice con 0=no cell e
1=cell
A_t0(:) = cell_pos;
clear cell_pos

```

```

A0_save = zeros(n_z,n_x,n_infezioni);
A1_save = zeros(n_z,n_x,n_infezioni);
A0 = A_t0;

% Matrici B, C, D, contenenti #virus, #RNA, conc. proteina /cell
B0 = cell(n_infezioni,n_FT);
B0_save = cell(n_infezioni,n_FT);
C0 = cell(n_infezioni,n_FT);
D0 = cell(n_infezioni,n_FT);
B1_save = cell(n_infezioni,n_FT);
C1_save = cell(n_infezioni,n_FT);
D1_save = cell(n_infezioni,n_FT);

% Condizione iniziale
for v=1:n_FT
    B0{1,v} = zeros(size(A0));
    C0{1,v} = -1*ones(size(A0));
    D0{1,v} = -1*ones(size(A0));
end

for v = 1:n_FT
    for i = 1:n_z
        for j = 1:n_x
            if A0(i,j) == 1
                C0{1,v}(i,j) = 0;
                D0{1,v}(i,j) = 0;
            else
                end
        end
    end
end

k = 0; % numero totale di virus attaccati
indice = 0; % numero totale di virus entrati effettivamente

%% START SIMULATION

[ilnocell,i2nocell]=find(A0==0); %indici di dove non ci sono cellule
empty_pos_rand = randperm(length(ilnocell));
for n=1:n_infezioni

    % =====
    % =====
    for v=1:n_FT
        %% VIRUS
        % Per stabilire la traiettoria dei virus
        ind=clock;
        randn('state',ind(6))
        rand('twister',ind(6))

        % Preallocazione (da fare per ogni FT)
        xpos=NaN(Virus_tot_v(n,v),nt1); %posizione dei virus nel medium
agli intervalli di tempo salvati (quelli grandi)
        ypos=NaN(Virus_tot_v(n,v),nt1);
        zpos=NaN(Virus_tot_v(n,v),nt1);

        % Condizioni iniziali per simulare ogni macro intervallo
        xposin = xpos(:,1); %posizione dei virus al primo intervallo

```



```

yposin = ypos(:,1);
zposin = zpos(:,1);

    %numero_virus_attaccati = zeros(1,nt1xn_infezioni); %numero di
virus attaccati
    %in funzione del tempo, quindi nei macrointervalli (cioè quelli
salvati)
    stuck = NaN(Virus_tot_v(n,v),2); % coordinate x z dei virus
attaccati (y=0); per ogni virus
    t_stuck = NaN(Virus_tot_v(n,v),1); % istante di attacco di ciascun
virus

    %-----
    %% Simulazione di infuse per 2 minuti
    nt1_flow=round(tf_flow/delta_t_big);
    for q1 = 1:nt1_flow %q1 è il contatore degli istanti di
tempo più grandi ovvero quelli in cui salvo
        if k <= Virus_tot_v(n,v)
            [xposin,yposin,zposin,stuck,t_stuck,k,B0{n,v},indice] =
Simulator_uFluo1(xposin,yposin,zposin,...
q1,v_max,delta_t,st_dev,L,W,H,k_micro,d_cell,stuck,t_stuck,k,D_vf,n_x,n_z,A
0,t0,B0{n,v},Q_Deltat_v(n,v),...
            indice,Virus_tot_v(n,v),nt2,v_mean);

            %stabilisco la posizione dei virus nel medium
            xpos(:,q1+1)=xposin;
            ypos(:,q1+1)=yposin;
            zpos(:,q1+1)=zposin;

        else
            break
        end
    end

    %% Simulazione di 90 minuti di statica

    for q1 = nt1_flow+1:nt1-nt1_flow
        if k < Virus_tot_v(n,v)
            [xposin,yposin,zposin,stuck,t_stuck,k,B0{n,v}] =
Simulator_uFluo2(xposin,yposin,zposin,...
q1,delta_t,st_dev,L,W,H,k_micro,d_cell,stuck,t_stuck,k,D_vf,n_x,n_z,A0,t0,B
0{n,v},Virus_tot_v(n,v),nt2);

            xpos(:,q1+1) = xposin; %aggiorno la nuova posizione dei
virus
            ypos(:,q1+1) = yposin;
            zpos(:,q1+1) = zposin;

        else
            break
        end
    end

    %% Simulazione di 2 minuti di flow out

    for q1 = nt1-nt1_flow+1:nt1

```

```

        if k < Virus_tot_v(n,v)
            [xposin,yposin,zposin,stuck,t_stuck,k,B0{n,v}] =
Simulator_uFluo3(xposin,yposin,zposin,...

q1,delta_t,st_dev,L,W,H,k_micro,d_cell,stuck,t_stuck,k,D_vf,n_x,n_z,A0,t0,B
0{n,v},Virus_tot_v(n,v),nt2,v_max,v_mean);

            xpos(:,q1+1) = xposin;
            ypos(:,q1+1) = yposin;
            zpos(:,q1+1) = zposin;

        else
            break
        end
    end

    %% Processi inter infezione

[A1,B1,C1,D1,Ncell_td_tot,cell_inf_FT_0,cell_inf_FT_1,B0_v]=Processi_inter_
infezione_seed(A0,B0{n,v},C0{n,v},D0{n,v},...

Ncell_t0,xdevst_virus,xdevst_RNA,xdevst_P,K,td,ti_i(n),DeltaT,K_transcripti
on(v),K_deg_mRNA(v),K_translation(v),K_deg_protein(v),empty_pos_rand);
    B1_save{n,v} = B1;
    C1_save{n,v} = C1;
    D1_save{n,v} = D1;

    cell_inf_FT_0_save(n,v) = cell_inf_FT_0;
    cell_inf_FT_1_save(n,v) = cell_inf_FT_1;

    k = 0;
    indice=0;
    B0_save{n,v}=B0_v;
end
% =====
% =====

if n < n_infezioni
    A0_save(:, :, n)=A0;
    A1_save(:, :, n)=A1;
    for w=1:n_FT
        B0{n+1,w}=B1_save{n,w};
        C0{n+1,w}=C1_save{n,w};
        D0{n+1,w}=D1_save{n,w};
    end
    N0_save(n) = Ncell_t0;
    N1_save(n) = Ncell_td_tot;
    Ncell_t0 = Ncell_td_tot;
    A0 = A1;
    [ilnocell,i2nocell]=find(A0==0); %indici di dove non ci sono
cellule
    empty_pos_rand = randperm(length(ilnocell));
else
    break
end
end
A0_save(:, :, n_infezioni) = A1_save(:, :, n_infezioni-1);
A1_save(:, :, n_infezioni) = A1;

```

```

N0_save(end) = Ncell_t0;
N1_save(end) = Ncell_td_tot;

% c0_save = N0_save/Area_cell*1e6; % # cell/mm2
% c1_save = N1_save/Area_cell*1e6;
%=====
%Permutazione degli elementi delle matrici
B0_perm=cell(n_infezioni,n_FT);
for n=1:n_infezioni
    for v=1:n_FT
        [ivirus,jvirus] = find(B0_save{n,v} > -1);
        ind=randperm(length(ivirus));
        for k=1:length(ivirus)

B0_perm{n,v}(ivirus(k),jvirus(k))=B0_save{n,v}(ivirus(ind(k)),jvirus(ind(k)
));
            end
        end
    end

for n=1:n_infezioni
    for v=1:n_FT
        [inocell,jnocell]=find(B0_save{n,v}==-1);
        for k=1:length(inocell)
            B0_perm{n,v}(inocell(k),jnocell(k))=-1;
        end
    end
end

%-----
B1_perm=cell(n_infezioni,n_FT);
for n=1:n_infezioni
    for v=1:n_FT
        [ivirus,jvirus] = find(B1_save{n,v} > -1);
        ind=randperm(length(ivirus));
        for k=1:length(ivirus)

B1_perm{n,v}(ivirus(k),jvirus(k))=B1_save{n,v}(ivirus(ind(k)),jvirus(ind(k)
));
            end
        end
    end

for n=1:n_infezioni
    for v=1:n_FT
        [inocell,jnocell]=find(B1_save{n,v}==-1);
        for k=1:length(inocell)
            B1_perm{n,v}(inocell(k),jnocell(k))=-1;
        end
    end
end

C1_perm=cell(n_infezioni,n_FT);
for n=1:n_infezioni
    for v=1:n_FT
        [ivirus,jvirus] = find(C1_save{n,v} > -1);
        ind=randperm(length(ivirus));
        for k=1:length(ivirus)

```

```

C1_perm{n,v}(ivirus(k),jvirus(k))=C1_save{n,v}(ivirus(ind(k)),jvirus(ind(k)
));
    end
end
end

for n=1:n_infezioni
    for v=1:n_FT
        [inocell,jnocell]=find(C1_save{n,v}==-1);
        for k=1:length(inocell)
            C1_perm{n,v}(inocell(k),jnocell(k))=-1;
        end
    end
end

D1_perm=cell(n_infezioni,n_FT);
for n=1:n_infezioni
    for v=1:n_FT
        [ivirus,jvirus] = find(D1_save{n,v} > -1);
        ind=randperm(length(ivirus));
        for k=1:length(ivirus)

D1_perm{n,v}(ivirus(k),jvirus(k))=D1_save{n,v}(ivirus(ind(k)),jvirus(ind(k)
));
    end
end
end

for n=1:n_infezioni
    for v=1:n_FT
        [inocell,jnocell]=find(D1_save{n,v}==-1);
        for k=1:length(inocell)
            D1_perm{n,v}(inocell(k),jnocell(k))=-1;
        end
    end
end
end
%% =====

% C1
C1_fase4=cell(1,n_infezioni);
for inf=1:n_infezioni
    C1_fase4{1,inf}=zeros(n_FT,N1_save(inf));
    [icell,jcell]=find(A1_save(:, :, inf)==1);
    for v=1:n_FT
        for n=1:N1_save(inf)
            n_virus=C1_perm{inf,v}(icell(n),jcell(n));
            C1_fase4{1,inf}(v,n)=C1_fase4{1,inf}(v,n)+n_virus;
        end
    end
end

% D1
D1_fase4=cell(1,n_infezioni);
for inf=1:n_infezioni
    D1_fase4{1,inf}=zeros(n_FT,N1_save(inf));
    [icell,jcell]=find(A1_save(:, :, inf)==1);
    for v=1:n_FT
        for n=1:N1_save(inf)

```

```

        n_virus=D1_perm{inf,v}(icell(n),jcell(n));
        D1_fase4{1,inf}(v,n)=D1_fase4{1,inf}(v,n)+n_virus;
    end
end
end
%% -----
% TRASLOCAZIONE DEI 4 FT AI GENI TARGET CON INTERAZIONE TRA OCT4 E SOX2

Protein = D1_fase4{1,n_infezioni}; %all'ultima infezione

Matrix_OSKM = Matrix_Orkin;

No_gene = size(Matrix_OSKM,1);
NoPromoterxOSKM = sum(Matrix_OSKM,1); % numero di promotori che vengono
attaccati da quel FT
NoTFxgene = sum(Matrix_OSKM,2); % numero di FT che si attaccano a quel
promotore
%-----
Ncell = size(Protein,2);

gene = zeros(No_gene,n_FT,Ncell);
for c=1:Ncell
    gene(:, :,c) = Matrix_OSKM;
end

threshold = [0.4 0.4/3]; % varia in funzione dell'interazione tra Oct4 e
Sox2
PromoterxFT=cell(1,n_FT);
for n=1:n_FT
    PromoterxFT{1,n}=find(Matrix_OSKM(:,n));
end
FT_dissolved=zeros(size(Protein));

for c = 1:Ncell
    for n = 1:n_FT
        FT_Protein=round(Protein(n,c));
        No_place=length(PromoterxFT{1,n});
        if FT_Protein ~= 0
            if n ~=2
                m=1;
                if FT_Protein <= No_place
                    FT_Pos=randperm(No_place);
                    for i=1:FT_Protein
                        x=rand;
                        if x > threshold(m)
                            gene(PromoterxFT{1,n}(FT_Pos(i)),n,c) =
gene(PromoterxFT{1,n}(FT_Pos(i)),n,c)+1;
                        end
                    end
                else
                    NoFT_dissolved = FT_Protein-No_place;
                    FT_dissolved(n,c) = NoFT_dissolved;
                    FT_Protein_to_place = No_place;
                    FT_Pos=randperm(No_place);
                    for i=1:FT_Protein_to_place
                        x=rand;
                        if x > threshold(m)
                            gene(PromoterxFT{1,n}(FT_Pos(i)),n,c) =
gene(PromoterxFT{1,n}(FT_Pos(i)),n,c)+1;

```

```

        end
    end
end
else
    if FT_Protein <=No_place
        FT_Pos=randperm(No_place);
        for i=1:FT_Protein
            if gene(PromoterxFT{1,n}(FT_Pos(i)),1,c)==2
                m=2;
            else
                m=1;
            end
            x=rand;
            if x > treshold(m)
                gene(PromoterxFT{1,n}(FT_Pos(i)),n,c) =
gene(PromoterxFT{1,n}(FT_Pos(i)),n,c)+1;
            end
        end

    else
        NoFT_dissolved = FT_Protein-No_place;
        FT_dissolved(n,c) = NoFT_dissolved;
        FT_Protein_to_place = No_place;
        FT_Pos=randperm(No_place);
        for i=1:FT_Protein_to_place
            if gene(PromoterxFT{1,n}(FT_Pos(i)),1,c)==2
                m=2;
            else
                m=1;
            end
            x=rand;
            if x > treshold(m)
                gene(PromoterxFT{1,n}(FT_Pos(i)),n,c) =
gene(PromoterxFT{1,n}(FT_Pos(i)),n,c)+1;
            end
        end
    end
end
end
end

gene_target = zeros(No_gene,n_FT,Ncell);
for c = 1:Ncell
    [itarget,jtarget]=find(gene(:, :,c)==2);
    for j = 1:length(itarget)
        gene_target(itarget(j),jtarget(j),c)=1;
    end
end

NoPromoterxOSKM_post = sum(gene_target,1);

NoTFxgene_post = sum(gene_target,2);

save(['ws_FASE4_coupling'])

```

A.2 Post processing

```
%% Post processing
% Nomenclatura      /-\_/_/-\_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_...
%                   t0      tI0      tII1      tIIO      tIII1
t01_ii=1.5; % tempo di infezione, si mantiene costante
t11_ii=t01_ii+ti_i(1);
t02_ii=t11_ii+t01_ii;
t12_ii=t02_ii+ti_i(2);

figure(1)
tempo=[t0;ti_i(1);sum(ti_i)];
cellule=[N0_save(1);N1_save(1);N1_save(2)];
bar(tempo,cellule)
xlabel('Tempo di duplicazione totale [h'],'FontSize',12)
ylabel('Numero di cellule/canale','FontSize',12)
%title('Numero di cellule alla prima infezione')
%-----
figure(2)

Oct_cell_Mean=zeros(1,n_infezioni);
Oct_cell_Std=zeros(1,n_infezioni);
Sox_cell_Mean=zeros(1,n_infezioni);
Sox_cell_Std=zeros(1,n_infezioni);
Klf_cell_Mean=zeros(1,n_infezioni);
Klf_cell_Std=zeros(1,n_infezioni);
Myc_cell_Mean=zeros(1,n_infezioni);
Myc_cell_Std=zeros(1,n_infezioni);

for n=1:n_infezioni
    Oct_cell_Mean(n)=mean(D1_fase4{1,n}(1,:));
    Oct_cell_Std(n)=std(D1_fase4{1,n}(1,:));
    Sox_cell_Mean(n)=mean(D1_fase4{1,n}(2,:));
    Sox_cell_Std(n)=std(D1_fase4{1,n}(2,:));
    Klf_cell_Mean(n)=mean(D1_fase4{1,n}(3,:));
    Klf_cell_Std(n)=std(D1_fase4{1,n}(3,:));
    Myc_cell_Mean(n)=mean(D1_fase4{1,n}(4,:));
    Myc_cell_Std(n)=std(D1_fase4{1,n}(4,:));
end

Oct_cell_t1=(D1_fase4{1,1}(1,:));
Oct_cell_t2=(D1_fase4{1,2}(1,:));
Oct_cell_Mean_t1=mean(Oct_cell_t1);
Oct_cell_Mean_t2=mean(Oct_cell_t2);
Sox_cell_t1=(D1_fase4{1,1}(2,:));
Sox_cell_t2=(D1_fase4{1,2}(2,:));
Sox_cell_Mean_t1=mean(Sox_cell_t1);
Sox_cell_Mean_t2=mean(Sox_cell_t2);
Klf_cell_t1=(D1_fase4{1,1}(3,:));
Klf_cell_t2=(D1_fase4{1,2}(3,:));
Klf_cell_Mean_t1=mean(Klf_cell_t1);
Klf_cell_Mean_t2=mean(Klf_cell_t2);
Myc_cell_t1=(D1_fase4{1,1}(4,:));
Myc_cell_t2=(D1_fase4{1,2}(4,:));
Myc_cell_Mean_t1=mean(Myc_cell_t1);
Myc_cell_Mean_t2=mean(Myc_cell_t2);

plot(0.9*ones(1,length(Oct_cell_t1)),Oct_cell_t1,'b.')
```

```

hold on
plot(1.1*ones(1,length(Oct_cell_t2)),Oct_cell_t2,'r.')
hold on
plot(0.9,Oct_cell_Mean_t1,'MarkerSize',20,'Marker','*','LineStyle','none','
Color',[0 0 1])
hold on
plot(1.1,Oct_cell_Mean_t2,'MarkerSize',20,'Marker','*','LineStyle','none','
Color',[1 0 0])

plot(1.9*ones(1,length(Sox_cell_t1)),Sox_cell_t1,'b.')
hold on
plot(2.1*ones(1,length(Sox_cell_t2)),Sox_cell_t2,'r.')
hold on
plot(1.9,Sox_cell_Mean_t1,'MarkerSize',20,'Marker','*','LineStyle','none','
Color',[0 0 1])
hold on
plot(2.1,Sox_cell_Mean_t2,'MarkerSize',20,'Marker','*','LineStyle','none','
Color',[1 0 0])

plot(2.9*ones(1,length(Klf_cell_t1)),Oct_cell_t1,'b.')
hold on
plot(3.1*ones(1,length(Klf_cell_t2)),Oct_cell_t2,'r.')
hold on
plot(2.9,Klf_cell_Mean_t1,'MarkerSize',20,'Marker','*','LineStyle','none','
Color',[0 0 1])
hold on
plot(3.1,Klf_cell_Mean_t2,'MarkerSize',20,'Marker','*','LineStyle','none','
Color',[1 0 0])

plot(3.9*ones(1,length(Myc_cell_t1)),Myc_cell_t1,'b.')
hold on
plot(4.1*ones(1,length(Myc_cell_t2)),Myc_cell_t2,'r.')
hold on
plot(3.9,Myc_cell_Mean_t1,'MarkerSize',20,'Marker','*','LineStyle','none','
Color',[0 0 1])
hold on
plot(4.1,Myc_cell_Mean_t2,'MarkerSize',20,'Marker','*','LineStyle','none','
Color',[1 0 0])

ylabel('# Proteine','FontSize',12)
set(gca,'XTick',[1 2 3
4],'XTickLabel',{'Oct4','Sox2','Klf4','cMyc'],'FontSize',12)
legend('t^I_1','t^I^I_1')
%-----
figure(3)
subplot 221
B0_Oct4=B0_save{1,1};
n_virus_max_B=max(max(B0_Oct4));
Ncell_n_virus_B=zeros(n_virus_max_B,1);
for q=1:n_virus_max_B
    Ncell_n_virus_B(q)=length(find(B0_Oct4==q))/N0_save(1)*100;
end
B1_Oct4t1=B1_save{1,1};
n_virus_max_B1t1=max(max(B1_Oct4t1));
Ncell_n_virus_B1t1=zeros(n_virus_max_B1t1,1);
for q=1:n_virus_max_B1t1
    Ncell_n_virus_B1t1(q)=length(find(B1_Oct4t1==q))/N1_save(1)*100;
end
B1_Oct4t2=B1_save{2,1};

```



```

n_virus_max_Blt2=max(max(B1_Oct4t2));
Ncell_n_virus_Blt2=zeros(n_virus_max_Blt2,1);
for q=1:n_virus_max_Blt2
    Ncell_n_virus_Blt2(q)=length(find(B1_Oct4t2==q))/N1_save(2)*100;
end

D=zeros(n_virus_max_Blt2,3);
D(1:length(Ncell_n_virus_B),1)=Ncell_n_virus_B;
D(1:length(Ncell_n_virus_Blt1),2)=Ncell_n_virus_Blt1;
D(1:length(Ncell_n_virus_Blt2),3)=Ncell_n_virus_Blt2;
bar(D)
legend('t01_i_i','t11_i_i','t12_i_i')
xlabel('Numero di virus per cellula')
ylabel('Percentuale di cellule con n virus [%]')
ylim([0 100])
title('Oct4')

subplot 222
B0_Sox2=B0_save{1,2};
n_virus_max_B=max(max(B0_Sox2));
Ncell_n_virus_B=zeros(n_virus_max_B,1);
for q=1:n_virus_max_B
    Ncell_n_virus_B(q)=length(find(B0_Sox2==q))/N0_save(1)*100;
end
B1_Sox2t1=B1_save{1,2};
n_virus_max_Blt1=max(max(B1_Sox2t1));
Ncell_n_virus_Blt1=zeros(n_virus_max_Blt1,1);
for q=1:n_virus_max_Blt1
    Ncell_n_virus_Blt1(q)=length(find(B1_Sox2t1==q))/N1_save(1)*100;
end
B1_Sox2t2=B1_save{2,2};
n_virus_max_Blt2=max(max(B1_Sox2t2));
Ncell_n_virus_Blt2=zeros(n_virus_max_Blt2,1);
for q=1:n_virus_max_Blt2
    Ncell_n_virus_Blt2(q)=length(find(B1_Sox2t2==q))/N1_save(2)*100;
end

D=zeros(n_virus_max_Blt2,3);
D(1:length(Ncell_n_virus_B),1)=Ncell_n_virus_B;
D(1:length(Ncell_n_virus_Blt1),2)=Ncell_n_virus_Blt1;
D(1:length(Ncell_n_virus_Blt2),3)=Ncell_n_virus_Blt2;
bar(D)
legend('t01_i_i','t11_i_i','t12_i_i')
xlabel('Numero di virus per cellula')
ylabel('Percentuale di cellule con n virus [%]')
ylim([0 100])
title('Sox2')

subplot 223
B0_Klf4=B0_save{1,3};
n_virus_max_B=max(max(B0_Klf4));
Ncell_n_virus_B=zeros(n_virus_max_B,1);
for q=1:n_virus_max_B
    Ncell_n_virus_B(q)=length(find(B0_Klf4==q))/N0_save(1)*100;
end
B1_Klf4t1=B1_save{1,3};
n_virus_max_Blt1=max(max(B1_Klf4t1));
Ncell_n_virus_Blt1=zeros(n_virus_max_Blt1,1);
for q=1:n_virus_max_Blt1

```

```

        Ncell_n_virus_Blt1(q)=length(find(B1_Klf4t1==q))/N1_save(1)*100;
    end
    B1_Klf4t2=B1_save{2,3};
    n_virus_max_Blt2=max(max(B1_Klf4t2));
    Ncell_n_virus_Blt2=zeros(n_virus_max_Blt2,1);
    for q=1:n_virus_max_Blt2
        Ncell_n_virus_Blt2(q)=length(find(B1_Klf4t2==q))/N1_save(2)*100;
    end

    D=zeros(n_virus_max_Blt2,3);
    D(1:length(Ncell_n_virus_B),1)=Ncell_n_virus_B;
    D(1:length(Ncell_n_virus_Blt1),2)=Ncell_n_virus_Blt1;
    D(1:length(Ncell_n_virus_Blt2),3)=Ncell_n_virus_Blt2;
    bar(D)
    legend('t01_ii','t11_ii','t12_ii')
    xlabel('Numero di virus per cellula')
    ylabel('Percentuale di cellule con n virus [%]')
    ylim([0 100])
    title('Klf4')

    subplot 224
    B0_cMyc=B0_save{1,4};
    n_virus_max_B=max(max(B0_cMyc));
    Ncell_n_virus_B=zeros(n_virus_max_B,1);
    for q=1:n_virus_max_B
        Ncell_n_virus_B(q)=length(find(B0_cMyc==q))/N0_save(1)*100;
    end
    B1_cMyct1=B1_save{1,4};
    n_virus_max_Blt1=max(max(B1_cMyct1));
    Ncell_n_virus_Blt1=zeros(n_virus_max_Blt1,1);
    for q=1:n_virus_max_Blt1
        Ncell_n_virus_Blt1(q)=length(find(B1_cMyct1==q))/N1_save(1)*100;
    end
    B1_cMyct2=B1_save{2,4};
    n_virus_max_Blt2=max(max(B1_cMyct2));
    Ncell_n_virus_Blt2=zeros(n_virus_max_Blt2,1);
    for q=1:n_virus_max_Blt2
        Ncell_n_virus_Blt2(q)=length(find(B1_cMyct2==q))/N1_save(2)*100;
    end

    D=zeros(n_virus_max_Blt2,3);
    D(1:length(Ncell_n_virus_B),1)=Ncell_n_virus_B;
    D(1:length(Ncell_n_virus_Blt1),2)=Ncell_n_virus_Blt1;
    D(1:length(Ncell_n_virus_Blt2),3)=Ncell_n_virus_Blt2;
    bar(D)
    legend('t01_ii','t11_ii','t12_ii')
    xlabel('Numero di virus per cellula')
    ylabel('Percentuale di cellule con n virus [%]')
    ylim([0 100])
    title('c-Myc')
    %-----
    % Grafico cellule+
    figure(4)
    tempol=[t01_ii t11_ii t02_ii t12_ii];

    subplot 221
    cell_pos=[cell_inf_FT_0_save(1,1) cell_inf_FT_1_save(1,1)
    cell_inf_FT_0_save(2,1) cell_inf_FT_1_save(2,1)];
    bar(cell_pos)

```

```

xlabel('tempo sperimentale')
ylabel('% Cellule +')
title('Oct4')
ylim([0 100])
set(gca, 'XTick', 1:length(cell_pos), 'XTickLabel', {'t01_ii', 't11_ii', 't02_ii'
, 't12_ii'})

subplot 222
cell_pos=[cell_inf_FT_0_save(1,2) cell_inf_FT_1_save(1,2)
cell_inf_FT_0_save(2,2) cell_inf_FT_1_save(2,2)];
bar(cell_pos)
xlabel('tempo sperimentale')
ylabel('% Cellule +')
title('Sox2')
ylim([0 100])
set(gca, 'XTick', 1:length(cell_pos), 'XTickLabel', {'t01_ii', 't11_ii', 't02_ii'
, 't12_ii'})

subplot 223
cell_pos=[cell_inf_FT_0_save(1,3) cell_inf_FT_1_save(1,3)
cell_inf_FT_0_save(2,3) cell_inf_FT_1_save(2,3)];
bar(cell_pos)
xlabel('tempo sperimentale')
ylabel('% Cellule +')
title('Klf4')
ylim([0 100])
set(gca, 'XTick', 1:length(cell_pos), 'XTickLabel', {'t01_ii', 't11_ii', 't02_ii'
, 't12_ii'})

subplot 224
cell_pos=[cell_inf_FT_0_save(1,4) cell_inf_FT_1_save(1,4)
cell_inf_FT_0_save(2,4) cell_inf_FT_1_save(2,4)];
bar(cell_pos)
xlabel('tempo sperimentale')
ylabel('% Cellule +')
title('c-Myc')
ylim([0 100])
set(gca, 'XTick', 1:length(cell_pos), 'XTickLabel', {'t01_ii', 't11_ii', 't02_ii'
, 't12_ii'})
%-----
figure;
white = [1 1 1];
black = [0 0 0];
c1 = [white
      black];
colormap(c1)
%subplot (3,1,1,'CLim',[0 1])
%hold on
box on
imagesc(A0_save(:, :, 1))
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick', [0.25 0.75], 'YTickLabel', {'No cellula', 'Cellula'})
title('Substrato cellulare al tempo t0');
figure;
colormap(c1)

```

```

%subplot (3,1,2,'CLim',[0 1])
%hold on
box on
imagesc(A1_save(:, :, 1))
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick',[0.25 0.75], 'YTickLabel', {'No cellula', 'Cellula'})
title('Substrato cellulare al tempo t^I_1');
figure;
colormap(c1)
%subplot (3,1,3,'CLim',[0 1])
%hold on
box on
imagesc(A1_save(:, :, 2))
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick',[0.25 0.75], 'YTickLabel', {'No cellula', 'Cellula'})
title('Substrato cellulare al tempo t^I_1');
%-----
nB_max = max([max(max(B0_perm{1,1})) max(max(B1_perm{1,1}))
max(max(B1_perm{2,1}))]);
figure1=figure(6);
%n_colorB0 = max(max(B0_perm{1,1}));

white=[1 1 1];
black = [0 0 0];
color_intB0 = [zeros(nB_max,1), linspace(0.2,1,nB_max)', zeros(nB_max,1)];
c1 = [white
      black
      color_intB0];
colormap(c1)
axes('Parent', figure1, 'CLim', [-1.5 nB_max+0.5]);
%subplot(3,1,1,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
hold on
imagesc(B0_perm{1,1})
box on
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick', [-1,0,1:nB_max], 'YTickLabel', {'No cell', 0,1:nB_max})
% xlabel('x, \mum');
% ylabel('z, \mum');
title('tempo t^I_0; Oct4')

%n_colorB1_t1 = max(max(B1_perm{1,1}));

figure2=figure(7);
black = [0 0 0];
color_intB1_t1 = [zeros(nB_max,1), linspace(0.2,1,nB_max)', zeros(nB_max,1)];
c2 = [white
      black

```

```

        color_intB1_t1];
colormap(c2)
axes('Parent',figure2,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
%subplot(3,1,2,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
hold on
imagesc(B1_perm{1,1})
box on
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick',[-1,0,1:nB_max],'YTickLabel',{'No cell',0,[1:nB_max]})
% xlabel('x, \mum');
% ylabel('z, \mum');
title('tempo t^I_1; Oct4')

figure3=figure(8);
%n_colorB1_t2 = max(max(B1_perm{2,1}));

black = [0 0 0];
color_intB1_t2 = [zeros(nB_max,1),linspace(0.2,1,nB_max)',zeros(nB_max,1)];
c3 = [white
      black
      color_intB1_t2];
colormap(c3)
axes('Parent',figure3,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
%subplot(3,1,3,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
hold on
imagesc(B1_perm{2,1})
box on
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick',[-1,0,1:nB_max],'YTickLabel',{'No cell',0,[1:nB_max]})
% xlabel('x, \mum');
% ylabel('z, \mum');
title('tempo t^I^I_1; Oct4')
%-----
figure4=figure(9);
%n_colorB0 = max(max(B0_perm{1,2}));

black = [0 0 0];
color_intB0 = [zeros(nB_max,1),linspace(0.2,1,nB_max)',zeros(nB_max,1)];
c1 = [white
      black
      color_intB0];
colormap(c1)
axes('Parent',figure4,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
%subplot(3,1,1,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
hold on
imagesc(B0_perm{1,2})
box on
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])

```

```

ylim([0.5 z])
colorbar('YTick',[-1,0,1:nB_max],'YTickLabel',{'No cell',0,1:nB_max})
% xlabel('x, \mum');
% ylabel('z, \mum');
title('tempo t^I_0; Sox2')

%n_colorB1_t1 = max(max(B1_perm{1,2}));
figure5=figure(10);

black = [0 0 0];
color_intB1_t1 = [zeros(nB_max,1),linspace(0.2,1,nB_max)',zeros(nB_max,1)];
c2 = [white
      black
      color_intB1_t1];
colormap(c2)
axes('Parent',figure5,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
%subplot(3,1,2,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
hold on
imagesc(B1_perm{1,2})
box on
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick',[-1,0,1:nB_max],'YTickLabel',{'No cell',0,[1:nB_max]})
% xlabel('x, \mum');
% ylabel('z, \mum');
title('tempo t^I_1; Sox2')

figure6=figure(11);
%n_colorB1_t2 = max(max(B1_perm{2,2}));

black = [0 0 0];
color_intB1_t2 = [zeros(nB_max,1),linspace(0.2,1,nB_max)',zeros(nB_max,1)];
c3 = [white
      black
      color_intB1_t2];
colormap(c3)
axes('Parent',figure6,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
%subplot(3,1,3,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
hold on
imagesc(B1_perm{2,2})
box on
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick',[-1,0,1:nB_max],'YTickLabel',{'No cell',0,[1:nB_max]})
% xlabel('x, \mum');
% ylabel('z, \mum');
title('tempo t^I^I_1; Sox2')
%-----
figure7=figure(12);
%n_colorB0 = max(max(B0_perm{1,3}));

black = [0 0 0];
color_intB0 = [zeros(nB_max,1),linspace(0.2,1,nB_max)',zeros(nB_max,1)];

```

```

c1 = [white
      black
      color_intB0];
colormap(c1)
axes('Parent',figure7,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
%subplot(3,1,1,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
hold on
imagesc(B0_perm{1,3})
box on
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick',[-1,0,1:nB_max],'YTickLabel',{'No cell',0,1:nB_max})
% xlabel('x, \mum');
% ylabel('z, \mum');
title('tempo t^I_0; Klf4')

figure8=figure(13);
%n_colorB1_t1 = max(max(B1_perm{1,3}));

black = [0 0 0];
color_intB1_t1 = [zeros(nB_max,1),linspace(0.2,1,nB_max)',zeros(nB_max,1)];
c2 = [white
      black
      color_intB1_t1];
colormap(c2)
axes('Parent',figure8,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
%subplot(3,1,2,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
hold on
imagesc(B1_perm{1,3})
box on
axis equal
x=n_x+0.5;
z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick',[-1,0,1:nB_max],'YTickLabel',{'No cell',0,[1:nB_max]})
% xlabel('x, \mum');
% ylabel('z, \mum');
title('tempo t^I_1; Klf4')

figure9=figure(14);
%n_colorB1_t2 = max(max(B1_perm{2,3}));

black = [0 0 0];
color_intB1_t2 = [zeros(nB_max,1),linspace(0.2,1,nB_max)',zeros(nB_max,1)];
c3 = [white
      black
      color_intB1_t2];
colormap(c3)
axes('Parent',figure9,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
%subplot(3,1,3,'CLim',[-1.5 nB_max+0.5])
hold on
imagesc(B1_perm{2,3})
box on
axis equal
x=n_x+0.5;

```

```

z=n_z+0.5;
xlim([0.5 x])
ylim([0.5 z])
colorbar('YTick',[-1,0,1:nB_max],'YTickLabel',{ 'No cell',0,[1:nB_max]})
% xlabel('x, \mum');
% ylabel('z, \mum');
title('tempo t^I^I_1; Klf4')
%-----
figure(15)
C1_Oct=C1_fase4{1,n_infezioni}(1,:);
C1_Sox=C1_fase4{1,n_infezioni}(2,:);
C1_Klf=C1_fase4{1,n_infezioni}(3,:);
C1_Myc=C1_fase4{1,n_infezioni}(4,:);
x=1:N1_save(end);
lim=max(C1_Oct+25);

subplot 221
plot(x,C1_Oct,'MarkerSize',4,'Marker','x','LineStyle','none','Color',[0 0
0])
xlabel('Cellula','FontSize',12)
ylabel('# di molecole mRNA','FontSize',12)
ylim([0 lim])
%title('Oct4, istante t^I^I_1')

subplot 222
plot(x,C1_Sox,'MarkerSize',4,'Marker','x','LineStyle','none','Color',[0 0
0])
xlabel('Cellula','FontSize',12)
ylabel('# di molecole mRNA','FontSize',12)
ylim([0 lim])
%title('Sox2, istante t^I^I_1')

subplot 223
plot(x,C1_Klf,'MarkerSize',4,'Marker','x','LineStyle','none','Color',[0 0
0])
xlabel('Cellula','FontSize',12)
ylabel('# di molecole mRNA','FontSize',12)
ylim([0 lim])
%title('Klf4, istante t^I^I_1')

subplot 224
plot(x,C1_Myc,'MarkerSize',4,'Marker','x','LineStyle','none','Color',[0 0
0])
xlabel('Cellula','FontSize',12)
ylabel('# di molecole mRNA','FontSize',12)
ylim([0 lim])
%title('c-Myc, istante t^I^I_1')
%-----
figure(16)
D1_Oct=D1_fase4{1,n_infezioni}(1,:);
D1_Sox=D1_fase4{1,n_infezioni}(2,:);
D1_Klf=D1_fase4{1,n_infezioni}(3,:);
D1_Myc=D1_fase4{1,n_infezioni}(4,:);
x=1:N1_save(end);
lim=max(D1_Oct+50);

subplot 221
plot(x,D1_Oct,'MarkerSize',4,'Marker','x','LineStyle','none','Color',[0 1
0])

```



```

xlabel('Cellula','FontSize',12)
ylabel('# di molecole di proteina','FontSize',12)
ylim([0 lim])
%title('Oct4, istante t^I^I_1')

subplot 222
plot(x,Dl_Sox,'MarkerSize',4,'Marker','x','LineStyle','none','Color',[0 1
0])
xlabel('Cellula','FontSize',12)
ylabel('# di molecole di proteina','FontSize',12)
ylim([0 lim])
%title('Sox2, istante t^I^I_1')

subplot 223
plot(x,Dl_Klf,'MarkerSize',4,'Marker','x','LineStyle','none','Color',[0 1
0])
xlabel('Cellula','FontSize',12)
ylabel('# di molecole di proteina','FontSize',12)
ylim([0 lim])
%title('Klf4, istante t^I^I_1')

subplot 224
plot(x,Dl_Myc,'MarkerSize',4,'Marker','x','LineStyle','none','Color',[0 1
0])
xlabel('Cellula','FontSize',12)
ylabel('# di molecole di Proteina','FontSize',12)
ylim([0 lim])
%title('c-Myc, istante t^I^I_1')

%% -----
% Figure sulla traslocazione nel DNA
gene_perm = zeros(No_gene,n_FT,Nl_save(end));
ind=randperm(No_gene);
for c = 1:Nl_save(end)
    for n = 1:n_FT
        for k =1:No_gene
            gene_perm(k,n,c)=gene(ind(k),n,c);
        end
    end
end
end
figure(17);
white = [1 1 1];
black = [0 0 0];
green = [0 1 0];
c1 = [white
      black
      green];
colormap(c1)
imagesc(gene_perm(:,:,3905))
colorbar('YTick',[0.335 1 1.665],'YTickLabel',{'No
target','Target','Bounded to target'})
title('FT target simulated (one cell)');
ylabel('Promotori')
set(gca,'XTick',[1 2 3 4],'XTickLabel',{'Oct4','Sox2','Klf4','cMyc'})

%% Grafico frequenza vs # di proteine
figure
Dl_Oct=Dl_fase4{1,n_infezioni}(1,:);
% x=1:Nl_save(end);

```

```

% lim=max(Dl_Oct+50);

Dl_round=round(Dl_Oct);
x1=1:max(Dl_round);
%Nproteine=unique(Dl_Oct);
frequenza=zeros(1,max(Dl_round));
for i=1:max(Dl_round)
    frequenza(i)=length(find(Dl_round==i))/Ncell*100;
end

%plot(x1,frequenza,'MarkerSize',4,'Marker','x','LineStyle','none','Color',[
0 1 0])

plot(x1,frequenza,'k','LineWidth',2)
xlabel('# proteine Oct4/cellula','FontSize',12)
ylabel('% cellule','FontSize',12)
ylim([0 12])
legend('MOI 60, istante t^I^I_1')
xlim([0 15000])

%Calcolo del coefficiente di variazione
media=sum(x1.*frequenza)/sum(frequenza);
dev_st=sqrt((sum(frequenza.*((x1-media).^2)))/(sum(frequenza)));
cv_O=dev_st/media;

figure
Dl_Sox=Dl_fase4{1,n_infezioni}(2,:);
% x=1:Nl_save(end);
% lim=max(Dl_Oct+50);

Dl_round=round(Dl_Sox);
x1=1:max(Dl_round);
%Nproteine=unique(Dl_Oct);
frequenza=zeros(1,max(Dl_round));
for i=1:max(Dl_round)
    frequenza(i)=length(find(Dl_round==i))/Ncell*100;
end

%plot(x1,frequenza,'MarkerSize',4,'Marker','x','LineStyle','none','Color',[
0 1 0])

plot(x1,frequenza,'k','LineWidth',2)
xlabel('# proteine Sox2/cellula','FontSize',12)
xlim([0 15000])
ylabel('% cellule','FontSize',12)
ylim([0 9])
legend('MOI 20, istante t^I^I_1')
% Calcolo del coefficiente di variazione
media=sum(x1.*frequenza)/sum(frequenza);
dev_st=sqrt((sum(frequenza.*((x1-media).^2)))/(sum(frequenza)));
cv_S=dev_st/media;

%% BINDING
TFs_name =
{'O','S','K','M','OS','OK','OM','SK','SM','KM','SKM','OKM','OSM','OSK','OSK
M'};
NoTFxgene = sum(Matrix_OSKM,2);
TF_promoter = 1:4;

```

```

O = 173;
S = 234;
K = 770;
M = 2507;
OS = 101;
OK = 46;
OM = 148;
SK = 106;
SM = 94;
KM = 502;
SKM = 77;
OKM = 108;
OSM = 26;
OSK = 101;
OSKM = 80;
TFs_vector = [O,S,K,M,OS,OK,OM,SK,SM,KM,SKM,OKM,OSM,OSK,OSKM];
figure1 = figure;
axes('Parent',figure1,'XDir','Reverse','XTick',[1:4],'LineWidth',1,'FontSize',8)
hold on
[count,TF_promoter] = hist(NoTFxgene,TF_promoter);
bar(TF_promoter,count,'BarWidth',0.5)
plot(fliplr(TF_promoter),cumsum(fliplr(count)),'r.-')
h = findobj(gca,'Type','patch');
set(h,'FaceColor','k','EdgeColor','k')
xlabel('Numero di FT/promotori','FontSize',12)
ylabel('Numero di promotori','FontSize',12)
xlim([0.6 4.4])
box on

% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'80'},'FontSize',8,...
'FontName','Arial',...
'Color','r',...
'FitBoxToText','off',...
'LineStyle','none',...
'Position',[0.1896 0.09952 0.06864 0.07619]);

% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'392'},'FontSize',8,...
'FontName','Arial',...
'Color','r',...
'FitBoxToText','off',...
'LineStyle','none',...
'Position',[0.3892 0.1433 0.06864 0.07619]);

% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'1389'},'FontSize',8,...
'FontName','Arial',...
'Color','r',...
'FitBoxToText','off',...
'LineStyle','none',...
'Position',[0.5639 0.2705 0.06864 0.07619]);

% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'5073'},'FontSize',8,...
'FontName','Arial',...
'Color','r',...
'FitBoxToText','off',...
'LineStyle','none',...
'Position',[0.7939 0.7786 0.06864 0.07619]);

% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'312'},'FontSize',8,...

```

```

        'FontName','Arial',...
        'FitBoxToText','off',...
        'LineStyle','none',...
        'Position',[0.426 0.119 0.06864 0.07619]);
% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'997'},'FontSize',8,...
        'FontName','Arial',...
        'FitBoxToText','off',...
        'LineStyle','none',...
        'Position',[0.5935 0.2176 0.06864 0.07619]);
% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'3684'},'FontSize',8,...
        'FontName','Arial',...
        'FitBoxToText','off',...
        'LineStyle','none',...
        'Position',[0.7878 0.5805 0.06864 0.07619]);

% Figure 2
figure1 = figure;
axes('Parent',figure1,'FontSize',8,'XTick',[1:15],'XTickLabel',TFs_name)
hold on
bar(TFs_vector,'k')
xlabel('FT','FontSize',12)
ylabel('Numero di promotori','FontSize',12)
box on
% Inset
NoPromoterxOSKM = sum(Matrix_OSKM,1);
axes('Parent',figure1,'FontSize',8,'XTick',[1:4],'XTickLabel',{'O','S','K',
'M'},'Position',[0.5089 0.5286 0.3568 0.3488])
hold on
bar(NoPromoterxOSKM,'k','BarWidth',0.5)
xlabel('Numero totale di promotori/FT','FontSize',9)
ylabel('Numero di promotori','FontSize',9)
box on
% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'783'},'FontSize',8,...
        'FontName','Arial',...
        'FitBoxToText','off',...
        'LineStyle','none',...
        'Position',[0.5521 0.5686 0.06864 0.07619]);
% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'819'},'FontSize',8,...
        'FontName','Arial',...
        'FitBoxToText','off',...
        'LineStyle','none',...
        'Position',[0.6239 0.5772 0.06864 0.07619]);
% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'1790'},'FontSize',8,...
        'FontName','Arial',...
        'FitBoxToText','off',...
        'LineStyle','none',...
        'Position',[0.6885 0.6595 0.06864 0.07619]);
% Create textbox
annotation(figure1,'textbox','String',{'3542'},'FontSize',8,...
        'FontName','Arial',...
        'FitBoxToText','off',...
        'LineStyle','none',...
        'Position',[0.7603 0.8086 0.06864 0.07619]);

%% Grafico 3D

```

```

%% Grafico cluster e profilo genetico

Oct4_Binding=zeros(No_gene,N1_save(end));
Sox2_Binding=zeros(No_gene,N1_save(end));
Klf4_Binding=zeros(No_gene,N1_save(end));
cMyc_Binding=zeros(No_gene,N1_save(end));

for c=1:N1_save(end)
    Oct4_Binding(:,c)=gene(:,1,c);
    Sox2_Binding(:,c)=gene(:,2,c);
    Klf4_Binding(:,c)=gene(:,3,c);
    cMyc_Binding(:,c)=gene(:,4,c);
end

figure
% D=pdist(Oct4_Binding);
% z=linkage(D);
%clustergram(Oct4_Binding);
white = [1 1 1];
black = [0 0 0];
green = [0 1 0];
c1 = [white
      black
      green];
colormap(c1)
imagesc(Oct4_Binding)
colorbar('YTick',[0.335 1 1.665],'YTickLabel',{'No
target','Target','Bounded to target'})
title('Oct4 Binding');
ylabel('Promotori')
xlabel('Cellule')
%set(gca,'XTick',[1 2 3 4],'XTickLabel',{'Oct4','Sox2','Klf4','cMyc'})

figure
c1 = [white
      black
      green];
colormap(c1)
imagesc(Sox2_Binding)
colorbar('YTick',[0.335 1 1.665],'YTickLabel',{'No
target','Target','Bounded to target'})
title('Sox2 Binding');
ylabel('Promotori')
xlabel('Cellule')

figure
c1 = [white
      black
      green];
colormap(c1)
imagesc(Klf4_Binding)
colorbar('YTick',[0.335 1 1.665],'YTickLabel',{'No
target','Target','Bounded to target'})
title('Klf4 Binding');
ylabel('Promotori')
xlabel('Cellule')

figure
c1 = [white

```

```

        black
        green];
colormap(c1)
imagesc(cMyc_Binding)
colorbar('YTick',[0.335 1 1.665],'YTickLabel',{'No
target','Target','Bounded to target'})
title('cMyc Binding');
ylabel('Promotori')
xlabel('Cellule')

%% Grafico quantitativo Binding
% Identificazione dei geni con solo specifici tipi di promotori
Identificazione=[1 0 0 0;
0 1 0 0
0 0 1 0
0 0 0 1
1 1 0 0
1 0 1 0
1 0 0 1
0 1 1 0
0 1 0 1
0 0 1 1
0 1 1 1
1 0 1 1
1 1 0 1
1 1 1 0
1 1 1 1];

indO=zeros(O,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(1,:)
        indO(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indS=zeros(S,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(2,:)
        indS(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indK=zeros(K,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(3,:)
        indK(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indM=zeros(M,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(4,:)

```

```

        indM(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indOS=zeros(OS,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(5,:)
        indOS(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indOK=zeros(OK,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(6,:)
        indOK(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indOM=zeros(OM,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(7,:)
        indOM(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indSK=zeros(SK,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(8,:)
        indSK(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indSM=zeros(SM,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(9,:)
        indSM(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indKM=zeros(KM,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(10,:)
        indKM(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

```

```

indSKM=zeros(SKM,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(11,:)
        indSKM(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indOKM=zeros(OKM,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(12,:)
        indOKM(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indOSM=zeros(OSM,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(13,:)
        indOSM(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indOSK=zeros(OSK,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(14,:)
        indOSK(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

indOSKM=zeros(OSKM,1);
m=1;
for g=1:No_gene
    if Matrix_OSKM(g,')==Identificazione(15,:)
        indOSKM(m)=g;
        m=m+1;
    end
end

iOS = [1,2];
iOK = [1,3];
iOM = [1,4];
iSK = [2,3];
iSM = [2,4];
iKM = [3,4];
iSKM = [2,3,4];
iOKM = [1,3,4];
iOSM = [1,2,4];
iOSK = [1,2,3];
iOSKM = [1,2,3,4];

Otot=zeros(O,Ncell);
O_cell0=zeros(Ncell,1);

```



```

O_cell1=zeros(Ncell,1);

Stot=zeros(S,Ncell);
S_cell0=zeros(Ncell,1);
S_cell1=zeros(Ncell,1);

Ktot=zeros(K,Ncell);
K_cell0=zeros(Ncell,1);
K_cell1=zeros(Ncell,1);

Mtot=zeros(M,Ncell);
M_cell0=zeros(Ncell,1);
M_cell1=zeros(Ncell,1);

% Combinazioni multiple
OStot=zeros(OS,Ncell);
OS_cell0=zeros(Ncell,1);
OS_cell1=zeros(Ncell,1);
OS_cell2=zeros(Ncell,1);

OKtot=zeros(OK,Ncell);
OK_cell0=zeros(Ncell,1);
OK_cell1=zeros(Ncell,1);
OK_cell2=zeros(Ncell,1);

OMtot=zeros(OM,Ncell);
OM_cell0=zeros(Ncell,1);
OM_cell1=zeros(Ncell,1);
OM_cell2=zeros(Ncell,1);

SKtot=zeros(SK,Ncell);
SK_cell0=zeros(Ncell,1);
SK_cell1=zeros(Ncell,1);
SK_cell2=zeros(Ncell,1);

SMtot=zeros(SM,Ncell);
SM_cell0=zeros(Ncell,1);
SM_cell1=zeros(Ncell,1);
SM_cell2=zeros(Ncell,1);

KMTot=zeros(KM,Ncell);
KM_cell0=zeros(Ncell,1);
KM_cell1=zeros(Ncell,1);
KM_cell2=zeros(Ncell,1);

SKMtot=zeros(SKM,Ncell);
SKM_cell0=zeros(Ncell,1);
SKM_cell1=zeros(Ncell,1);
SKM_cell2=zeros(Ncell,1);
SKM_cell3=zeros(Ncell,1);

OKMtot=zeros(OKM,Ncell);
OKM_cell0=zeros(Ncell,1);
OKM_cell1=zeros(Ncell,1);
OKM_cell2=zeros(Ncell,1);
OKM_cell3=zeros(Ncell,1);

OSMtot=zeros(OSM,Ncell);

```

```

OSM_cell0=zeros(Ncell,1);
OSM_cell1=zeros(Ncell,1);
OSM_cell2=zeros(Ncell,1);
OSM_cell3=zeros(Ncell,1);

OSKtot=zeros(OSK,Ncell);
OSK_cell0=zeros(Ncell,1);
OSK_cell1=zeros(Ncell,1);
OSK_cell2=zeros(Ncell,1);
OSK_cell3=zeros(Ncell,1);

OSKMtot=zeros(OSKM,Ncell);
OSKM_cell0=zeros(Ncell,1);
OSKM_cell1=zeros(Ncell,1);
OSKM_cell2=zeros(Ncell,1);
OSKM_cell3=zeros(Ncell,1);
OSKM_cell4=zeros(Ncell,1);

for c=1:Ncell

    % 1 Combinazione-----
    for g=1:O
        Otot(g,c)=length(find(gene_target(indO(g),1,c)==1));
    end
    O_cell0(c)=length(find(Otot(:,c)==0));
    O_cell1(c)=length(find(Otot(:,c)==1));

    for g=1:S
        Stot(g,c)=length(find(gene_target(indS(g),2,c)==1));
    end
    S_cell0(c)=length(find(Stot(:,c)==0));
    S_cell1(c)=length(find(Stot(:,c)==1));

    for g=1:K
        Ktot(g,c)=length(find(gene_target(indK(g),3,c)==1));
    end
    K_cell0(c)=length(find(Ktot(:,c)==0));
    K_cell1(c)=length(find(Ktot(:,c)==1));

    for g=1:M
        Mtot(g,c)=length(find(gene_target(indM(g),4,c)==1));
    end
    M_cell0(c)=length(find(Mtot(:,c)==0));
    M_cell1(c)=length(find(Mtot(:,c)==1));

    % 2 Combinazioni-----
    for g=1:OS
        OStot(g,c)=length(find(gene_target(indOS(g),iOS,c)==ones(1,2)));
    end
    OS_cell0(c)=length(find(OStot(:,c)==0));
    OS_cell1(c)=length(find(OStot(:,c)==1));
    OS_cell2(c)=length(find(OStot(:,c)==2));

    for g=1:OK
        OKtot(g,c)=length(find(gene_target(indOK(g),iOK,c)==ones(1,2)));
    end
    OK_cell0(c)=length(find(OKtot(:,c)==0));
    OK_cell1(c)=length(find(OKtot(:,c)==1));

```

```

OK_cell2(c)=length(find(OKtot(:,c)==2));

for g=1:OM
    OMTot(g,c)=length(find(gene_target(indOM(g),iOM,c)==ones(1,2)));
end
OM_cell0(c)=length(find(OMtot(:,c)==0));
OM_cell1(c)=length(find(OMtot(:,c)==1));
OM_cell2(c)=length(find(OMtot(:,c)==2));

for g=1:SK
    SKtot(g,c)=length(find(gene_target(indSK(g),iSK,c)==ones(1,2)));
end
SK_cell0(c)=length(find(SKtot(:,c)==0));
SK_cell1(c)=length(find(SKtot(:,c)==1));
SK_cell2(c)=length(find(SKtot(:,c)==2));

for g=1:SM
    SMTot(g,c)=length(find(gene_target(indSM(g),iSM,c)==ones(1,2)));
end
SM_cell0(c)=length(find(SMTot(:,c)==0));
SM_cell1(c)=length(find(SMTot(:,c)==1));
SM_cell2(c)=length(find(SMTot(:,c)==2));

for g=1:KM
    KMTot(g,c)=length(find(gene_target(indKM(g),iKM,c)==ones(1,2)));
end
KM_cell0(c)=length(find(KMTot(:,c)==0));
KM_cell1(c)=length(find(KMTot(:,c)==1));
KM_cell2(c)=length(find(KMTot(:,c)==2));

% 3 Combinazioni-----
for g=1:SKM
    SKMTot(g,c)=length(find(gene_target(indSKM(g),iSKM,c)==ones(1,3)));
end
SKM_cell0(c)=length(find(SKMTot(:,c)==0));
SKM_cell1(c)=length(find(SKMTot(:,c)==1));
SKM_cell2(c)=length(find(SKMTot(:,c)==2));
SKM_cell3(c)=length(find(SKMTot(:,c)==3));

for g=1:OKM
    OKMTot(g,c)=length(find(gene_target(indOKM(g),iOKM,c)==ones(1,3)));
end
OKM_cell0(c)=length(find(OKMTot(:,c)==0));
OKM_cell1(c)=length(find(OKMTot(:,c)==1));
OKM_cell2(c)=length(find(OKMTot(:,c)==2));
OKM_cell3(c)=length(find(OKMTot(:,c)==3));

for g=1:OSM
    OSMtot(g,c)=length(find(gene_target(indOSM(g),iOSM,c)==ones(1,3)));
end
OSM_cell0(c)=length(find(OSMtot(:,c)==0));
OSM_cell1(c)=length(find(OSMtot(:,c)==1));
OSM_cell2(c)=length(find(OSMtot(:,c)==2));
OSM_cell3(c)=length(find(OSMtot(:,c)==3));

for g=1:OSK
    OSKtot(g,c)=length(find(gene_target(indOSK(g),iOSK,c)==ones(1,3)));
end

```

```

OSK_cell10(c)=length(find(OSKtot(:,c)==0));
OSK_cell11(c)=length(find(OSKtot(:,c)==1));
OSK_cell12(c)=length(find(OSKtot(:,c)==2));
OSK_cell13(c)=length(find(OSKtot(:,c)==3));

% 4 Combinazioni-----
for g=1:OSKM

OSKMtot(g,c)=length(find(gene_target(indOSKM(g),iOSKM,c)==ones(1,4)));
end
OSKM_cell10(c)=length(find(OSKMtot(:,c)==0));
OSKM_cell11(c)=length(find(OSKMtot(:,c)==1));
OSKM_cell12(c)=length(find(OSKMtot(:,c)==2));
OSKM_cell13(c)=length(find(OSKMtot(:,c)==3));
OSKM_cell14(c)=length(find(OSKMtot(:,c)==4));

end

Omean=mean(O_cell11);
O0=mean(O_cell10)/O*100;
O1=mean(O_cell11)/O*100;
O2=0;
O3=0;
O4=0;

Smean=mean(S_cell11);
S0=mean(S_cell10)/S*100;
S1=mean(S_cell11)/S*100;
S2=0;
S3=0;
S4=0;

Kmean=mean(K_cell11);
K0=mean(K_cell10)/K*100;
K1=mean(K_cell11)/K*100;
K2=0;
K3=0;
K4=0;

Mmean=mean(M_cell11);
M0=mean(M_cell10)/M*100;
M1=mean(M_cell11)/M*100;
M2=0;
M3=0;
M4=0;

OSmean=mean(OS_cell12);
OS0=mean(OS_cell10)/OS*100;
OS1=mean(OS_cell11)/OS*100;
OS2=mean(OS_cell12)/OS*100;
OS3=0;
OS4=0;

OKmean=mean(OK_cell12);
OK0=mean(OK_cell10)/OK*100;
OK1=mean(OK_cell11)/OK*100;
OK2=mean(OK_cell12)/OK*100;
OK3=0;

```

```

OK4=0;

OMmean=mean(OM_cell12);
OM0=mean(OM_cell10)/OM*100;
OM1=mean(OM_cell11)/OM*100;
OM2=mean(OM_cell12)/OM*100;
OM3=0;
OM4=0;

SKmean=mean(SK_cell12);
SK0=mean(SK_cell10)/SK*100;
SK1=mean(SK_cell11)/SK*100;
SK2=mean(SK_cell12)/SK*100;
SK3=0;
SK4=0;

SMmean=mean(SM_cell12);
SM0=mean(SM_cell10)/SM*100;
SM1=mean(SM_cell11)/SM*100;
SM2=mean(SM_cell12)/SM*100;
SM3=0;
SM4=0;

KMmean=mean(KM_cell12);
KM0=mean(KM_cell10)/KM*100;
KM1=mean(KM_cell11)/KM*100;
KM2=mean(KM_cell12)/KM*100;
KM3=0;
KM4=0;

SKMmean=mean(SKM_cell13);
SKM0=mean(SKM_cell10)/SKM*100;
SKM1=mean(SKM_cell11)/SKM*100;
SKM2=mean(SKM_cell12)/SKM*100;
SKM3=mean(SKM_cell13)/SKM*100;
SKM4=0;

OKMmean=mean(OKM_cell13);
OKM0=mean(OKM_cell10)/OKM*100;
OKM1=mean(OKM_cell11)/OKM*100;
OKM2=mean(OKM_cell12)/OKM*100;
OKM3=mean(OKM_cell13)/OKM*100;
OKM4=0;

OSMmean=mean(OSM_cell13);
OSM0=mean(OSM_cell10)/OSM*100;
OSM1=mean(OSM_cell11)/OSM*100;
OSM2=mean(OSM_cell12)/OSM*100;
OSM3=mean(OSM_cell13)/OSM*100;
OSM4=0;

OSKmean=mean(OSK_cell13);
OSK0=mean(OSK_cell10)/OSK*100;
OSK1=mean(OSK_cell11)/OSK*100;
OSK2=mean(OSK_cell12)/OSK*100;
OSK3=mean(OSK_cell13)/OSK*100;
OSK4=0;

```

```

OSKMmean=mean(OSKM_cell14);
OSKM0=mean(OSKM_cell10)/OSKM*100;
OSKM1=mean(OSKM_cell11)/OSKM*100;
OSKM2=mean(OSKM_cell12)/OSKM*100;
OSKM3=mean(OSKM_cell13)/OSKM*100;
OSKM4=mean(OSKM_cell14)/OSKM*100;

TFs_mean =
[Omean;Smean;Kmean;Mmean;OSmean;OKmean;OMmean;SKmean;SMmean;KMmean;SKMmean;
OKMmean;OSMmean;OSKmean;OSKMmean];
TFs=[O_cell11';S_cell11';K_cell11';M_cell11';OS_cell12';OK_cell12';OM_cell12';SK_
cell12';SM_cell12';KM_cell12';SKM_cell13';OKM_cell13';OSM_cell13';OSK_cell13';OSKM_
cell14'];
TFs_name =
{'O','S','K','M','OS','OK','OM','SK','SM','KM','SKM','OKM','OSM','OSK','OSK
M'};
figure
bar(1:15,TFs_mean)
box on
ylabel('Numero di Promotori','FontSize',12)
xlabel('FT','FontSize',12)
%axes('Parent',figure3,'FontSize',8,'XTick',[1:15],'XTickLabel',TFs_name)
set(gca,'XTick',[1:15],'XTickLabel',TFs_name,'FontSize',8)
hold on
for i=1:15
    plot(i*ones(1,Ncell),TFs(i,:), 'k.', 'MarkerSize',4)
    hold on
end
%-----
gene_Oct4=zeros(1,No_gene);
gene_Sox2=zeros(1,No_gene);
gene_Klf4=zeros(1,No_gene);
gene_cMyc=zeros(1,No_gene);

for g=1:No_gene
    gene_Oct4(g)=sum(gene_target(g,1,:))/Ncell*100;
    gene_Sox2(g)=sum(gene_target(g,2,:))/Ncell*100;
    gene_Klf4(g)=sum(gene_target(g,3,:))/Ncell*100;
    gene_cMyc(g)=sum(gene_target(g,4,:))/Ncell*100;
end

ymax = 100;

figure(16)
subplot 411
bar(gene_Oct4)
%title('Oct4','FontSize',12)
% xlabel('Promoter')
ylabel('% Cellule','FontSize',12)
ylim([0 ymax])
xlim([0 No_gene])
box on

subplot 412
bar(gene_Sox2)
%title('Sox2','FontSize',12)
% xlabel('Promoter')
ylabel('% Cellule','FontSize',12)
ylim([0 ymax])

```

```

xlim([0 No_gene])
box on

subplot 413
bar(gene_Klf4)
%title('Klf4','FontSize',12)
% xlabel('Promoter')
ylabel('% Cellule','FontSize',12)
ylim([0 ymax])
xlim([0 No_gene])
box on

subplot 414
bar(gene_cMyc)
%title('cMyc','FontSize',12)
xlabel('Promotori','FontSize',12)
ylabel('% Cellule','FontSize',12)
ylim([0 ymax])
xlim([0 No_gene])
box on
%-----
% figura per analisi di sensitività
figure
Combinazione_Binding=[O4 O3 O2 O1 O0;
    S4 S3 S2 S1 S0
    K4 K3 K2 K1 K0
    M4 M3 M2 M1 M0
    OS4 OS3 OS2 OS1 OS0
    OK4 OK3 OK2 OK1 OK0
    OM4 OM3 OM2 OM1 OM0
    SK4 SK3 SK2 SK1 SK0
    SM4 SM3 SM2 SM1 SM0
    KM4 KM3 KM2 KM1 KM0
    SKM4 SKM3 SKM2 SKM1 SKM0
    OKM4 OKM3 OKM2 OKM1 OKM0
    OSM4 OSM3 OSM2 OSM1 OSM0
    OSK4 OSK3 OSK2 OSK1 OSK0
    OSKM4 OSKM3 OSKM2 OSKM1 OSKM0];

bar(1:15,Combinazione_Binding,'BarLayout','stacked')
set(gca,'XTick',[1:15],'XTickLabel',TFs_name,'FontSize',8)
legend('4','3','2','1','0')
ylim([0 100])
xlabel('Fattori di trascrizione','FontSize',12)
ylabel('% binding dei promotori','FontSize',12)

```

APPENDICE B

In questa appendice vengono riportate le function che descrivono le fasi dell'infezione virale: inflow, static e outflow.

B.1 Infezione virale in infuse

```
%% INFUSE
function [xposout,yposout,zposout,stuck,t_stuck,k,B,indice] =
    Simulator_uFluo1(xposin,yposin,zposin,...

q1,v_max,delta_t,st_dev,L,W,H,k_micro,d_cell,stuck,t_stuck,k,D_vf,n_x,n_z,A
,t0,B,Q_Deltat,...
    indice,Virus_tot,nt2,v_mean)

%preallocazione della posizione dei virus a t e a t+dt
xpostemp=NaN(Virus_tot,2);
ypostemp=NaN(Virus_tot,2);
zpostemp=NaN(Virus_tot,2);

%imposto la posizione iniziale dei virus
xpostemp(:,1)=xposin;
ypostemp(:,1)=yposin;
zpostemp(:,1)=zposin;

% Simulazione
for i=1:nt2
    %qui si potrebbe inserire l'influenza del campo di moto sull'entrata
    %dei virus (che invece ora è posto alla fine del seguente ciclo if
    if k<=Virus_tot
        %generazione di vettori con elementi di numeri casuali, per ogni
        %virus (per ogni coordinata); ricordati il seed
        rand_vect1=randn(Virus_tot,1); %coordinata x
        rand_vect2=randn(Virus_tot,1); %coordinata y
        rand_vect3=randn(Virus_tot,1); %coordinata z

        %generazione del vettore v_virus [Virus_tot,1],
        %costruito in modo tale da tenere conto del profilo parabolico
        %dovuto al flusso laminare nel canale microfluidico;
        %perciò è come se ogni virus avesse la sua velocità aggiuntiva
        %dovuto dal flusso nel canale, oltre a quella propria che deriva
        %dal moto browniano
        v_virus=v_max*4/H*ypostemp(:,1).*(1-ypostemp(:,1)/H); %per le
lastre
                                                                    %piane
        %calcolo della posizione di tutti i virus al tempo t+dt
        xpostemp(:,2) = xpostemp(:,1)+st_dev*rand_vect1;
        ypostemp(:,2) = ypostemp(:,1)+st_dev*rand_vect2;
        zpostemp(:,2) = zpostemp(:,1)+st_dev*rand_vect3;

        %ora impongo le condizioni al contorno periodiche ai bordi del
        %dominio lungo x
        for j=1:Virus_tot
            if xpostemp(j,2)<0
```



```

        xpostemp(j,2) = -xpostemp(j,2); %riflessione
elseif xpostemp(j,2)>L
        xpostemp(j,2) = 2*L-xpostemp(j,2); %riflessione
end
end

xpostemp(:,2)=xpostemp(:,2)+v_virus*delta_t;

%ora comincia un ciclo for per mettere le condizioni al contorno e
%analizzare l'infezione o l'eventuale riflessione di ogni virus

for j=1:Virus_tot
    %il seguente statment if viene eseguito per quei virus j che si
    %trovano in una posizione x al tempo t+dt in cui NON c'è NaN,
    %che come si vedrà è la condizione che dice che quel virus j
    %ha infettato la cellula
    if not(isnan(xpostemp(j,2))) %condizione che si verifica se non
c'è
        %NaN per il virus j nella direzione
        %x, se invece c'è NaN vuol dire che
        %il virus j ha infettato oppure deve
        %ancora entrare nel sistema;

        if xpostemp(j,2)<0
            xpostemp(j,2)=NaN;
            ypostemp(j,2)=NaN;
            zpostemp(j,2)=NaN;
        elseif xpostemp(j,2)>L
            xpostemp(j,2)=NaN;
            ypostemp(j,2)=NaN;
            zpostemp(j,2)=NaN;
        else

            if zpostemp(j,2)<0
                zpostemp(j,2)=-zpostemp(j,2);
            elseif zpostemp(j,2)>W
                zpostemp(j,2)=2*W-zpostemp(j,2);
            end

            %BC su y<0 e qui si stabilisce se la probabilità di
            %adsorbimento è tale da infettare la cellula (previa
            %controllo corrispondenza), altrimenti viene riflesso
            if ypostemp(j,2)<0
                q=rand;
                if q < k_micro %la probabilità è alta per poter
adsorbire il virus
                    %Cambio di coordinate per verificare la
                    %corrispondenza con la posizione della cellula

                    %come se mi muovessi lungo x
                    A_riga=ceil(xpostemp(j,2)/d_cell);
                    %come se mi muovessi lungo z
                    A_colonna=n_z-ceil(zpostemp(j,2)/d_cell)+1;

                    if A(A_colonna,A_riga)==1 %controllo
corrispondenza
                        %aggiungo un virus alla matrice B
                        B(A_colonna,A_riga)=B(A_colonna,A_riga)+1;
                    end
                end
            end
        end
    end
end

```

```

k=k+1; %dico che un virus ha infettato
%aggiorno la matrice che indica le
%coordinate x z dei virus attaccati
stuck(k,:)=[xpostemp(j,2),zpostemp(j,2)];
%aggiorno l'istante in cui il virus j ha
%attaccato
t_stuck(k,1)=t0+nt2*(q1-
1)*delta_t+i*delta_t;

%ora dico che il virus j al tempo t+dt ha
%infettato la cellula in quella posizione
xpostemp(j,2) = NaN;
ypostemp(j,2) = NaN;
zpostemp(j,2) = NaN;
else %quindi dato che non c'è corrispondenza
viene riflesso
ypostemp(j,2)=-ypostemp(j,2); %il virus
end
else
riflesso
ypostemp(j,2)=-ypostemp(j,2); %il virus viene
end
else
essere stato negativo
%ovvero y>0, però nell'intervallo dt y potrebbe
%quindi ci può essere stata infezione, ciò
%implica che il virus ha infettato la cellula e
%abbia fatto in tempo ad uscire
q=rand;
%dato che tutto questo processo è più complesso
%la probabilità che ciò avvenga decade con un
%fattore esponenziale
if q < k_micro*exp(-
ypostemp(j,1)*ypostemp(j,2)/(D_vf*delta_t)) % virus potrebbe infettare una
cellula

%cambio coordinate necessarie per il controllo
A_riga = ceil(xpostemp(j,2)/d_cell);
A_colonna = n_z-ceil(zpostemp(j,2)/d_cell)+1;
if A(A_colonna,A_riga)==1 %controllo
corrispondenza
B(A_colonna,A_riga) = B(A_colonna,A_riga)+1;
k = k+1;
stuck(k,:) = [xpostemp(j,2),zpostemp(j,2)];
t_stuck(k,1) = t0+nt2*(q1-
1)*delta_t+i*delta_t;

xpostemp(j,2) = NaN;
ypostemp(j,2) = NaN;
zpostemp(j,2) = NaN;
elseif ypostemp(j,2)>H
%rifletti al top perchè non c'è
%corrispondenza
ypostemp(j,2)=2*H-ypostemp(j,2);
end
elseif ypostemp(j,2)>H
ypostemp(j,2)=2*H-ypostemp(j,2);
else %cioè se la probabilità è troppo bassa
end
end
end
end
end
end

```

```

else
    break %esce da tutti i cicli perchè sono finiti i virus
end
%=====
%questa è la sezione che serve per inserire l'influenza del campo di
%moto sull'entrata dei virus: ci sono più virus al centro del canale e
%nel suo intorno

r=rand;
if r < (Q_Deltat-floor(Q_Deltat))
    decimale=1;
else
    decimale=0;
end
Nvirus_in = floor(Q_Deltat)+decimale;
if Nvirus_in > 0
    f=0;
    while f<Nvirus_in
        g_y=H*rand;
        %calcolo del rapporto tra velocità puntuale e quella massima
        v_vmax=4/H*g_y*(1-g_y/H); %velocità di una lamella di fluido
        %all'altezza g_y
        r1=rand;
        if r1 < v_vmax
            f=f+1;
            ypostemp(indice+f,2)=g_y;
        end
    end
    clear f
    indicel = indice+1;
    indice2 = indice+Nvirus_in;

    v_virus_in = v_max*4/H*ypostemp(indicel:indice2,2).*(1-
ypostemp(indicel:indice2,2)/H); % lastre piane
    rand_vect_in = rand(Nvirus_in,1); % coordinate x

    xpostemp(indicel:indice2,2) = rand_vect_in.*v_virus_in*delta_t;
    zpostemp(indicel:indice2,2) = W*rand(Nvirus_in,1);

    indice = indice+Nvirus_in;
end
xpostemp(:,1)=xpostemp(:,2);
ypostemp(:,1)=ypostemp(:,2);
zpostemp(:,1)=zpostemp(:,2);
end
xposout=xpostemp(:,2);
yposout=ypostemp(:,2);
zposout=zpostemp(:,2);

```

B.2 Infezione virale in statica

```

%% STATICA
function [xposout,yposout,zposout,stuck,t_stuck,k,B] =
Simulator_uFluo2(xposin,yposin,zposin,...

q1,delta_t,st_dev,L,W,H,k_micro,d_cell,stuck,t_stuck,k,D_vf,n_x,n_z,A,t0,B,
Virus_tot,nt2)

```

```


```

%preallocazione
xpostemp = NaN(Virus_tot,2); % posizione virus a t e a t+delta_t
ypostemp = NaN(Virus_tot,2);
zpostemp = NaN(Virus_tot,2);

xpostemp(:,1) = xposin; % posizione iniziale virus
ypostemp(:,1) = yposin;
zpostemp(:,1) = zposin;

% Simulation
for i = 1:nt2 %per ogni intervallino delta t
 %qui non ci va aggiunto l'influenza del campo di moto sul numero
 %entranti di virus

 if k <= Virus_tot
 %generazione di numero casuale con distribuzione normale
 rand_vect1 = randn(Virus_tot,1); % coordinate x
 rand_vect2 = randn(Virus_tot,1); % coordinate y
 rand_vect3 = randn(Virus_tot,1); % coordinate z

 %generazione di una traiettoria dettata dal moto browniano
 xpostemp(:,2) = xpostemp(:,1)+st_dev*rand_vect1;
 ypostemp(:,2) = ypostemp(:,1)+st_dev*rand_vect2;
 zpostemp(:,2) = zpostemp(:,1)+st_dev*rand_vect3;

 %qui non devo mettere le condizioni di riflessione ai bordi x del
 %canale
 %inoltre non devo aggiungere il contributo entropico

 for j = 1:Virus_tot

 if not(isnan(xpostemp(j,2))) % virus non ha ancora infettato,
 % condizione che si verifica se
 % non c'è NaN nella posizione j e
 % nella direzione z al tempo t+dt
 % (ovvero se il virus j non ha
 % ancora infettato)

 % ---
 if xpostemp(j,2) < 0
 xpostemp(j,2) = -xpostemp(j,2); % riflesso
 elseif xpostemp(j,2) > L
 xpostemp(j,2) = 2*L-xpostemp(j,2); % riflesso
 end
 %probabilmente l'else non è indispensabile (cioè 0<x<L è
 %scontato)
 % ---
 if zpostemp(j,2) < 0
 zpostemp(j,2) = -zpostemp(j,2); % riflesso
 elseif zpostemp(j,2) > W
 zpostemp(j,2) = 2*W-zpostemp(j,2); % riflesso
 end
 % ---
 %stabilisco la riflessione o l'infezione del virus se esso
 %attraversa il piano y
 if ypostemp(j,2) < 0
 q = rand;
 if q < k_micro % virus potrebbe infettare una cellula

```


```

```

        %cambio di coordinate per verificare corrispondenza
        A_riga = ceil(xpostemp(j,2)/d_cell);
        A_colonna = n_z-ceil(zpostemp(j,2)/d_cell)+1;

        %se c'è corrispondenza
        if A(A_colonna,A_riga) == 1 %virus infetta una
cellula

            %quindi bisogna aggiornare le matrici e i
            %vettori, ma soprattutto dire che il virus j al
            %tempo t+dt ha infettato e quindi metterci NaN
            B(A_colonna,A_riga) = B(A_colonna,A_riga)+1;
            k = k+1;
            stuck(k,:) = [xpostemp(j,2),zpostemp(j,2)];
            t_stuck(k,1) = t0+nt2*(q1-1)*delta_t+i*delta_t;
            xpostemp(j,2) = NaN;
            ypostemp(j,2) = NaN;
            zpostemp(j,2) = NaN;
        else % virus viene riflesso at bottom *****
            ypostemp(j,2) = -ypostemp(j,2);
        end
        else % virus viene riflesso at bottom
            %perchè la probabilità è troppo bassa per infettare
            ypostemp(j,2) = -ypostemp(j,2);
        end
        else % valore potrebbe essere stato negativo in un momento
intermedio tra t e t+Dt
            %quindi siamo nella condizione y>0
            q = rand;
            if q < k_micro*exp(-
ypostemp(j,1)*ypostemp(j,2)/(D_vf*delta_t)) % virus potrebbe infettare una
cellula

                %cambio di coordinate
                A_riga = ceil(xpostemp(j,2)/d_cell);
                A_colonna = n_z-ceil(zpostemp(j,2)/d_cell)+1;
                %verifica corrispondenza
                if A(A_colonna,A_riga) == 1 % virus infetta una
cellula

                    B(A_colonna,A_riga) = B(A_colonna,A_riga)+1;
                    k = k+1;
                    stuck(k,:) = [xpostemp(j,2),zpostemp(j,2)];
                    t_stuck(k,1) = t0+nt2*(q1-1)*delta_t+i*delta_t;
                    xpostemp(j,2) = NaN;
                    ypostemp(j,2) = NaN;
                    zpostemp(j,2) = NaN;
                elseif ypostemp(j,2) > H % non c'e' cellula, virus
viene riflesso at top

                    ypostemp(j,2) = 2*H-ypostemp(j,2);
                end
            elseif ypostemp(j,2) > H % virus viene riflesso al top
                ypostemp(j,2) = 2*H-ypostemp(j,2);
            else %la probabilità quindi è troppo bassa
            end
        end
    end
end
end
else
    break % esce da tutti i cicli for, e va a "xposout =
xpostemp(:,2);"
end
end

```

```

xpostemp(:,1) = xpostemp(:,2); %aggiornamento della nuova posizione dei
ypostemp(:,1) = ypostemp(:,2); %virus
zpostemp(:,1) = zpostemp(:,2);

end
%posizione finale di tutti i virus dopo un intervallo di tempo grande nt1
xposout = xpostemp(:,2);
yposout = ypostemp(:,2);
zposout = zpostemp(:,2);

```

B.3 Infezione virale in outflow

```

%% OUTFLOW
function [xposout,yposout,zposout,stuck,t_stuck,k,B] =
Simulator_uFluo3(xposin,yposin,zposin,...

q1,delta_t,st_dev,L,W,H,k_micro,d_cell,stuck,t_stuck,k,D_vf,n_x,n_z,A,t0,B,
Virus_tot,nt2,v_max,v_mean)

xpostemp = NaN(Virus_tot,2); % posizione virus a t e a t+delta_t
ypostemp = NaN(Virus_tot,2);
zpostemp = NaN(Virus_tot,2);

xpostemp(:,1) = xposin; % posizione iniziale virus
ypostemp(:,1) = yposin;
zpostemp(:,1) = zposin;

% Simulation
for i = 1:nt2
    if k <= Virus_tot
        rand_vect1 = randn(Virus_tot,1); % coordinate x
        rand_vect2 = randn(Virus_tot,1); % coordinate y
        rand_vect3 = randn(Virus_tot,1); % coordinate z

        % v_virus = v_max*(1-(ypostemp(:,1)-H/2).^2/(H/2)^2); % condotto
cilindrico
        v_virus = v_max*4/H*ypostemp(:,1).*(1-ypostemp(:,1)/H); % lastre
piane

        xpostemp(:,2) = xpostemp(:,1)+st_dev*rand_vect1;
        ypostemp(:,2) = ypostemp(:,1)+st_dev*rand_vect2;
        zpostemp(:,2) = zpostemp(:,1)+st_dev*rand_vect3;

        for j = 1:Virus_tot
            if xpostemp(j,2) < 0
                xpostemp(j,2) = -xpostemp(j,2); % reflection
            elseif xpostemp(j,2) > L
                xpostemp(j,2) = 2*L-xpostemp(j,2); % reflection
            end
        end
        %attenzione alla giusta sovrascizione
        xpostemp(:,2) = xpostemp(:,2)+v_virus*delta_t;

        for j = 1:Virus_tot
            if not(isnan(xpostemp(j,2))) % virus non ha ancora infettato

```

```

% ---
if xpostemp(j,2) < 0
    xpostemp(j,2) = NaN; % esce
    ypostemp(j,2) = NaN;
    zpostemp(j,2) = NaN;
elseif xpostemp(j,2) > L
    xpostemp(j,2) = NaN; % esce
    ypostemp(j,2) = NaN;
    zpostemp(j,2) = NaN;
else

    if zpostemp(j,2) < 0
        zpostemp(j,2) = -zpostemp(j,2); % riflesso
    elseif zpostemp(j,2) > W
        zpostemp(j,2) = 2*W-zpostemp(j,2); % riflesso
    end
    % ---
    if ypostemp(j,2) < 0
        q = rand;
        if q < k_micro % virus potrebbe infettare una
cellula
            A_riga = ceil(xpostemp(j,2)/d_cell);
            A_colonna = n_z-ceil(zpostemp(j,2)/d_cell)+1;
            if A(A_colonna,A_riga) == 1 %virus infetta una
cellula
                B(A_colonna,A_riga) =
B(A_colonna,A_riga)+1;
                k = k+1;
                stuck(k,:) = [xpostemp(j,2),zpostemp(j,2)];
                t_stuck(k,1) = t0+nt2*(q1-
1)*delta_t+i*delta_t;
                xpostemp(j,2) = NaN;
                ypostemp(j,2) = NaN;
                zpostemp(j,2) = NaN;
            else % virus viene riflesso at bottom
                ypostemp(j,2) = -ypostemp(j,2);
            end
        else % virus viene riflesso at bottom
            ypostemp(j,2) = -ypostemp(j,2);
        end
    else % valore potrebbe essere stato negativo in un
momento intermedio tra t e t+Dt
        q = rand;
        if q < k_micro*exp(-
ypostemp(j,1)*ypostemp(j,2)/(D_vf*delta_t)) % virus potrebbe infettare una
cellula
            A_riga = ceil(xpostemp(j,2)/d_cell);
            A_colonna = n_z-ceil(zpostemp(j,2)/d_cell)+1;
            if A(A_colonna,A_riga) == 1 % virus infetta una
cellula
                B(A_colonna,A_riga) =
B(A_colonna,A_riga)+1;
                k = k+1;
                stuck(k,:) = [xpostemp(j,2),zpostemp(j,2)];
                t_stuck(k,1) = t0+nt2*(q1-
1)*delta_t+i*delta_t;
                xpostemp(j,2) = NaN;
                ypostemp(j,2) = NaN;
                zpostemp(j,2) = NaN;
            end
        end
    end
end
end
end

```

```

                    elseif ypostemp(j,2) > H % non c'e' cellula,
virus viene riflesso at top
                    ypostemp(j,2) = 2*H-ypostemp(j,2);
                    end
                    elseif ypostemp(j,2) > H % virus viene riflesso at
top
                    ypostemp(j,2) = 2*H-ypostemp(j,2);
                    else
                    end
                    end
                    end
                    end
                    end
                    end
                    end
                    else
                    break % esce da tutti i cicli for, e va a "xposout =
xpostemp(:,2);"
                    end

                    xpostemp(:,1) = xpostemp(:,2);
                    ypostemp(:,1) = ypostemp(:,2);
                    zpostemp(:,1) = zpostemp(:,2);

end

xposout = xpostemp(:,2);
yposout = ypostemp(:,2);
zposout = zpostemp(:,2);

```


APPENDICE C

In questa appendice viene riportato l'algoritmo relativo alla simulazione dei processi intracellulari relative alla sintesi di mRNA e proteina integrati con la duplicazione cellulare.

C.1 Processi intracellulari

```
function
[A1,B1,C1,D1,Ncell_td_tot,GFP_pos_t0,GFP_pos_td_tot,B0]=Processi_inter_infe
zione_seed(A0,B0,C0,D0,N0,xdevst_virus,xdevst_RNA,xdevst_P,K,td,td_tot,Delt
aT,K_transcription,K_deg_mRNA,K_translation,K_deg_protein,empty_pos_rand)
%-----
% Nomenclatura delle matrici
% A0=matrice iniziale che indica dove sono le cellule
% A1=come A0 ma con significato temporale
% B0=matrice iniziale che indica il numero di virus per cellula
% B1=come B0 ma con significato temporale
% C0=matrice iniziale che indica la quantità di mRNA per cellula
% C1=come C0 ma con significato temporale
% D0=matrice iniziale che indica la quantità di Proteina per cellula
% D1=come D0 ma con significato temporale
%-----
cell_new=K-N0;
ind=clock;
%% Divisione Cellulare
r=log(2)/td; % velocità di duplicazione
% Inserimento di elementi -1 nella matrice B0 nelle posizioni in cui A0=0
for i=1:size(A0,1)
    for j=1:size(A0,2)
        if A0(i,j)==0
            B0(i,j)=-1;
        else
            end
        end
    end
end
[i1nocell,i2nocell]=find(A0==0); %indici di dove non ci sono cellule
% % ATT, dopo il primo tempo non si duplica niente!!
% empty_pos_rand = randperm(length(i1nocell)); %deve essere della stessa
dimensione di i1nocell
i1nocellrand = i1nocell(empty_pos_rand);
i2nocellrand = i2nocell(empty_pos_rand);
clear i1nocell i2nocell empty_pos_rand

TimePoints = 0:DeltaT:td_tot;
NoTimePoints = length(TimePoints);
Ncell_t=zeros(NoTimePoints,1); % numero di cellule presenti ai time point
salvati
Ncell_t(1,1) = N0;
A_t=cell(1,NoTimePoints); % A per ogni tempo
A_t{1} = A0;
B_t=cell(1,NoTimePoints); % B per ogni tempo
B_t{1} = B0;

C_t=cell(1,NoTimePoints); % C per ogni tempo
```

```

C_t{1} = C0;
D_t=cell(1,NoTimePoints); % D per ogni tempo
D_t{1} = D0;
if cell_new==0

[C1,D1,GFP_pos_t0]=Processi_inter_infezione_NO_duplicazione(TimePoints,A0,B
0,C0,D0,K_transcription,K_deg_mRNA,K_translation,K_deg_protein);
    A1=A0;
    B1=B0;
    Ncell_td_tot=N0;
    GFP_pos_td_tot=GFP_pos_t0;
else
    for j=2:NoTimePoints

        randn('state',1)
        rand('twister',1)

        Time = TimePoints(j);
        Ntot_th=K*N0/(N0+exp(-r*Time)*(K-N0));

        n_generazioni=log2(Ntot_th/N0);

        A1=A0; %si parte sempre dalla stessa configurazione iniziale
        B1=B0;
        C1=C0;
        D1=D0;

        % costruzione della matrice C1 e D1 a partire dalle condizioni
iniziali
        % fino al tempo Time
        [icell,jcell]=find(B1~-1);
        DNA=zeros(length(icell),1);
        RNA0=zeros(length(icell),1);
        RNA_t=zeros(length(icell),1);
        P0=zeros(length(icell),1);
        P_t=zeros(length(icell),1);

        for q=1:length(icell)
            DNA(q)=B1(icell(q),jcell(q));
            RNA0(q)=C0(icell(q),jcell(q)); % condizione iniziale
            P0(q)=D0(icell(q),jcell(q)); % condizione iniziale
            RNA_t(q)=round((DNA(q)*(-
1+exp(K_deg_mRNA*Time))*K_transcription+K_deg_mRNA*RNA0(q))/(K_deg_mRNA*exp
(K_deg_mRNA*Time)));
            P_t(q)=(DNA(q)*(exp(K_deg_protein*Time)*K_deg_protein-
exp(K_deg_mRNA*Time)*K_deg_mRNA+exp((K_deg_protein + K_deg_mRNA)*Time)*(-
K_deg_protein+K_deg_mRNA))*K_translation*K_transcription+K_deg_protein*K_de
g_mRNA*(-
(exp(K_deg_protein*Time)*K_translation*RNA0(q))+exp(K_deg_mRNA*Time)*(-
(K_deg_protein*P0(q))+K_deg_mRNA*P0(q)+K_translation*RNA0(q)))/(exp((K_deg
_protein+K_deg_mRNA)*Time)*K_deg_protein*K_deg_mRNA*(-
K_deg_protein+K_deg_mRNA)));

            %costruzione delle matrici C1 e D1
            C1(icell(q),jcell(q))=RNA_t(q);
            D1(icell(q),jcell(q))=P_t(q);
        end
    end

```

```

clear DNA RNA0 P0 RNA_t P_t
%numero di volte in cui tutte le cellule della popolazione si
duplicano
n_gen_int=floor(n_generazioni);

%% Duplicazione della parte intera

for i=1:n_gen_int
    [ilcell,i2cell]=find(A1==1); %indici di dove sono le cellule
    Ncell_prediv = length(ilcell); %questo è il numero di cellule
da duplicare

    %prima della duplicazione
    parent_virus=zeros(Ncell_prediv,1);
    parent_RNA=zeros(Ncell_prediv,1);
    parent_P=zeros(Ncell_prediv,1);
    for q=1:Ncell_prediv
        parent_virus(q)=B1(ilcell(q),i2cell(q));
        parent_RNA(q)=C1(ilcell(q),i2cell(q));
        parent_P(q)=D1(ilcell(q),i2cell(q));
    end

    child1 = zeros(Ncell_prediv,1); % child1 sarà il vettore che
contiene la quantità di virus dopo la duplicazione nella prima cellula
figlia (stessa posizione di parent)
    child2 = zeros(Ncell_prediv,1); % child2 sarà il vettore che
contiene la quantità di virus dopo la duplicazione nella seconda cellula
figlia
    child1RNA = zeros(Ncell_prediv,1); % child1RNA sarà il vettore
che contiene la quantità di RNA dopo la duplicazione nella prima cellula
figlia (stessa posizione di parent)
    child2RNA = zeros(Ncell_prediv,1); % child2RNA sarà il vettore
che contiene la quantità di RNA dopo la duplicazione nella seconda cellula
figlia
    child1P = zeros(Ncell_prediv,1); % child1P sarà il vettore che
contiene la quantità di proteina dopo la duplicazione nella prima cellula
figlia (stessa posizione di parent)
    child2P = zeros(Ncell_prediv,1); % child2P sarà il vettore che
contiene la quantità di proteina dopo la duplicazione nella seconda
cellula figlia

    for q=1:Ncell_prediv

        child1(q)=rand_pdf_virus(parent_virus(q),xdevst_virus);
        child2(q)=parent_virus(q)-child1(q);
        child1RNA(q)=rand_pdf_RNA(parent_RNA(q),xdevst_RNA);
        child2RNA(q)=parent_RNA(q)-child1RNA(q);
        child1P(q)=rand_pdf_P(parent_P(q),xdevst_P);
        child2P(q)=parent_P(q)-child1P(q);

    end

    Ncell_added = sum(sum(A1))-N0; % numero cellule aggiunte finora
    for q=1:Ncell_prediv
        q1 = q+Ncell_added;
        A1(ilnocellrand(q1),i2nocellrand(q1))=1;
        B1(ilcell(q),i2cell(q))=child1(q);
        B1(ilnocellrand(q1),i2nocellrand(q1))=child2(q);
    end

```

```

        C1(ilcell(q),i2cell(q))=child1RNA(q);
        C1(ilnocellrand(q1),i2nocellrand(q1))=child2RNA(q);
        D1(ilcell(q),i2cell(q))=child1P(q);
        D1(ilnocellrand(q1),i2nocellrand(q1))=child2P(q);
    end

end

clear i q ilcell i2cell ilnocell i2nocell parent_virus child1
child2 child1RNA child2RNA child1P child2P
%-----
-----

    %% Duplicazione della parte decimale
    Ntot_int=sum(sum(A1)); % numero di cellule dopo la duplicazione
della parte intera
    Ntot=round(Ntot_th); %numero di cellule finali
    Ncell_added = Ntot_int-N0; % numero cellule aggiunte dopo la
duplicazione della parte intera
    Ncell_new=Ntot-Ntot_int; %cellule rimaste da aggiungere

    [ilcell,i2cell]= find(A1==1); %indici di dove sono le cellule
    parent=zeros(Ncell_new,1); %parent sarà il vettore che contiene la
quantità di virus prima della duplicazione

    %riempimento del vettore parent
    for q=1:Ncell_new
        parent(q)=B1(ilcell(q),i2cell(q));
        parent_RNA(q)=C1(ilcell(q),i2cell(q));
        parent_P(q)=D1(ilcell(q),i2cell(q));
    end

    child1=zeros(Ncell_new,1);
    child2=zeros(Ncell_new,1);
    child1RNA = zeros(Ncell_new,1); % child1 sarà il vettore che
contiene la quantità di RNA dopo la duplicazione nella prima cellula figlia
(stessa posizione di parent)
    child2RNA = zeros(Ncell_new,1); % child2 sarà il vettore che
contiene la quantità di RNA dopo la duplicazione nella seconda cellula
figlia
    child1P = zeros(Ncell_new,1); % child1 sarà il vettore che contiene
la quantità di proteina dopo la duplicazione nella prima cellula figlia
(stessa posizione di parent)
    child2P = zeros(Ncell_new,1); % child2 sarà il vettore che contiene
la quantità di proteina dopo la duplicazione nella seconda cellula figlia

    for q=1:Ncell_new

        child1(q)=rand_pdf_virus(parent(q),xdevst_virus);
        child2(q)=parent(q)-child1(q);
        child1RNA(q)=rand_pdf_RNA(parent_RNA(q),xdevst_RNA);
        child2RNA(q)=parent_RNA(q)-child1RNA(q);
        child1P(q)=rand_pdf_P(parent_P(q),xdevst_P);
        child2P(q)=parent_P(q)-child1P(q);

    end

    for q=1:Ncell_new
        q1 = q+Ncell_added;

```

```

        A1(ilnocellrand(q1),i2nocellrand(q1))=1;
        B1(ilcell(q),i2cell(q))=child1(q);
        B1(ilnocellrand(q1),i2nocellrand(q1))=child2(q);
        C1(ilcell(q),i2cell(q))=child1RNA(q);
        C1(ilnocellrand(q1),i2nocellrand(q1))=child2RNA(q);
        D1(ilcell(q),i2cell(q))=child1P(q);
        D1(ilnocellrand(q1),i2nocellrand(q1))=child2P(q);
    end
    clear q ilcell i2cell ilnocell i2nocell parent child1 child2
    child1RNA child2RNA child1P child2P

    Ncell_t(j)=length(find(A1==1));
    A_t{j}=A1;
    B_t{j}=B1;
    C_t{j}=C1;
    D_t{j}=D1;

end

%-----
-----
A1=A_t{1,end};
B1=B_t{1,end};
C1=C_t{1,end};
D1=D_t{1,end};

Ncell_td_tot=length(find(A1==1)); %numero di cellule al tempo finale
Ncell_lvirus_t0=length(find(B0>=1)); %número di cellule con almeno un
virus al tempo iniziale
Ncell_lvirus_tf=length(find(B1>=1)); %numero di cellule con almeno un
virus al tempo finale

GFP_pos=[Ncell_lvirus_t0/N0*100 Ncell_lvirus_tf/Ncell_td_tot*100];
GFP_pos_t0 = GFP_pos(1);
GFP_pos_td_tot = GFP_pos(2);

end

function
[C1,D1,GFP_pos_t0]=Processi_inter_infezione_NO_duplicazione(TimePoints,A0,B
0,C0,D0,K_transcription,K_deg_mRNA,K_translation,K_deg_protein)

NoTimePoints=length(TimePoints);

for j=1:NoTimePoints
    Time=TimePoints(j);
    [icell,jcell]=find(B0~-1);
    DNA=zeros(length(icell),1);
    RNA0=zeros(length(icell),1);
    RNA_t=zeros(length(icell),1);
    P0=zeros(length(icell),1);
    P_t=zeros(length(icell),1);

    for q=1:length(icell)
        DNA(q)=B0(icell(q),jcell(q));
        RNA0(q)=C0(icell(q),jcell(q)); % condizione iniziale

```

```

        P0(q)=D0(icell(q),jcell(q)); % condizione iniziale
        RNA_t(q)=round((DNA(q)*(-
1+exp(K_deg_mRNA*Time))*K_transcription+K_deg_mRNA*RNA0(q))/(K_deg_mRNA*exp
(K_deg_mRNA*Time)));
        P_t(q)=(DNA(q)*(exp(K_deg_protein*Time)*K_deg_protein-
exp(K_deg_mRNA*Time)*K_deg_mRNA+exp((K_deg_protein + K_deg_mRNA)*Time)*(-
K_deg_protein+K_deg_mRNA))*K_translation*K_transcription+K_deg_protein*K_de
g_mRNA*(-
(exp(K_deg_protein*Time)*K_translation*RNA0(q))+exp(K_deg_mRNA*Time)*(-
(K_deg_protein*P0(q))+K_deg_mRNA*P0(q)+K_translation*RNA0(q)))/(exp((K_deg
_protein+K_deg_mRNA)*Time)*K_deg_protein*K_deg_mRNA*(-
K_deg_protein+K_deg_mRNA)));

        %costruzione delle matrici C1 e D1
        C1(icell(q),jcell(q))=RNA_t(q);
        D1(icell(q),jcell(q))=P_t(q);
    end
end
Ncell_1virus=length(find(B0>=1));
cell=sum(sum(A0));
GFP_pos_t0=Ncell_1virus/cell*100;

function child1=rand_pdf_virus(parent,xdevst)
mu = parent/2; %media
devst = mu/xdevst; %varianza
%più xdevst è grande più la varianza è stretta
child1 = max(0,round(mu+devst*randn));

function child1=rand_pdf_RNA(parent,xdevst)
mu = parent/2; %media
devst = mu/xdevst; %varianza
%più xdevst è grande più la varianza è stretta
child1 = max(0,round(mu+devst*randn));

function child1=rand_pdf_P(parent,xdevst)
mu = parent/2; %media
devst = mu/xdevst; %varianza
%più xdevst è grande più la varianza è stretta
child1 = max(0,mu+devst*randn);

```

APPENDICE D

Questa appendice riporta la function relativa al fitting dei parametri dell'equazione logistica impiegata per modellare la duplicazione cellulare.

D.1 Fitting della curva di crescita cellulare

```
function curva_crescita_fitting
clear all; clc
%curva di crescita di MEF
% fitting da dati sperimentali per ottenere i parametri della legge
% logistica: K e td
%% EXP
%vettore temporale
time_point=[0 28 67 73 95 121 192];
Nexp=round([95.425 116.655 171.67 189.43 186.54 192.94 229.2004]); %
cell/(mm^2)
std_exp=[7.58 14.7462 31.2504 28.1840 25.5119 27.4617 48.2259];

N0=Nexp(1); % cell/(mm^2)
x0=[12 100]';

[x,cost]=fminsearch(@(x)Fun_cost(x,N0,time_point,Nexp,std_exp),x0);
td=x(1);
Kconc=x(2); % cell/mm2

d_cell= 65; %um
n_z=23;
n_x=259;
area_th=(n_x*n_z*d_cell^2)*(10^-6); % mm^2

K = round(Kconc*area_th);
%tempo_th=time_point;
tempo_th=0:300;
Ntot_th=zeros(1,length(tempo_th));
for t=1:length(tempo_th)
    Ntot_th(t)=round(Kconc*N0/(N0+exp(-log(2)/td*tempo_th(t)))*(Kconc-N0));
end
plot(tempo_th,Ntot_th)
hold on
errorbar(time_point,Nexp,std_exp,'r-o')
title('Fitting dei parametri della curva di crescita')
xlabel('Tempo [h]')
ylabel('numero di cellule per superficie [cellule/mm^2]')

function cost=Fun_cost(x,N0,time_point,Nexp,std_exp)
td=x(1);
Kconc=x(2);

r=log(2)/td;

Nmod = Kconc*N0./(N0+exp(-r*time_point).*(Kconc-N0));
cost=sum(((Nexp-Nmod).^2)./(std_exp.^2));
```

APPENDICE E

In questa appendice viene riportato il programma dell'analisi di immagine impiegata per quantificare la degradazione dei virus nella fase di infezione.

E.1 Analisi di immagine per il virus decay

```
clear all;close all;clc

% PROGRAMMA DI ANALISI DI IMMAGINE

% Il programma svolge i seguenti compiti:
% 1) conta cellule marcate con HOECHST
% 2) conta cellule GFP+

% Prima di far girare il programma bisogna definire gli input:
% 1) line 42: inserire percorso dove sono le immagini:
%   es. Folder = 'C:\Users\User\Desktop'
% 2) line43: inserire il prefisso del nome delle immagini:
%   es. Prefisso_nome_foto = 'image';
%   in questo caso le 2 immagini (HOECHST + GFP) da analizzare si
chiamano:
%   image1_ch01.jpg (foto 1 HOECHST)
%   image1_ch02.jpg (foto 1 GFP)
%   image2_ch01.jpg (foto 2 HOECHST)
%   image2_ch02.jpg (foto 2 GFP)
% 3) line 44: definire il numero di immagini (HOECHST + GFP) da analizzare
%   es. Num_foto = 1; se si ha una immagine HOECHST e una GFP
% 4) line 45: modificare n1 (parametro che influisce su come il programma
riconosce i
%   nuclei cellulari), finche' non si trova una buona corrispondenza tra
nuclei
%   originale e nuclei finale in figure 1
% 5) line 46: modificare n3 (parametro che influisce su come il programma
riconosce i
%   le cellule GFP+), finche' non si trova una buona corrispondenza tra
%   GFP originale e GFP binaria in figure 2
% NOTA BENE: e' bene tenere Num_foto = 1; finche' non si stabilisce un buon
%   valore per n1 e n3. Una volta difinti n1 e n3, mettere il
Num_foto
%   corretto e non variare piu' n1 e n3 se le foto sono state
eseguite nelle
%   stesse condizioni (luminosita', tipo di substrato,
ingrandimento, ...)
```

```
% Output del modello:
% Il modello genera un file excel 'workspace.xls', apribile da excel (che
chiedera'
% se si e' sicuri di voler aprire il file, cliccare 'si'), in cui sono
riportati gli
% input e i seguenti output:
% NrNuclei = numero nuclei nella foto
% NrGFP = numero cellule GFP+ nella foto
% conc = numero cell/mm2
% Efficiency = percentuale cellule GFP+
```



```

%% INPUT
Folder = 'C:\Users\Utente\Documents\MATLAB\tesi
magistrale\mio\fase2\imaging\virus decay';
Prefisso_nome_foto = 'image';
Num_foto = 12;
n1 = 0.044;

%% LOAD FOLDER WITH IMAGES
addpath(Folder);

for g = 1:Num_foto
    i_vect{g} = num2str(g); %indice foto da analizzare
end

%% FOTO HOECHST
J10 = cell(1,length(i_vect));
for I = 1:length(i_vect)
    i = i_vect{I};
    image = [Prefisso_nome_foto,i,'_ch01.jpg'];

    J1full = imread(image);
    %figure(1); subplot 121;
    %imshow(J1full); title('nuclei originale');
    J1full = rgb2gray(J1full);

    J10full = HOECHST(J1full,n1);
    %figure(1); subplot 122;
    %imshow(J10full); title('nuclei finale');

    [labeled,numObjects] = bwlabel(J10full,4);
    labeled_tot{I} = labeled;
    NrNuclei(I) = numObjects;
    ch_width = size(J1full,2)*100/97*1e-3; % mm
    ch_length = size(J1full,1)*100/97*1e-3; % mm
    Area(I) = ch_length*ch_width; % mm2
    Conc(I) = NrNuclei(I)/Area(I); % cell/mm2

    J10{1,I} = J10full;
end

clear Area I J1full J10full ch_length ch_width labeled numObjects image
save workspace

%% FOTO GFP
L = length(i_vect);
for I = 1:L
    i = i_vect{I};
    image_jpg = [Prefisso_nome_foto,i,'_ch02.jpg'];

    I1 = imread(image_jpg);
    I2 = rgb2gray(I1);

    % Mean fluorescence in each ROI ( = nuclear regions)
    labeled = labeled_tot{I};
    ListPixelROIs = regionprops(labeled, 'PixelIdxList');
    for j = 1:NrNuclei(I)
        MeanFl(j,1) = mean2(I2(ListPixelROIs(j,1).PixelIdxList));
    end
end

```

```

end
MeanFl_tot(:,I) = MeanFl;
clear MeanFl

%figure
%hist(MeanFl_tot(:,I),1:2:140)

N{I}=hist(MeanFl_tot(:,I),1:140);
%xlim([0 140])
%xlabel('Fluorescence Intensity, (a.u.)')
%ylabel('Count')
%hold on
%
%   pause
%plot(1:140,N{I})

n2 = 9; % chosen according to x-value in histogram, TO DEFINE!!!
NrGFP(I) = length(find(MeanFl_tot(:,I) > n2));
Efficiency(I) = NrGFP(I)/NrNuclei(I)*100; % %
end

Mchip3=[N{1,1};N{1,2};N{1,3}];
Mchip4=[N{1,5};N{1,6};N{1,7};N{1,8}];
Mchip5=[N{1,9};N{1,10};N{1,11};N{1,12}];
mean_N_chip3=zeros(1,length(N{1,1}));
dev_st_chip3=zeros(1,length(N{1,1}));
mean_N_chip4=zeros(1,length(N{1,5}));
dev_st_chip4=zeros(1,length(N{1,5}));
mean_N_chip5=zeros(1,length(N{1,9}));
dev_st_chip5=zeros(1,length(N{1,9}));
for j=1:140
    mean_N_chip3(j) = mean(Mchip3(:,j));
    dev_st_chip3(j) = std(Mchip3(:,j));
    mean_N_chip4(j) = mean(Mchip4(:,j));
    dev_st_chip4(j) = std(Mchip4(:,j));
    mean_N_chip5(j) = mean(Mchip5(:,j));
    dev_st_chip5(j) = std(Mchip5(:,j));
end
figure
plot(1:140,mean_N_chip3,'LineWidth',2)
hold on
errorbar(mean_N_chip3,dev_st_chip3,'xr')
xlim([0 140])
xlabel('Fluorescence Intensity, (a.u.)')
ylabel('Count')
%title('PDF with standard deviation (virus fresh)')
title('Virus fresh')

figure
plot(1:140,mean_N_chip4,'LineWidth',2)
hold on
errorbar(mean_N_chip4,dev_st_chip4,'xr')
xlim([0 140])
xlabel('Fluorescence Intensity, (a.u.)')
ylabel('Count')
%title('PDF with standard deviation (virus adsorption)')
title('Virus adsorption')

figure
plot(1:140,mean_N_chip5,'LineWidth',2)

```

```

hold on
errorbar(mean_N_chip5,dev_st_chip5,'xr')
xlim([0 140])
xlabel('Fluorescence Intensity, (a.u.)')
ylabel('Count')
%title('PDF with standard deviation (virus temperature degradation)')
title('Virus temperature degradation')

%figure
ccdf_chip3=zeros(1,140);
ccdf_chip4=zeros(1,140);
ccdf_chip5=zeros(1,140);
st_31=zeros(1,140);
st_32=zeros(1,140);
st_33=zeros(1,140);

for k=1:140
    ccdf_chip3(k)=sum(mean_N_chip3(k:140))/sum(mean_N_chip3)*100;
    ccdf_chip4(k)=sum(mean_N_chip4(k:140))/sum(mean_N_chip4)*100;
    ccdf_chip5(k)=sum(mean_N_chip5(k:140))/sum(mean_N_chip5)*100;

    st_31(k)=sum(Mchip3(1,k:140))/sum(Mchip3(1,:))*100;
    st_32(k)=sum(Mchip3(2,k:140))/sum(Mchip3(2,:))*100;
    st_33(k)=sum(Mchip3(3,k:140))/sum(Mchip3(3,:))*100;

    st_41(k)=sum(Mchip4(1,k:140))/sum(Mchip4(1,:))*100;
    st_42(k)=sum(Mchip4(2,k:140))/sum(Mchip4(2,:))*100;
    st_43(k)=sum(Mchip4(3,k:140))/sum(Mchip4(3,:))*100;
    st_44(k)=sum(Mchip4(4,k:140))/sum(Mchip4(4,:))*100;

    st_51(k)=sum(Mchip5(1,k:140))/sum(Mchip5(1,:))*100;
    st_52(k)=sum(Mchip5(2,k:140))/sum(Mchip5(2,:))*100;
    st_53(k)=sum(Mchip5(3,k:140))/sum(Mchip5(3,:))*100;
    st_54(k)=sum(Mchip5(4,k:140))/sum(Mchip5(4,:))*100;
end
st_chip3=[st_31;st_32;st_33];
st_chip3_ccdf=std(st_chip3,0,1);

st_chip4=[st_41;st_42;st_43;st_44];
st_chip4_ccdf=std(st_chip4,0,1);

st_chip5=[st_51;st_52;st_53;st_54];
st_chip5_ccdf=std(st_chip5,0,1);

plot(1:140,ccdf_chip3,'LineWidth',2)
hold on
plot(1:140,ccdf_chip4,'r','LineWidth',2)
hold on
plot(1:140,ccdf_chip5,'g','LineWidth',2)
legend('Virus fresco','Adsorbimento dei virus','Degradazione termica dei virus')
hold on
errorbar(1:2:140,ccdf_chip3(1:2:140),st_chip3_ccdf(1:2:140),'MarkerSize',0.5,'Marker','.', 'LineStyle','none','Color',[0 0 1])
hold on
errorbar(1:2:140,ccdf_chip4(1:2:140),st_chip4_ccdf(1:2:140),'MarkerSize',0.5,'Marker','.', 'LineStyle','none','Color',[1 0 0])
hold on

```

```

errorbar(1:2:140,ccdf_chip5(1:2:140),st_chip5_ccdf(1:2:140),'MarkerSize',0.
5,'Marker','.', 'LineStyle','none','Color',[0 1 0])
xlabel('Intensità di fluorescenza, (a.u.)')
ylabel('% GFP+')
%title('Complementary cumulative distribution function')

EI_chip3=mean(Efficiency(1:3));
EI_dev_st_chip3=std(Efficiency(1:3));
EI_chip4=mean(Efficiency(5:8));
EI_dev_st_chip4=std(Efficiency(5:8));
EI_chip5=mean(Efficiency(9:12));
EI_dev_st_chip5=std(Efficiency(9:12));
figure
EI_mean=[EI_chip3 EI_chip4 EI_chip5];
dev_st_chip=[EI_dev_st_chip3 EI_dev_st_chip4 EI_dev_st_chip5];
bar(1:3,EI_mean)
hold on
errorbar(EI_mean,dev_st_chip,'xr')
ylabel('Efficienza %')
%xlabel('Virus fresh Virus adsorption Virus temperature degradation')
set(gca,'XTickLabel',{'Virus fresco','Adsorbimento virus','Degradazione
termica virus'})
%title('Efficiency comparison')

rmpath(Folder)

clear g i I i_vect j k n2 I1full I8full J10 image_jpg labeled numObjects
prefixl q
save workspace

xlswrite('workspace',{'INPUT'},'Fogliol','A1')
xlswrite('workspace',{'Folder'},'Fogliol','A2')
xlswrite('workspace',{'Prefisso_nome_foto'},'Fogliol','A3')
xlswrite('workspace',{'n1'},'Fogliol','A4')

xlswrite('workspace',{'Folder'},'Fogliol','B2')
xlswrite('workspace',{'Prefisso_nome_foto'},'Fogliol','B3')
xlswrite('workspace',n1,'Fogliol','B4')

xlswrite('workspace',{'OUTPUT'},'Fogliol','A7')
xlswrite('workspace',{'No. Foto'},'Fogliol','A8')
xlswrite('workspace',{'NrNuclei'},'Fogliol','B8')
xlswrite('workspace',{'NrGFP'},'Fogliol','C8')
xlswrite('workspace',{'Conc (cell/mm2)'},'Fogliol','D8')
xlswrite('workspace',{'Efficiency (%)'},'Fogliol','E8')

NrNuclei = NrNuclei';
NrGFP = NrGFP';
Conc = Conc';
Efficiency = Efficiency';
NrFoto = [1:Num_foto]';

xlswrite('workspace',NrFoto,'Fogliol','A9')
xlswrite('workspace',NrNuclei,'Fogliol','B9')
xlswrite('workspace',NrGFP,'Fogliol','C9')
xlswrite('workspace',Conc,'Fogliol','D9')
xlswrite('workspace',Efficiency,'Fogliol','E9')

```

```

function J10 = HOECHST(J1,n1)

J2 = adapthisteq(J1,'NBins',512); clear J1
% figure(3); imshow(J2); title('nuclei con contrasto aggiustato');

J3 = im2bw(J2,n1); clear J2
% figure(4); imshow(J3); title('nuclei binaria');

J4 = bwmorph(J3,'clean'); clear J3
J5 = bwmorph(J4,'fill'); clear J4
J6 = bwmorph(J5,'majority'); clear J5
J7 = bwmorph(J6,'clean',Inf); clear J6
% figure(5),imshow(J7); title('nuclei clean, fill, majority');

J8 = bwareaopen(J7,25); clear J7
J9 = bwmorph(J8,'clean',Inf); clear J8
% figure(6),imshow(J9); title ('nuclei eliminazione di piccoli oggetti');

se = strel('disk',1);
J10 = imerode(J9, se);

```

APPENDICE F

In questa appendice viene riportata la tabella che identifica i promotori dei geni target per i quattro fattori di trascrizione utilizzati per quantificare il processo di DNA binding. Nella colonna indicata con INDICE TESI si intende la posizione che il promotore assume nelle figure della tesi che rappresentano il profilo genetico successivo al DNA binding.

Symbol	Accession number	Sox2	Oct4	Klf4	Myc	INDICE TESI	Symbol	Accession number	Sox2	Oct4	Klf4	Myc	INDICE TESI
LOC433801	NM_001013808	target	target	target	target	1	Ankrd10	NM_133971	target	target	target	target	52
OTTMUSG0000010673	NM_001014397	target	target	target	target	2	Dst	NM_134448	target	target	target	target	53
Foxred2	NM_001017983	target	target	target	target	3	Ogt	NM_139144	target	target	target	target	54
Fubp3	NM_001033389	target	target	target	target	4	Tnb3	NM_144554	target	target	target	target	55
Zfp206	NM_001033425	target	target	target	target	5	Cbx7	NM_144811	target	target	target	target	56
MGC117846	NM_001037926	target	target	target	target	6	Wdr79	NM_144824	target	target	target	target	57
Ankrd37	NM_001039562	target	target	target	target	7	1700019D03Rik	NM_144953	target	target	target	target	58
Rarg	NM_001042727	target	target	target	target	8	Dyrk3	NM_145508	target	target	target	target	59
Apoc1	NM_007469	target	target	target	target	9	BC020077	NM_145549	target	target	target	target	60
Slc26a2	NM_007885	target	target	target	target	10	Zfp428	NM_146183	target	target	target	target	61
Max	NM_008558	target	target	target	target	11	Tbc1d13	NM_146252	target	target	target	target	62
Mybl1	NM_008652	target	target	target	target	12	BC038286	NM_170755	target	target	target	target	63
Notch1	NM_008714	target	target	target	target	13	Ccbl1	NM_172404	target	target	target	target	64
Tcfap2c	NM_009335	target	target	target	target	14	Rbbp5	NM_172517	target	target	target	target	65
Tcl1	NM_009337	target	target	target	target	15	Itpk1	NM_172584	target	target	target	target	66
Rnd2	NM_009708	target	target	target	target	16	D14Erd436e	NM_172599	target	target	target	target	67
Fn1	NM_010233	target	target	target	target	17	2310044G17Rik	NM_173735	target	target	target	target	68
H2afx	NM_010436	target	target	target	target	18	Rhof	NM_175092	target	target	target	target	69
Klf9	NM_010638	target	target	target	target	19	Trib3	NM_175093	target	target	target	target	70
Tcea3	NM_011542	target	target	target	target	20	Dido1	NM_175551	target	target	target	target	71
Ubb	NM_011664	target	target	target	target	21	6030445D17Rik	NM_177079	target	target	target	target	72
Zfp13	NM_011747	target	target	target	target	22	Chd9	NM_177224	target	target	target	target	73
Dido1	NM_011805	target	target	target	target	23	Myst2	NM_177619	target	target	target	target	74
Xm2	NM_011917	target	target	target	target	24	Dido1	NM_177852	target	target	target	target	75
Val1	NM_012037	target	target	target	target	25	Slc25a40	NM_178766	target	target	target	target	76
Dbf4	NM_013726	target	target	target	target	26	AW822216	NM_178884	target	target	target	target	77
Slc20a1	NM_015747	target	target	target	target	27	C79267	NM_183148	target	target	target	target	78
Tmem131	NM_018872	target	target	target	target	28	Zbtb40	NM_198248	target	target	target	target	79
Afp7p	NM_019426	target	target	target	target	29	Fbxo27	NM_207238	target	target	target	target	80
Refbp2	NM_019484	target	target	target	target	30	Zfp57	NM_001013745	target	target	target	target	81
Rbm14	NM_019869	target	target	target	target	31	LOC554327	NM_001033118	target	target	target	target	82
Rnf3f1	NM_022988	target	target	target	target	32	Axsl1	NM_001039939	target	target	target	target	83
Rnmnd5b	NM_025346	target	target	target	target	33	Phc1	NM_001042623	target	target	target	target	84
Irgb3bp	NM_026348	target	target	target	target	34	Zfp361	NM_007564	target	target	target	target	85
Pef1	NM_026441	target	target	target	target	35	Cbx1	NM_007622	target	target	target	target	86
1810031K17Rik	NM_026977	target	target	target	target	36	Cd38	NM_007646	target	target	target	target	87
Ppil3	NM_027351	target	target	target	target	37	Cfc1	NM_007685	target	target	target	target	88
Ppil3	NM_027374	target	target	target	target	38	Phc1	NM_007905	target	target	target	target	89
5830411E10Rik	NM_028696	target	target	target	target	39	Ephx2	NM_007940	target	target	target	target	90
Stk40	NM_028800	target	target	target	target	40	Evx1	NM_007966	target	target	target	target	91
5730559C18Rik	NM_028872	target	target	target	target	41	Hoxb13	NM_008267	target	target	target	target	92
4931428F04Rik	NM_028888	target	target	target	target	42	Klf2	NM_008452	target	target	target	target	93
2310003C23Rik	NM_029607	target	target	target	target	43	Pdgfra	NM_008808	target	target	target	target	94
5730590G19Rik	NM_029835	target	target	target	target	44	Pipox	NM_008952	target	target	target	target	95
Ifitm2	NM_030694	target	target	target	target	45	Wntf8a	NM_009290	target	target	target	target	96
Uck2	NM_030724	target	target	target	target	46	T	NM_009309	target	target	target	target	97
Spred1	NM_033524	target	target	target	target	47	Vegfc	NM_009506	target	target	target	target	98
Osr2	NM_054049	target	target	target	target	48	Zfp57	NM_009559	target	target	target	target	99
Zfp704	NM_133218	target	target	target	target	49	Zic2	NM_009574	target	target	target	target	100
Ppp1r15b	NM_133819	target	target	target	target	50	Aox1	NM_009676	target	target	target	target	101
Dst	NM_133833	target	target	target	target	51	Cas2	NM_009814	target	target	target	target	102
Cor6	NM_009835	target	target	target	target	103	4933405K07Rik	NM_028913	target	target	target	target	156
Cdx1	NM_009880	target	target	target	target	104	Arhgap12	NM_029277	target	target	target	target	157
Cst3	NM_009976	target	target	target	target	105	2410137M14Rik	NM_029747	target	target	target	target	158
Dab1	NM_010014	target	target	target	target	106	D11Erd636e	NM_029794	target	target	target	target	159
Lefty1	NM_010094	target	target	target	target	107	Mtss1	NM_144800	target	target	target	target	160
Hck	NM_010407	target	target	target	target	108	Slc39a14	NM_144808	target	target	target	target	161
Hexb	NM_010422	target	target	target	target	109	Rhbdd2	NM_146002	target	target	target	target	162
Il6st	NM_010560	target	target	target	target	110	Pde6a	NM_146086	target	target	target	target	163
Klf3c	NM_010631	target	target	target	target	111	BC024479	NM_146222	target	target	target	target	164
Lrrn2	NM_010732	target	target	target	target	112	Gpr1	NM_146250	target	target	target	target	165
Msh6	NM_010830	target	target	target	target	113	Cobl	NM_172496	target	target	target	target	166
Nck2	NM_010879	target	target	target	target	114	Rif1	NM_175238	target	target	target	target	167
Nfkb1a	NM_010907	target	target	target	target	115	Hod	NM_175606	target	target	target	target	168
Nefl	NM_010910	target	target	target	target	116	Lefty2	NM_177099	target	target	target	target	169
Nkx2-2	NM_010919	target	target	target	target	117	Dab1	NM_177259	target	target	target	target	170
Ptqfrm	NM_011197	target	target	target	target	118	C130021120Rik	NM_177842	target	target	target	target	171
Rest	NM_011263	target	target	target	target	119	Dennd2c	NM_177857	target	target	target	target	172
Rnf12	NM_011276	target	target	target	target	120	Reep3	NM_178606	target	target	target	target	173
Sox13	NM_011439	target	target	target	target	121	Grsf1	NM_178700	target	target	target	target	174
Sox2	NM_011443	target	target	target	target	122	Slc6a1	NM_178703	target	target	target	target	175
Spic	NM_011461	target	target	target	target	123	D630039A03Rik	NM_178727	target	target	target	target	176
Tcfap2a	NM_011547	target	target	target	target	124	Cmtm1	NM_181990	target	target	target	target	177
Tdgp1	NM_011562	target	target	target	target	125	Cmtm1	NM_181990	target	target	target	target	178
Thbs2	NM_011581	target	target	target	target	126	2200001115Rik	NM_183278	target	target	target	target	179
Spy2	NM_011897	target	target	target	target	127	Rbm35a	NM_194055	target	target	target	target	180
Msx2	NM_013601	target	target	target	target	128	Zfp532	NM_207255	target	target	target	target	181
Nodal	NM_013611	target	target	target	target	129	EG330503	NM_001033540	target	target	target	target	182
Pax6	NM_013627	target	target	target	target	130	LOC435970	NM_001034893	target	target	target	target	183
Pou5f1	NM_013633	target	target	target	target	131	Atfp1	NM_007512	target	target	target	target	184
Srpf	NM_013834	target	target	target	target	132	Gad2	NM_008078	target	target	target	target	185
Fbxo15	NM_015798	target	target	target	target	133	Nfn1	NM_008744	target	target	target	target	186
Hnrpdl	NM_016690	target	target	target	target	134	Pip5k1b	NM_008847	target	target	target	target	187
Tmod3	NM_016963	target	target	target	target	135	Vps72	NM_009336	target	target	target	target	188
Amotl2	NM_019764	target	target	target	target	136	Nfe2l2	NM_010902	target	target	target	target	189
Gpa33	NM_021610	target	target	target	target	137	Per2	NM_011066	target	target	target	target	190

Tmem8	NM_021793	target	target	target	.	138	Vdac1	NM_011694	target	target	.	target	191
Jarid2	NM_021878	target	target	target	.	139	Psmb3	NM_011971	target	target	.	target	192
Zic5	NM_022987	target	target	target	.	140	Zfp146	NM_011980	target	target	.	target	193
Sdhb	NM_023374	target	target	target	.	141	Tmeff1	NM_021436	target	target	.	target	194
Tcfcp2l1	NM_023755	target	target	target	.	142	Cdk5rap1	NM_025876	target	target	.	target	195
Prei3	NM_025283	target	target	target	.	143	Taf15	NM_027427	target	target	.	target	196
Stmn2	NM_025285	target	target	target	.	144	Adpgk	NM_028121	target	target	.	target	197
Camk2n1	NM_025451	target	target	target	.	145	Adipor1	NM_028320	target	target	.	target	198
Zwint	NM_025635	target	target	target	.	146	Pcdhgb7	NM_033579	target	target	.	target	199
D11Erd636e	NM_026682	target	target	target	.	147	Pcdhga10	NM_033593	target	target	.	target	200
Iifit1	NM_026820	target	target	target	.	148	Usp48	NM_130879	target	target	.	target	201
150001A10Rik	NM_026886	target	target	target	.	149	Uhrf2	NM_144873	target	target	.	target	202
Mapk11p1	NM_027115	target	target	target	.	150	Dnajc8	NM_172400	target	target	.	target	203
Tbc1d9	NM_027758	target	target	target	.	151	Olfml2a	NM_172854	target	target	.	target	204
Lrrc34	NM_027941	target	target	target	.	152	Lmbrd2	NM_177178	target	target	.	target	205
Nanog	NM_028016	target	target	target	.	153	Slit2	NM_178804	target	target	.	target	206
Sulf2	NM_028072	target	target	target	.	154	AK122525	NM_199028	target	target	.	target	207
Lrrc2	NM_028838	target	target	target	.	155	Ric8b	NM_001013441	target	target	.	target	208
603040C04Rik	NM_001015099	target	target	target	.	209	Mups23	NM_024174	target	target	.	target	260
Nufip2	NM_001024205	target	target	target	.	210	Ndufb3	NM_025597	target	target	.	target	261
MGC99845	NM_001025382	target	target	target	.	211	Nrap	NM_025980	target	target	.	target	262
Slc9a2	NM_001033289	target	target	target	.	212	Zcrb1	NM_026025	target	target	.	target	263
Hs6st2	NM_001077202	target	target	target	.	213	2700062C07Rik	NM_026529	target	target	.	target	264
Slc7a3	NM_007515	target	target	target	.	214	Rfx4	NM_027689	target	target	.	target	265
Bcl2a1d	NM_007536	target	target	target	.	215	1200006F02Rik	NM_027872	target	target	.	target	266
Sirpa	NM_007547	target	target	target	.	216	D5Erd6585e	NM_027922	target	target	.	target	267
Cdk4	NM_007674	target	target	target	.	217	Fundc1	NM_028058	target	target	.	target	268
Dil1	NM_007865	target	target	target	.	218	Pmpcb	NM_028431	target	target	.	target	269
Edn2	NM_007902	target	target	target	.	219	4933403G14Rik	NM_028908	target	target	.	target	270
Gjb3	NM_008126	target	target	target	.	220	Rab4b	NM_029391	target	target	.	target	271
Hoxb1	NM_008266	target	target	target	.	221	Tnm34	NM_030684	target	target	.	target	272
Sypl2	NM_008596	target	target	target	.	222	Ren1	NM_031192	target	target	.	target	273
Etv4	NM_008815	target	target	target	.	223	Ren2	NM_031193	target	target	.	target	274
Ptch1	NM_008957	target	target	target	.	224	Tssk3	NM_080442	target	target	.	target	275
Stpd	NM_009160	target	target	target	.	225	Ankrd6	NM_080471	target	target	.	target	276
Sms	NM_009214	target	target	target	.	226	Il17rd	NM_134437	target	target	.	target	277
Stag1	NM_009282	target	target	target	.	227	Dppa3	NM_139218	target	target	.	target	278
Tcf7	NM_009331	target	target	target	.	228	Camk1g	NM_144817	target	target	.	target	279
Nrsn1	NM_009513	target	target	target	.	229	Pphn1	NM_146062	target	target	.	target	280
Zfp64	NM_009564	target	target	target	.	230	Liph	NM_153404	target	target	.	target	281
Arsa	NM_009713	target	target	target	.	231	Suhw3	NM_153532	target	target	.	target	282
Cdk5r2	NM_009872	target	target	target	.	232	C230093N12Rik	NM_153560	target	target	.	target	283
Dkk1	NM_010051	target	target	target	.	233	BC049806	NM_172513	target	target	.	target	284
Ebf3	NM_010096	target	target	target	.	234	D18Erd653e	NM_172631	target	target	.	target	285
Eya1	NM_010164	target	target	target	.	235	Mapk4	NM_172632	target	target	.	target	286
Gair2	NM_010254	target	target	target	.	236	Epc2	NM_172663	target	target	.	target	287
Pdnp	NM_010329	target	target	target	.	237	Otop1	NM_172709	target	target	.	target	288
Il10	NM_010548	target	target	target	.	238	Plekha7	NM_172743	target	target	.	target	289
Grap2	NM_010815	target	target	target	.	239	8430417A20Rik	NM_175209	target	target	.	target	290
Neurog1	NM_010896	target	target	target	.	240	Pphn1	NM_175363	target	target	.	target	291
Pax9	NM_011041	target	target	target	.	241	Btm2a2	NM_175938	target	target	.	target	292
Sema6c	NM_011351	target	target	target	.	242	A730055C05Rik	NM_177392	target	target	.	target	293
Srms	NM_011481	target	target	target	.	243	Hist1h2an	NM_178184	target	target	.	target	294
Plscr1	NM_011636	target	target	target	.	244	Hist1h2bp	NM_178202	target	target	.	target	295
Gadd45g	NM_011817	target	target	target	.	245	Hist1h3i	NM_178207	target	target	.	target	296
Odz4	NM_011858	target	target	target	.	246	Hist3h2a	NM_178218	target	target	.	target	297
Slc27a2	NM_011978	target	target	target	.	247	Lrrtm3	NM_178678	target	target	.	target	298
Cops4	NM_012001	target	target	target	.	248	4933426M11Rik	NM_178682	target	target	.	target	299
Lrap1	NM_013587	target	target	target	.	249	4932441K18Rik	NM_178935	target	target	.	target	300
Trp53bp1	NM_013735	target	target	target	.	250	Ric8b	NM_183172	target	target	.	target	301
Ror1	NM_013845	target	target	target	.	251	Adipor2	NM_197985	target	target	.	target	302
Hs6st2	NM_015819	target	target	target	.	252	Phactr1	NM_198419	target	target	.	target	303
Hnrpu	NM_016805	target	target	target	.	253	BC051628	NM_199312	target	target	.	target	304
Msln	NM_018857	target	target	target	.	254	Prrt8	NM_201371	target	target	.	target	305
Mia1	NM_019394	target	target	target	.	255	Fgfr2	NM_201601	target	target	.	target	306
Acpe6	NM_019800	target	target	target	.	256	Hist3h2bb	NM_206882	target	target	.	target	307
Pdofc	NM_019971	target	target	target	.	257	H2afy2	NM_207000	target	target	.	target	308
Hist1h1b	NM_020034	target	target	target	.	258	2310073E15Rik	NM_001025588	target	target	target	target	309
Etv5	NM_023794	target	target	target	.	259	Baiap2	NM_001037754	target	target	target	target	310
Baiap2	NM_001037755	target	target	target	target	311	Cbx3	NM_007624	target	target	target	target	312
Eef2k	NM_007908	target	target	target	target	313	Ptges2	NM_133783	target	target	target	target	364
Mcl1	NM_008562	target	target	target	target	314	Lyp1a3	NM_133792	target	target	target	target	365
Slc3a2	NM_008577	target	target	target	target	315	Xpo1	NM_134014	target	target	target	target	366
Laptm4a	NM_008640	target	target	target	target	316	Slc25a36	NM_138756	target	target	target	target	367
Nid2	NM_008695	target	target	target	target	317	Mill6	NM_139311	target	target	target	target	368
Ptma	NM_008972	target	target	target	target	318	Abhd11	NM_145215	target	target	target	target	369
Scd2	NM_009128	target	target	target	target	319	Slc25a1	NM_153150	target	target	target	target	370
Clpb	NM_009191	target	target	target	target	320	Dars2	NM_172644	target	target	target	target	371
Trim25	NM_009546	target	target	target	target	321	Fbxl19	NM_172748	target	target	target	target	372
Anp32a	NM_009672	target	target	target	target	322	Lncep	NM_172827	target	target	target	target	373
Atp1b1	NM_009721	target	target	target	target	323	Ccbl2	NM_173763	target	target	target	target	374
Gna13	NM_010303	target	target	target	target	324	Slc6a15	NM_175328	target	target	target	target	375
Hspa9a	NM_010481	target	target	target	target	325	Prr11	NM_175563	target	target	target	target	376
Mnt	NM_010813	target	target	target	target	326	Abcc5	NM_176839	target	target	target	target	377
Cxcl12	NM_013655	target	target	target	target	327	9630033F20Rik	NM_177003	target	target	target	target	378
Rnf10	NM_016698	target	target	target	target	328	6030490I01Rik	NM_177359	target	target	target	target	379
Hnrpa2b1	NM_016806	target	target	target	target	329	6720458F09Rik	NM_177374	target	target	target	target	380
Hs3st3b1	NM_018805	target	target	target	target	330	D83005J010Rik	NM_178264	target	target	target	target	381
Dnajb1	NM_018808	target	target	target	target	331	E430028B21Rik	NM_178668	target	target	target	target	382
Ywhag	NM_018871	target	target	target	target	332	Ckap2l	NM_181589	target	target	target	target	383
Mir16	NM_019580	target	target	target	target	333	Hnrpa2b1	NM_182650	target	target	target	target	384
Stmn1	NM_019641	target	target	target	target	334	6330503K22Rik	NM_182995	target	target	target	target	385
Rybp	NM_019743	target	target	target	target	335	Tpm4	NM_001001491	target	target	target	target	386
Mllt11	NM_019914	target	target	target	target	336	Mpz11	NM_001001880	target	target	target	target	387
Ripk3	NM_019955	target	target	target	target	337	Rtn3	NM_001003934	target	target	target	target	388
Kit	NM_021099	target	target	target	target	338	Shf	NM_001013829	target	target	target	target	389
Ckb	NM_021273	target	target	target	target	339	Otud7b	NM_001025614	target	target	target	target	390
Chml	NM_021350	target	target	target	target	340	Unc13a	NM_001029873	target	target	target	target	391
Sertad2	NM_021372	target	target	target	target	341	AU023871	NM_001033221	target	target	target	target	392
Rgs20	NM_021374	target	target	target	target	342	9630014M24Rik	NM_001033771	target	target	target	target	393
Eno1	NM_023119	target	target	target	target	343	Tomn40l	NM_001037170	target	target	target	target	394
4733401H18Rik	NM_023247	target	target	target	target	344	Arnt	NM_001037737	target	target	target	target	395
Mesdc2	NM_023403	target	target	target	target	345	Bmp4	NM_007554	target	target	target	target	396
1110001A07Rik	NM_025377	target	target	target	target	346	Cxcr7	NM_007722	target	target	target	target	397
Dalrd3	NM_026378	target	target	target	target	347	Csrp1	NM_007791	target	target	target	target	398
Coq5	NM_026504	target	target	target	target	348	Epha4	NM_007936	target	target	target	target	399
Tmbim4	NM_026617	target	target	target	target	349	Mtap1b	NM_008634	target	target	target	target	400
Cenpl	NM_027429	target	target	target	target	350	Nqo1	NM_008706	target	target	target	target	401
Hmha1	NM_027521	target	target	target	target	351	Pde8a	NM_008803	target	target	target	target	402

Pdia5	NM_028295	target	.	target	target	352	Rae1a	NM_009016	target	.	target	.	403
2810030E01Rik	NM_028317	target	.	target	target	353	Rcn1	NM_009037	target	.	target	.	404
Tmem48	NM_028355	target	.	target	target	354	Rdx	NM_009041	target	.	target	.	405
Irak3	NM_028679	target	.	target	target	355	Spp1	NM_009263	target	.	target	.	406
Gqa2	NM_028758	target	.	target	target	356	Src	NM_009271	target	.	target	.	407
Zc3hav1	NM_028864	target	.	target	target	357	Tiam1	NM_009384	target	.	target	.	408
Raf1	NM_029780	target	.	target	target	358	Tpd52	NM_009412	target	.	target	.	409
Mesd1	NM_030705	target	.	target	target	359	Upp1	NM_009477	target	.	target	.	410
Nolc1	NM_053086	target	.	target	target	360	Adam19	NM_009616	target	.	target	.	411
Trim8	NM_053100	target	.	target	target	361	Aqtrap	NM_009642	target	.	target	.	412
Rpl31	NM_053257	target	.	target	target	362	Arnt	NM_009709	target	.	target	.	413
Adcy4	NM_080435	target	.	target	target	363	Cdkn1b	NM_009875	target	.	target	.	414
Col4a2	NM_009932	target	.	target	.	415	Bmf	NM_138313	target	.	target	.	467
Ephb3	NM_010143	target	.	target	.	416	Tmem40	NM_144805	target	.	target	.	468
Gbx2	NM_010262	target	.	target	.	417	Ox2	NM_144841	target	.	target	.	469
Gtf2i	NM_010365	target	.	target	.	418	Brwd1	NM_145125	target	.	target	.	470
Foxd3	NM_010425	target	.	target	.	419	Mzf1	NM_145819	target	.	target	.	471
Cyr61	NM_010516	target	.	target	.	420	Cables2	NM_145851	target	.	target	.	472
Jak3	NM_010589	target	.	target	.	421	Cables2	NM_145851	target	.	target	.	473
Jup	NM_010593	target	.	target	.	422	Porcn	NM_145908	target	.	target	.	474
Nfatc3	NM_010901	target	.	target	.	423	D15Erd621e	NM_145959	target	.	target	.	475
Notch4	NM_010929	target	.	target	.	424	Arhgap28	NM_172964	target	.	target	.	476
Psen2	NM_011183	target	.	target	.	425	Dcun1d3	NM_173408	target	.	target	.	477
Rab20	NM_011227	target	.	target	.	426	Tmem177	NM_175106	target	.	target	.	478
Six2	NM_011380	target	.	target	.	427	P2ry5	NM_175116	target	.	target	.	479
Eif1	NM_011508	target	.	target	.	428	Slc38a2	NM_175121	target	.	target	.	480
Tip2	NM_011597	target	.	target	.	429	Sall4	NM_175303	target	.	target	.	481
Spry4	NM_011898	target	.	target	.	430	Tspan9	NM_175414	target	.	target	.	482
Apoa2	NM_013474	target	.	target	.	431	Ccdc38	NM_175488	target	.	target	.	483
Cpt1a	NM_013495	target	.	target	.	432	1110014K08Rik	NM_176902	target	.	target	.	484
Peg12	NM_013788	target	.	target	.	433	Islr2	NM_177193	target	.	target	.	485
Ly75	NM_013825	target	.	target	.	434	Samm50	NM_178614	target	.	target	.	486
Rax	NM_013833	target	.	target	.	435	Gprc5a	NM_181444	target	.	target	.	487
Shroom3	NM_015756	target	.	target	.	436	Tbx3	NM_198052	target	.	target	.	488
Hsfat1	NM_015818	target	.	target	.	437	D14Erd668e	NM_199015	target	.	target	.	489
Mybph	NM_016749	target	.	target	.	438	Sall4	NM_201396	target	.	target	.	490
Olig2	NM_016867	target	.	target	.	439	Krt42	NM_212483	target	.	target	.	491
Dll4	NM_019454	target	.	target	.	440	Gm1019	NM_001001650	target	.	target	.	492
Wsb1	NM_019653	target	.	target	.	441	Smg7	NM_001005507	target	.	target	.	493
Dynll1	NM_019882	target	.	target	.	442	Mtus1	NM_001005863	target	.	target	.	494
Foxb1	NM_022378	target	.	target	.	443	Thoc6	NM_001008425	target	.	target	.	495
Slc13a2	NM_022411	target	.	target	.	444	Ntrk2	NM_001025074	target	.	target	.	496
Dpys	NM_022722	target	.	target	.	445	Kihl21	NM_001033352	target	.	target	.	497
Tubb3	NM_023279	target	.	target	.	446	LOC192758	NM_001045516	target	.	target	.	498
Rprm	NM_023396	target	.	target	.	447	Akp2	NM_007431	target	.	target	.	499
Ly6g6c	NM_023463	target	.	target	.	448	Rhob	NM_007483	target	.	target	.	500
Tubb2b	NM_023716	target	.	target	.	449	Fasn	NM_007988	target	.	target	.	501
2700038C09Rik	NM_025598	target	.	target	.	450	Gdf3	NM_008108	target	.	target	.	502
Mprbp1	NM_025836	target	.	target	.	451	H3f3b	NM_008211	target	.	target	.	503
6330407J23Rik	NM_026138	target	.	target	.	452	Hsp90ab1	NM_008302	target	.	target	.	504
Echdc2	NM_026728	target	.	target	.	453	Impact	NM_008378	target	.	target	.	505
D4Bwg0951e	NM_026821	target	.	target	.	454	Ly6e	NM_008529	target	.	target	.	506
Pdcl3	NM_026850	target	.	target	.	455	Ntrk2	NM_008745	target	.	target	.	507
Spats1	NM_027649	target	.	target	.	456	Rpl37a	NM_009084	target	.	target	.	508
Susd2	NM_027890	target	.	target	.	457	Tial1	NM_009383	target	.	target	.	509
Snx10	NM_028035	target	.	target	.	458	Vav2	NM_009500	target	.	target	.	510
4930430E16Rik	NM_028672	target	.	target	.	459	Ehd1	NM_010119	target	.	target	.	511
Lymr1	NM_029610	target	.	target	.	460	Fem1a	NM_010192	target	.	target	.	512
Parp6	NM_029922	target	.	target	.	461	Gja1	NM_010288	target	.	target	.	513
Tb1lxr1	NM_030732	target	.	target	.	462	Gsta4	NM_010357	target	.	target	.	514
Spred2	NM_033523	target	.	target	.	463	Hira	NM_010435	target	.	target	.	515
Rtn3	NM_053076	target	.	target	.	464	Mllt10	NM_010804	target	.	target	.	516
Slc15a1	NM_053079	target	.	target	.	465	Cited2	NM_010828	target	.	target	.	517
Elmo1	NM_080288	target	.	target	.	466	Mrp140	NM_010922	target	.	target	.	518
Srsbia1	NM_011374	target	.	.	target	519	Zfp553	NM_146201	target	.	target	.	571
Tcea1	NM_011541	target	.	.	target	520	Zfp263	NM_148924	target	.	target	.	572
Tex264	NM_011573	target	.	.	target	521	Cnot10	NM_153585	target	.	target	.	573
Zfp148	NM_011749	target	.	.	target	522	Pddc1	NM_172116	target	.	target	.	574
Cdca3	NM_013538	target	.	.	target	523	Zc3h5	NM_172569	target	.	target	.	575
Hmmr	NM_013552	target	.	.	target	524	Fem1c	NM_173423	target	.	target	.	576
Usp5	NM_013700	target	.	.	target	525	Stk36	NM_175031	target	.	target	.	577
Ihpk1	NM_013785	target	.	.	target	526	Zfp689	NM_175163	target	.	target	.	578
Rhoa	NM_016802	target	.	.	target	527	2810410C14Rik	NM_175471	target	.	target	.	579
Insm1	NM_016889	target	.	.	target	528	Hnrp1	NM_177301	target	.	target	.	580
Cldn6	NM_018777	target	.	.	target	529	Tnpo1	NM_178716	target	.	target	.	581
Dscr1	NM_019466	target	.	.	target	530	Zfp184	NM_183014	target	.	target	.	582
Arl2	NM_019722	target	.	.	target	531	BC003885	NM_198609	target	.	target	.	583
Rnf25	NM_021313	target	.	.	target	532	Ccdc58	NM_198645	target	.	target	.	584
Pps1	NM_021463	target	.	.	target	533	Rpl23a	NM_207523	target	.	target	.	585
Abcb6	NM_023732	target	.	.	target	534	Ccdc111	NM_001001184	target	.	target	.	586
Lrrc40	NM_024194	target	.	.	target	535	Tacc2	NM_001004468	target	.	target	.	587
Mrp137	NM_025500	target	.	.	target	536	Mcart1	NM_001009949	target	.	target	.	588
Rbm4b	NM_025717	target	.	.	target	537	AA388235	NM_001013793	target	.	target	.	589
Mmachc	NM_025962	target	.	.	target	538	Ear4	NM_001017422	target	.	target	.	590
Rps10	NM_025963	target	.	.	target	539	Sp3	NM_001018042	target	.	target	.	591
Ccdc53	NM_026070	target	.	.	target	540	Rfx4	NM_001024918	target	.	target	.	592
Ddx56	NM_026538	target	.	.	target	541	Slc16a6	NM_001029842	target	.	target	.	593
Bivra	NM_026678	target	.	.	target	542	Bglap2	NM_001032298	target	.	target	.	594
0610037D15Rik	NM_026714	target	.	.	target	543	Abhd9	NM_001033163	target	.	target	.	595
Ddah1	NM_026993	target	.	.	target	544	Itga1	NM_001033228	target	.	target	.	596
Nup35	NM_027091	target	.	.	target	545	Hk3	NM_001033245	target	.	target	.	597
Sfxn1	NM_027324	target	.	.	target	546	Ccdc131	NM_001033261	target	.	target	.	598
2310056P07Rik	NM_027342	target	.	.	target	547	G630016D24Rik	NM_001033805	target	.	target	.	599
2600003E23Rik	NM_027373	target	.	.	target	548	Sorbs1	NM_001034963	target	.	target	.	600
4931417G12Rik	NM_027633	target	.	.	target	549	Mobb	NM_001039364	target	.	target	.	601
2400003C14Rik	NM_028018	target	.	.	target	550	Pcdh8	NM_001042726	target	.	target	.	602
Plxdc1	NM_028199	target	.	.	target	551	Cerkl	NM_001048176	target	.	target	.	603
Zfp131	NM_028245	target	.	.	target	552	Nrp2	NM_001077404	target	.	target	.	604
Sdcca9	NM_029756	target	.	.	target	553	Nrp2	NM_001077405	target	.	target	.	605
Mett5d1	NM_029790	target	.	.	target	554	Nrp2	NM_001077406	target	.	target	.	606
Apobec1	NM_031159	target	.	.	target	555	Nrp2	NM_001077407	target	.	target	.	607
Rab34	NM_033475	target	.	.	target	556	Nr0b1	NM_007430	target	.	target	.	608
Prcc	NM_033573	target	.	.	target	557	Ang1	NM_007447	target	.	target	.	609
Kcnn2	NM_080465	target	.	.	target	558	Ang2	NM_007449	target	.	target	.	610
Scrl1	NM_130893	target	.	.	target	559	Calb2	NM_007586	target	.	target	.	611
6720456B07Rik	NM_133937	target	.	.	target	560	Car3	NM_007606	target	.	target	.	612
Kif18a	NM_139303	target	.	.	target	561	Cttnb1	NM_007614	target	.	target	.	613
Ccdc28a	NM_144820	target	.	.	target	562	Scarb2	NM_007644	target	.	target	.	614
Sesn2	NM_144907	target	.	.	target	563	Socs3	NM_007707	target	.	target	.	615

Ppil2	NM_144954	target	.	.	target	564	Enc1	NM_007930	target	.	.	.	616
Wasf3	NM_145155	target	.	.	target	565	Etv1	NM_007960	target	.	.	.	617
Rpp40	NM_145938	target	.	.	target	566	Gna14	NM_008137	target	.	.	.	618
Flcn	NM_146018	target	.	.	target	567	Gpc4	NM_008150	target	.	.	.	619
Ankmy2	NM_146033	target	.	.	target	568	Gpr19	NM_008157	target	.	.	.	620
Sfrs7	NM_146083	target	.	.	target	569	Hmgcr	NM_008255	target	.	.	.	621
Pbxip1	NM_146131	target	.	.	target	570	Onecut1	NM_008262	target	.	.	.	622
Idua	NM_008325	target	.	.	.	623	Tfpi	NM_011576	target	.	.	.	625
Igfbp2	NM_008342	target	.	.	.	624	Ube1c	NM_011666	target	.	.	.	626
Lama1	NM_008480	target	.	.	.	625	Vim	NM_011701	target	.	.	.	627
Ldhd	NM_008492	target	.	.	.	626	Zfp27	NM_011754	target	.	.	.	628
Smad6	NM_008542	target	.	.	.	627	Dnmt1	NM_011806	target	.	.	.	629
Man1a	NM_008548	target	.	.	.	628	Ubi3	NM_011908	target	.	.	.	630
Mme	NM_008604	target	.	.	.	629	Abcg2	NM_011920	target	.	.	.	631
Mobp	NM_008614	target	.	.	.	630	Sema4g	NM_011976	target	.	.	.	632
Mras	NM_008624	target	.	.	.	631	Dpysl4	NM_011993	target	.	.	.	633
Nbr1	NM_008676	target	.	.	.	632	Acot1	NM_012006	target	.	.	.	634
Mycn	NM_008709	target	.	.	.	633	Zw10	NM_012039	target	.	.	.	635
Pkia	NM_008862	target	.	.	.	634	Anxa11	NM_013469	target	.	.	.	636
Prim2	NM_008922	target	.	.	.	635	Muc1	NM_013605	target	.	.	.	637
Abcd4	NM_008992	target	.	.	.	636	Ninj1	NM_013610	target	.	.	.	638
Rbbp7	NM_009031	target	.	.	.	637	Dusp1	NM_013642	target	.	.	.	639
Sparc	NM_009242	target	.	.	.	638	Tnfrsf12a	NM_013749	target	.	.	.	640
Spink3	NM_009258	target	.	.	.	639	Jag1	NM_013822	target	.	.	.	641
Tecta	NM_009347	target	.	.	.	640	Mif2	NM_013827	target	.	.	.	642
Ugdh	NM_009466	target	.	.	.	641	Dkk3	NM_015814	target	.	.	.	643
Zscan2	NM_009553	target	.	.	.	642	Pdlim1	NM_016861	target	.	.	.	644
Abcg1	NM_009593	target	.	.	.	643	Ear14	NM_017389	target	.	.	.	645
Ap2m1	NM_009679	target	.	.	.	644	Fabp1	NM_017399	target	.	.	.	646
Brcr1	NM_009764	target	.	.	.	645	Arc	NM_018790	target	.	.	.	647
Cacna2d1	NM_009784	target	.	.	.	646	Pif1a	NM_018809	target	.	.	.	648
Cacybp	NM_009786	target	.	.	.	647	Smarca1	NM_018817	target	.	.	.	649
Casp3	NM_009810	target	.	.	.	648	Cyp39a1	NM_018887	target	.	.	.	650
Cckar	NM_009827	target	.	.	.	649	B4gal6	NM_019737	target	.	.	.	651
Cd24a	NM_009846	target	.	.	.	650	Tagln3	NM_019754	target	.	.	.	652
Sparc1	NM_010037	target	.	.	.	651	lvd	NM_019826	target	.	.	.	653
Ecn1	NM_010104	target	.	.	.	652	Hhip	NM_020259	target	.	.	.	654
Enah	NM_010135	target	.	.	.	653	Tbx20	NM_020496	target	.	.	.	655
Fgf4	NM_010202	target	.	.	.	654	Sez6	NM_021286	target	.	.	.	656
Ctgf	NM_010217	target	.	.	.	655	C030019F02Rik	NM_021426	target	.	.	.	657
Fos	NM_010234	target	.	.	.	656	Rnase4	NM_021472	target	.	.	.	658
Gfra1	NM_010279	target	.	.	.	657	Pcdh8	NM_021543	target	.	.	.	659
Gsc	NM_010351	target	.	.	.	658	Trp53inp1	NM_021897	target	.	.	.	660
Hesx1	NM_010420	target	.	.	.	659	Arl6ip5	NM_022992	target	.	.	.	661
Id1	NM_010495	target	.	.	.	660	Twsq1	NM_023053	target	.	.	.	662
Lmo4	NM_010723	target	.	.	.	661	Pbk	NM_023209	target	.	.	.	663
Msc	NM_010827	target	.	.	.	662	Mageh1	NM_023788	target	.	.	.	664
Nhh1	NM_010916	target	.	.	.	663	Crip2	NM_024223	target	.	.	.	665
Cox4nb	NM_010926	target	.	.	.	664	Hsd1l	NM_024255	target	.	.	.	666
Nrp2	NM_010939	target	.	.	.	665	Txndc12	NM_025334	target	.	.	.	667
Numbl	NM_010950	target	.	.	.	666	Tmem57	NM_025382	target	.	.	.	668
Pax7	NM_011039	target	.	.	.	667	1110059P08Rik	NM_025418	target	.	.	.	669
Pdpk1	NM_011062	target	.	.	.	668	1810021J13Rik	NM_025464	target	.	.	.	670
Ppm1b	NM_011151	target	.	.	.	669	Thap2	NM_025780	target	.	.	.	671
Rgs16	NM_011267	target	.	.	.	670	Pccb	NM_025835	target	.	.	.	672
Ccl1	NM_011329	target	.	.	.	671	Zcchc18	NM_025893	target	.	.	.	673
Sp3	NM_011450	target	.	.	.	672	Pncr2	NM_026383	target	.	.	.	674
Stat5a	NM_011488	target	.	.	.	673	Pllp	NM_026385	target	.	.	.	675
Tbxas1	NM_011539	target	.	.	.	674	Ufm1	NM_026435	target	.	.	.	676
E130307M08Rik	NM_026530	target	.	.	.	677	Cpne2	NM_153507	target	.	.	.	677
Eta1	NM_026576	target	.	.	.	678	Scgb3a1	NM_170727	target	.	.	.	678
Gstm7	NM_026672	target	.	.	.	679	Sulf1	NM_172294	target	.	.	.	679
1110007C09Rik	NM_026738	target	.	.	.	680	Mbtips2	NM_172307	target	.	.	.	680
Dus11	NM_026824	target	.	.	.	681	4831426119Rik	NM_172500	target	.	.	.	681
Mct5	NM_026902	target	.	.	.	682	Zswim4	NM_172503	target	.	.	.	682
Pin4	NM_027181	target	.	.	.	683	Serinc5	NM_172588	target	.	.	.	683
Btf3l4	NM_027453	target	.	.	.	684	Ankrd52	NM_172790	target	.	.	.	684
Hexim2	NM_027658	target	.	.	.	685	Pcyox11	NM_172832	target	.	.	.	685
Tha1	NM_027919	target	.	.	.	686	Slco5a1	NM_172841	target	.	.	.	686
Nkiras2	NM_028024	target	.	.	.	687	A230079K17Rik	NM_172846	target	.	.	.	687
Zswim1	NM_028028	target	.	.	.	688	Mtmr12	NM_172958	target	.	.	.	688
Brl1	NM_028193	target	.	.	.	689	Phtf2	NM_172992	target	.	.	.	689
Bbs5	NM_028284	target	.	.	.	690	Ythdf1	NM_173761	target	.	.	.	690
Phospho2	NM_028521	target	.	.	.	691	Kih15	NM_175174	target	.	.	.	691
Slc25a27	NM_028711	target	.	.	.	692	1700013E18Rik	NM_175176	target	.	.	.	692
2300002G24Rik	NM_028798	target	.	.	.	693	B630005N14Rik	NM_175312	target	.	.	.	693
Pagr8	NM_028829	target	.	.	.	694	A2m	NM_175628	target	.	.	.	694
Lrrc15	NM_028973	target	.	.	.	695	Lrig3	NM_177152	target	.	.	.	695
Tmem180	NM_029186	target	.	.	.	696	Casc1	NM_177222	target	.	.	.	696
Ndp52	NM_029755	target	.	.	.	697	Slc26a9	NM_177243	target	.	.	.	697
Ni5c2	NM_029810	target	.	.	.	698	Tmem60	NM_177601	target	.	.	.	698
493051H11Rik	NM_030025	target	.	.	.	699	Pdzd7	NM_177605	target	.	.	.	699
Armcx1	NM_030066	target	.	.	.	700	E030013G06Rik	NM_177697	target	.	.	.	700
Crispld2	NM_030209	target	.	.	.	701	Ccdc60	NM_177759	target	.	.	.	701
Sesn3	NM_030261	target	.	.	.	702	Frs2	NM_177798	target	.	.	.	702
Vangl2	NM_033509	target	.	.	.	703	Otop1	NM_178139	target	.	.	.	703
Ah14	NM_033565	target	.	.	.	704	Mbtips2	NM_178266	target	.	.	.	704
Pcdhga1	NM_033584	target	.	.	.	705	Flrt3	NM_178382	target	.	.	.	705
Olig3	NM_053008	target	.	.	.	706	BC051244	NM_178413	target	.	.	.	706
Dpf3	NM_058212	target	.	.	.	707	Kih2	NM_178633	target	.	.	.	707
Ppap2b	NM_080555	target	.	.	.	708	Pkn2	NM_178654	target	.	.	.	708
Tir3	NM_126166	target	.	.	.	709	Lpp	NM_178865	target	.	.	.	709
Nxph3	NM_130858	target	.	.	.	710	Trnm36	NM_178872	target	.	.	.	710
Gsh2	NM_133256	target	.	.	.	711	4930479M11Rik	NM_183108	target	.	.	.	711
Lymr5	NM_133688	target	.	.	.	712	Rnf182	NM_183204	target	.	.	.	712
Bsdc1	NM_133889	target	.	.	.	713	Tspan15	NM_197996	target	.	.	.	713
Plekha1	NM_133942	target	.	.	.	714	Cdh24	NM_199470	target	.	.	.	714
Numa1	NM_133947	target	.	.	.	715	Rnase4	NM_201239	target	.	.	.	715
Enpp3	NM_134005	target	.	.	.	716	Tacc2	NM_206856	target	.	.	.	716
Tmed4	NM_134020	target	.	.	.	717	Hdac4	NM_207225	target	.	.	.	717
Slc16a6	NM_134038	target	.	.	.	718	Gapdh	NM_001001303	target	target	target	target	718
Stk38	NM_134115	target	.	.	.	719	LOC380687	NM_001001978	target	target	target	target	719
Socs7	NM_138657	target	.	.	.	720	Gpr139	NM_001024138	target	target	target	target	720
Shkbp1	NM_138676	target	.	.	.	721	Zmynd15	NM_001029929	target	target	target	target	721
Hip1r	NM_145070	target	.	.	.	722	Zfp408	NM_001033451	target	target	target	target	722
BC008155	NM_145410	target	.	.	.	723	9030025P20Rik	NM_001039552	target	target	target	target	723
BC005471	NM_145612	target	.	.	.	724	Tacc3	NM_001040435	target	target	target	target	724
AA536743	NM_145923	target	.	.	.	725	Cbx5	NM_001076789	target	target	target	target	725
AW049765	NM_145934	target	.	.	.	726	Amh	NM_007445	target	target	target	target	726

Zdhc14	NM_146073	target	.	.	.	777	Birc6	NM_007566	.	target	target	target	829
Serpin6c	NM_148942	target	.	.	.	778	Socs2	NM_007706	.	target	target	target	830
Cox5a	NM_007747	.	target	target	target	831	D6Wsu116e	NM_026585	.	target	target	target	883
Ddx5	NM_007840	.	target	target	target	832	Tmem129	NM_026698	.	target	target	target	884
LOC14433	NM_008084	.	target	target	target	833	Rpain	NM_027186	.	target	target	target	885
Alad	NM_008525	.	target	target	target	834	2810422O20Rik	NM_027279	.	target	target	target	886
Nedd8	NM_008683	.	target	target	target	835	Polr3b	NM_027423	.	target	target	target	887
Pim1	NM_008842	.	target	target	target	836	5730494N06Rik	NM_027478	.	target	target	target	888
Ptch2	NM_008958	.	target	target	target	837	Zfp655	NM_028298	.	target	target	target	889
Sfip	NM_009193	.	target	target	target	838	Tmem168	NM_028990	.	target	target	target	890
Surf6	NM_009298	.	target	target	target	839	Lenq4	NM_029934	.	target	target	target	891
Tqif	NM_009372	.	target	target	target	840	Zfp687	NM_030074	.	target	target	target	892
Tnfrap1	NM_009395	.	target	target	target	841	Cnih4	NM_030131	.	target	target	target	893
Slc30a1	NM_009579	.	target	target	target	842	Derf2	NM_033562	.	target	target	target	894
Anxa7	NM_009674	.	target	target	target	843	Hps3	NM_080634	.	target	target	target	895
Cct6a	NM_009838	.	target	target	target	844	Hook2	NM_133255	.	target	target	target	896
Hnrpa1	NM_010447	.	target	target	target	845	2310037124Rik	NM_133714	.	target	target	target	897
Hspa1b	NM_010478	.	target	target	target	846	Nol12	NM_133800	.	target	target	target	898
Hspa1a	NM_010479	.	target	target	target	847	Hdlbp	NM_133808	.	target	target	target	899
Id2	NM_010496	.	target	target	target	848	PspH	NM_133900	.	target	target	target	900
O2-set	NM_010891	.	target	target	target	849	Kctd9	NM_134073	.	target	target	target	901
Nek2	NM_010892	.	target	target	target	850	Gmpr2	NM_134075	.	target	target	target	902
Pcna	NM_011045	.	target	target	target	851	Dak	NM_145496	.	target	target	target	903
Slc12a7	NM_011390	.	target	target	target	852	Tipr1	NM_145513	.	target	target	target	904
Tacc3	NM_011524	.	target	target	target	853	Zc3h7a	NM_145931	.	target	target	target	905
Capn10	NM_011796	.	target	target	target	854	Tubb2c	NM_146116	.	target	target	target	906
Prdx5	NM_012021	.	target	target	target	855	Arhgap5	NM_146124	.	target	target	target	907
Hspa1l	NM_013558	.	target	target	target	856	E2f4	NM_148952	.	target	target	target	908
Mt1	NM_013602	.	target	target	target	857	Ndufs2	NM_153064	.	target	target	target	909
Sf3a2	NM_013651	.	target	target	target	858	Rbks	NM_153196	.	target	target	target	910
Mga	NM_013720	.	target	target	target	859	Nup88	NM_172394	.	target	target	target	911
Rpl7a	NM_013721	.	target	target	target	860	Adams4	NM_172845	.	target	target	target	912
Dab1	NM_015735	.	target	target	target	861	Zfyve16	NM_173392	.	target	target	target	913
Ifi202	NM_018854	.	target	target	target	862	BC056923	NM_173395	.	target	target	target	914
Pex3	NM_019961	.	target	target	target	863	Nucks1	NM_175294	.	target	target	target	915
Mos	NM_020021	.	target	target	target	864	Ccdc45	NM_177088	.	target	target	target	916
B4galt3	NM_020579	.	target	target	target	865	4933430117Rik	NM_177607	.	target	target	target	917
Slc18a3	NM_021712	.	target	target	target	866	Exoc3l	NM_177788	.	target	target	target	918
Set	NM_023871	.	target	target	target	867	Gmpr2	NM_177992	.	target	target	target	919
Plekhl1	NM_023900	.	target	target	target	868	Hist1h2bl	NM_178199	.	target	target	target	920
Tsen34	NM_024168	.	target	target	target	869	Hist1h2bm	NM_178200	.	target	target	target	921
Mprl3b	NM_024177	.	target	target	target	870	Bre	NM_181282	.	target	target	target	922
Mprl3a	NM_024178	.	target	target	target	871	BC107364	NM_183223	.	target	target	target	923
1110001J03Rik	NM_025363	.	target	target	target	872	1810013C15Rik	NM_194348	.	target	target	target	924
Medf11	NM_025397	.	target	target	target	873	Ppp2r5b	NM_198168	.	target	target	target	925
1810011O16Rik	NM_025456	.	target	target	target	874	BC055324	NM_201364	.	target	target	target	926
Deadc1	NM_025748	.	target	target	target	875	BC050196	NM_201374	.	target	target	target	927
Cdca7	NM_025866	.	target	target	target	876	Grhl3	NM_001013756	.	target	target	target	928
Mis12	NM_025993	.	target	target	target	877	2610301F02Rik	NM_001025576	.	target	target	target	929
Nvl	NM_026171	.	target	target	target	878	D930049A15Rik	NM_001033402	.	target	target	target	930
Dusp6	NM_026268	.	target	target	target	879	Atoh1	NM_007500	.	target	target	target	931
0610038D11Rik	NM_026306	.	target	target	target	880	Bmp8a	NM_007558	.	target	target	target	932
Cdca5	NM_026410	.	target	target	target	881	Cdkn2c	NM_007671	.	target	target	target	933
2610101N10Rik	NM_026476	.	target	target	target	882	Gsh1	NM_008178	.	target	target	target	934
Lamc2	NM_008485	.	target	target	.	935	Rps17	NM_009092	.	target	.	target	987
Lfng	NM_008494	.	target	target	target	936	Sl3gal4	NM_009178	.	target	target	target	988
Zfp42	NM_009556	.	target	target	target	937	Vamp1	NM_009496	.	target	target	target	989
ApoE	NM_009696	.	target	target	target	938	Zmat3	NM_009517	.	target	target	target	990
Capn2	NM_009794	.	target	target	target	939	Cox5b	NM_009942	.	target	target	target	991
Cldn4	NM_009903	.	target	target	target	940	Pcy11a	NM_009981	.	target	target	target	992
Dync112	NM_010064	.	target	target	target	941	Dpm2	NM_010073	.	target	target	target	993
Hoxb4	NM_010459	.	target	target	.	942	Eif3s10	NM_010123	.	target	target	target	994
Hrb	NM_010472	.	target	target	.	943	Ni6a1	NM_010264	.	target	target	target	995
Kcnh3	NM_010601	.	target	target	.	944	Got1	NM_010324	.	target	target	target	996
Mgat3	NM_010795	.	target	target	.	945	Kif15	NM_010620	.	target	target	target	997
Hist1h1c	NM_015786	.	target	target	.	946	Nras	NM_010937	.	target	target	target	998
Dgka	NM_016811	.	target	target	.	947	Orcl1	NM_011015	.	target	target	target	999
Wnt1	NM_021279	.	target	target	.	948	Pex11b	NM_011069	.	target	target	target	1000
Sall1	NM_021390	.	target	target	.	949	Prkcd	NM_011159	.	target	target	target	1001
Ap3b2	NM_021492	.	target	target	.	950	Ptpru	NM_011214	.	target	target	target	1002
Jam2	NM_023844	.	target	target	.	951	Rpl6	NM_011290	.	target	target	target	1003
Oxct1	NM_024188	.	target	target	.	952	Rps12	NM_011295	.	target	target	target	1004
Tcf19	NM_025674	.	target	target	.	953	Rxrip110	NM_011307	.	target	target	target	1005
Mtfr1	NM_026182	.	target	target	.	954	Sox17	NM_011441	.	target	target	target	1006
Tmem50a	NM_027935	.	target	target	.	955	Sic2	NM_011491	.	target	target	target	1007
AW125753	NM_029007	.	target	target	.	956	Stk16	NM_011494	.	target	target	target	1008
Prdm8	NM_029947	.	target	target	.	957	Aurkb	NM_011496	.	target	target	target	1009
Wibg	NM_030100	.	target	target	.	958	Zfp346	NM_012017	.	target	target	target	1010
Nol3	NM_030152	.	target	target	.	959	Eppb9	NM_013717	.	target	target	target	1011
Slc19a3	NM_030556	.	target	target	.	960	Gpc3	NM_016697	.	target	target	target	1012
Gpr124	NM_054044	.	target	target	.	961	Nup50	NM_016714	.	target	target	target	1013
Ath1l	NM_145387	.	target	target	.	962	Uchl3	NM_016723	.	target	target	target	1014
Tmem46	NM_145463	.	target	target	.	963	Uchl3	NM_016723	.	target	target	target	1015
Itfpa	NM_146125	.	target	target	.	964	Atp5j	NM_016755	.	target	target	target	1016
Cchcr1	NM_146248	.	target	target	.	965	Bok	NM_016778	.	target	target	target	1017
Wdr32	NM_153167	.	target	target	.	966	Nudt5	NM_016918	.	target	target	target	1018
2210418O10Rik	NM_172929	.	target	target	.	967	Rpl5	NM_016980	.	target	target	target	1019
2210418O10Rik	NM_172929	.	target	target	.	968	Rpl36	NM_018730	.	target	target	target	1020
Hist1h2bb	NM_175664	.	target	target	.	969	Eef1b2	NM_018796	.	target	target	target	1021
Hist1h2bn	NM_178201	.	target	target	.	970	Rpl41	NM_018860	.	target	target	target	1022
Hist1h4k	NM_178211	.	target	target	.	971	D3Erd300e	NM_019995	.	target	target	target	1023
Rai17	NM_183208	.	target	target	.	972	Lmbr1	NM_020295	.	target	target	target	1024
MGC68323	NM_199472	.	target	target	.	973	Ssca1	NM_020491	.	target	target	target	1025
Zfp187	NM_001013786	.	target	target	target	974	Mpsp31	NM_020560	.	target	target	target	1026
Klhf20	NM_001039482	.	target	target	.	975	A030009H04Rik	NM_020591	.	target	target	target	1027
Tmco1	NM_001039483	.	target	target	.	976	Evc	NM_021292	.	target	target	target	1028
Bxdc1	NM_001042556	.	target	target	.	977	Drg2	NM_021354	.	target	target	target	1029
Cct7	NM_007638	.	target	target	.	978	Pole3	NM_021498	.	target	target	target	1030
Chek1	NM_007691	.	target	target	.	979	Mtvr2	NM_023166	.	target	target	target	1031
Erc1	NM_007948	.	target	target	.	980	Dusp12	NM_023173	.	target	target	target	1032
Gabpa	NM_008065	.	target	target	.	981	Cdc20	NM_023223	.	target	target	target	1033
Gp5	NM_008148	.	target	target	.	982	Ndufa13	NM_023312	.	target	target	target	1034
Hdac2	NM_008229	.	target	target	.	983	Bxdc1	NM_023323	.	target	target	target	1035
Mcm4	NM_008565	.	target	target	.	984	Dut	NM_023595	.	target	target	target	1036
Pik3r2	NM_008841	.	target	target	.	985	Wdr31	NM_023597	.	target	target	target	1037
Map2k3	NM_008928	.	target	target	.	986	Gtf3a	NM_025293	.	target	target	target	1038
Mecr	NM_025297	.	target	target	target	1039	Cenp0	NM_134046	.	target	target	target	1091
Acy1	NM_025371	.	target	target	target	1040	Mthfd1	NM_138745	.	target	target	target	1092
1110059G10Rik	NM_025419	.	target	target	target	1041	Dph1	NM_144491	.	target	target	target	1093

Cenpp	NM_025495	.	.	.	target	.	.	.	target	1042	Rab71	NM_144875	.	.	.	target	.	.	target	1094
Rps21	NM_025587	.	.	.	target	.	.	.	target	1043	Ndufs1	NM_145518	.	.	.	target	.	.	target	1095
Trapp5	NM_025701	.	.	.	target	.	.	.	target	1044	Evce2	NM_145920	.	.	.	target	.	.	target	1096
Mettl6	NM_025907	.	.	.	target	.	.	.	target	1045	Zfp668	NM_146259	.	.	.	target	.	.	target	1097
Pmf1	NM_025928	.	.	.	target	.	.	.	target	1046	C330021A05Rik	NM_153082	.	.	.	target	.	.	target	1098
Rpp14	NM_025938	.	.	.	target	.	.	.	target	1047	2410015M20Rik	NM_153152	.	.	.	target	.	.	target	1099
Atp5e	NM_025983	.	.	.	target	.	.	.	target	1048	Peo1	NM_153796	.	.	.	target	.	.	target	1100
Cd11	NM_026014	.	.	.	target	.	.	.	target	1049	Fbf1	NM_172571	.	.	.	target	.	.	target	1101
2900010M23Rik	NM_026063	.	.	.	target	.	.	.	target	1050	C79407	NM_172578	.	.	.	target	.	.	target	1102
Nanp	NM_026086	.	.	.	target	.	.	.	target	1051	Map3k7	NM_172688	.	.	.	target	.	.	target	1103
Rps20	NM_026147	.	.	.	target	.	.	.	target	1052	Prpf38a	NM_172697	.	.	.	target	.	.	target	1104
Sfr3a1	NM_026175	.	.	.	target	.	.	.	target	1053	6820429M01	NM_172749	.	.	.	target	.	.	target	1105
4930429M06Rik	NM_026250	.	.	.	target	.	.	.	target	1054	D8Ertb2e	NM_172911	.	.	.	target	.	.	target	1106
Aashpnt	NM_026276	.	.	.	target	.	.	.	target	1055	C030048B08Rik	NM_172991	.	.	.	target	.	.	target	1107
Mphosph10	NM_026483	.	.	.	target	.	.	.	target	1056	2010321M09Rik	NM_175153	.	.	.	target	.	.	target	1108
Ncbp2	NM_026554	.	.	.	target	.	.	.	target	1057	Srrm2	NM_175229	.	.	.	target	.	.	target	1109
Sic25a22	NM_026646	.	.	.	target	.	.	.	target	1058	6330549D23Rik	NM_175469	.	.	.	target	.	.	target	1110
Gtf2i2	NM_026816	.	.	.	target	.	.	.	target	1059	6430571L13Rik	NM_175486	.	.	.	target	.	.	target	1111
Ktbd3	NM_026962	.	.	.	target	.	.	.	target	1060	4930562D19Rik	NM_177616	.	.	.	target	.	.	target	1112
Avp1	NM_027106	.	.	.	target	.	.	.	target	1061	Rtn4r1	NM_177708	.	.	.	target	.	.	target	1113
Tmem70	NM_027415	.	.	.	target	.	.	.	target	1062	Myo1g	NM_178440	.	.	.	target	.	.	target	1114
Pex1	NM_027777	.	.	.	target	.	.	.	target	1063	Rfesd	NM_178916	.	.	.	target	.	.	target	1115
Rbm12b	NM_028226	.	.	.	target	.	.	.	target	1064	Mtvr2	NM_181452	.	.	.	target	.	.	target	1116
Exosc6	NM_028274	.	.	.	target	.	.	.	target	1065	R3hdm1	NM_181750	.	.	.	target	.	.	target	1117
Wdr75	NM_028599	.	.	.	target	.	.	.	target	1066	Tut1	NM_197993	.	.	.	target	.	.	target	1118
Moea	NM_028626	.	.	.	target	.	.	.	target	1067	Pip5k1i	NM_198191	.	.	.	target	.	.	target	1119
Nol9	NM_028727	.	.	.	target	.	.	.	target	1068	Alq8	NM_199035	.	.	.	target	.	.	target	1120
Snx11	NM_028965	.	.	.	target	.	.	.	target	1069	Rexo4	NM_207234	.	.	.	target	.	.	target	1121
4930444A02Rik	NM_029037	.	.	.	target	.	.	.	target	1070	Abhd7	NM_001001804	.	.	.	target	.	.	target	1122
Phpt1	NM_029293	.	.	.	target	.	.	.	target	1071	Fbxl10	NM_001003953	.	.	.	target	.	.	target	1123
Jmjd5	NM_029842	.	.	.	target	.	.	.	target	1072	Fbxl10	NM_001005866	.	.	.	target	.	.	target	1124
Sil1	NM_030749	.	.	.	target	.	.	.	target	1073	Best3	NM_001007583	.	.	.	target	.	.	target	1125
Tas1r1	NM_031867	.	.	.	target	.	.	.	target	1074	BC043301	NM_001008549	.	.	.	target	.	.	target	1126
Tssk6	NM_032004	.	.	.	target	.	.	.	target	1075	10-set	NM_001024910	.	.	.	target	.	.	target	1127
Pcdhgb1	NM_033574	.	.	.	target	.	.	.	target	1076	10-set	NM_001024911	.	.	.	target	.	.	target	1128
Pcdhgb2	NM_033575	.	.	.	target	.	.	.	target	1077	Orc2l	NM_001025378	.	.	.	target	.	.	target	1129
Pcdhgb6	NM_033578	.	.	.	target	.	.	.	target	1078	Maf	NM_001025577	.	.	.	target	.	.	target	1130
Pcdhgb8	NM_033580	.	.	.	target	.	.	.	target	1079	Gtf3c3	NM_001033194	.	.	.	target	.	.	target	1131
Pcdhga4	NM_033587	.	.	.	target	.	.	.	target	1080	AW146154	NM_001033530	.	.	.	target	.	.	target	1132
Pcdhga12	NM_033595	.	.	.	target	.	.	.	target	1081	F730031O20Rik	NM_001033538	.	.	.	target	.	.	target	1133
Mrpl1	NM_053158	.	.	.	target	.	.	.	target	1082	4922505E12Rik	NM_001033547	.	.	.	target	.	.	target	1134
Mrpl43	NM_053164	.	.	.	target	.	.	.	target	1083	9130206N08Rik	NM_001034895	.	.	.	target	.	.	target	1135
G43002G23Rik	NM_053252	.	.	.	target	.	.	.	target	1084	Kcnrg	NM_001039105	.	.	.	target	.	.	target	1136
Sic25a3	NM_133668	.	.	.	target	.	.	.	target	1085	Adss	NM_007422	.	.	.	target	.	.	target	1137
Zfp451	NM_133817	.	.	.	target	.	.	.	target	1086	Atf1	NM_007496	.	.	.	target	.	.	target	1138
G431001109Rik	NM_133837	.	.	.	target	.	.	.	target	1087	Bpgm	NM_007563	.	.	.	target	.	.	target	1139
Hemk1	NM_133984	.	.	.	target	.	.	.	target	1088	Cd1d1	NM_007639	.	.	.	target	.	.	target	1140
Fts1	NM_133991	.	.	.	target	.	.	.	target	1089	Crmp1	NM_007765	.	.	.	target	.	.	target	1141
Zc3h10	NM_134003	.	.	.	target	.	.	.	target	1090	Hivep1	NM_007772	.	.	.	target	.	.	target	1142
Ctcf	NM_007794	.	.	.	target	.	.	.	target	1143	Syng4	NM_021482	.	.	.	target	.	.	target	1195
Cyp26a1	NM_007811	.	.	.	target	.	.	.	target	1144	Zfp191	NM_021559	.	.	.	target	.	.	target	1196
Ei24	NM_007915	.	.	.	target	.	.	.	target	1145	Moap1	NM_022323	.	.	.	target	.	.	target	1197
Epc1	NM_007935	.	.	.	target	.	.	.	target	1146	Znr1d	NM_023162	.	.	.	target	.	.	target	1198
Foxh1	NM_007989	.	.	.	target	.	.	.	target	1147	Zfp120	NM_023266	.	.	.	target	.	.	target	1199
G6pdx	NM_008062	.	.	.	target	.	.	.	target	1148	Ube2d3	NM_025356	.	.	.	target	.	.	target	1200
Has2	NM_008216	.	.	.	target	.	.	.	target	1149	Ifitm3	NM_025378	.	.	.	target	.	.	target	1201
Hoxa10	NM_008263	.	.	.	target	.	.	.	target	1150	2310005N03Rik	NM_025511	.	.	.	target	.	.	target	1202
Hoxd11	NM_008273	.	.	.	target	.	.	.	target	1151	2410022L05Rik	NM_025556	.	.	.	target	.	.	target	1203
Kcnb1	NM_008420	.	.	.	target	.	.	.	target	1152	Agg1	NM_025630	.	.	.	target	.	.	target	1204
Myf5	NM_008656	.	.	.	target	.	.	.	target	1153	5730410I19Rik	NM_025666	.	.	.	target	.	.	target	1205
Nef3	NM_008691	.	.	.	target	.	.	.	target	1154	Rsrc1	NM_025822	.	.	.	target	.	.	target	1206
Nsg2	NM_008741	.	.	.	target	.	.	.	target	1155	1700028P14Rik	NM_026188	.	.	.	target	.	.	target	1207
Orc2l	NM_008765	.	.	.	target	.	.	.	target	1156	Dhx40	NM_026191	.	.	.	target	.	.	target	1208
Pax1	NM_008780	.	.	.	target	.	.	.	target	1157	4930483J18Rik	NM_026288	.	.	.	target	.	.	target	1209
Ptx3	NM_008852	.	.	.	target	.	.	.	target	1158	Tmem157	NM_026321	.	.	.	target	.	.	target	1210
Ptger2	NM_008964	.	.	.	target	.	.	.	target	1159	Alkbh3	NM_026944	.	.	.	target	.	.	target	1211
Aldh1a2	NM_009022	.	.	.	target	.	.	.	target	1160	1700007K13Rik	NM_027040	.	.	.	target	.	.	target	1212
Sfrp2	NM_009144	.	.	.	target	.	.	.	target	1161	Zfp219	NM_027248	.	.	.	target	.	.	target	1213
Sic4a1ap	NM_009206	.	.	.	target	.	.	.	target	1162	Trnt1	NM_027296	.	.	.	target	.	.	target	1214
Tcf3	NM_009332	.	.	.	target	.	.	.	target	1163	Tmem144	NM_027495	.	.	.	target	.	.	target	1215
Tead1	NM_009346	.	.	.	target	.	.	.	target	1164	Cwf19l2	NM_027545	.	.	.	target	.	.	target	1216
Akap2	NM_009649	.	.	.	target	.	.	.	target	1165	Tmem106b	NM_027992	.	.	.	target	.	.	target	1217
Entpd1	NM_009848	.	.	.	target	.	.	.	target	1166	Cnn3	NM_028044	.	.	.	target	.	.	target	1218
Ikbkg	NM_010547	.	.	.	target	.	.	.	target	1167	Abxn7l4	NM_028139	.	.	.	target	.	.	target	1219
Laptm5	NM_010686	.	.	.	target	.	.	.	target	1168	Supt17	NM_028150	.	.	.	target	.	.	target	1220
Laptm5	NM_010686	.	.	.	target	.	.	.	target	1169	2410075D05Rik	NM_028604	.	.	.	target	.	.	target	1221
Meis1	NM_010789	.	.	.	target	.	.	.	target	1170	1700029M20Rik	NM_028688	.	.	.	target	.	.	target	1222
Nfia	NM_010905	.	.	.	target	.	.	.	target	1171	1700001C19Rik	NM_029296	.	.	.	target	.	.	target	1223
Prkce	NM_011104	.	.	.	target	.	.	.	target	1172	Zfp60	NM_029531	.	.	.	target	.	.	target	1224
Ptger3	NM_011196	.	.	.	target	.	.	.	target	1173	Det1	NM_029585	.	.	.	target	.	.	target	1225
Rab33a	NM_011228	.	.	.	target	.	.	.	target	1174	1700022C21Rik	NM_029602	.	.	.	target	.	.	target	1226
Rarb	NM_011243	.	.	.	target	.	.	.	target	1175	Ppp1r11	NM_029632	.	.	.	target	.	.	target	1227
Tie4	NM_011600	.	.	.	target	.	.	.	target	1176	Dapk1	NM_029653	.	.	.	target	.	.	target	1228
Mkm3	NM_011746	.	.	.	target	.	.	.	target	1177	Cryl1	NM_030004	.	.	.	target	.	.	target	1229
Pdc38	NM_012019	.	.	.	target	.	.	.	target	1178	Gins3	NM_030198	.	.	.	target	.	.	target	1230
Gdf7	NM_013527	.	.	.	target	.	.	.	target	1179	Lysmd3	NM_030257	.	.	.	target	.	.	target	1231
Mb	NM_013593	.	.	.	target	.	.	.	target	1180	Rai14	NM_030690	.	.	.	target	.	.	target	1232
Shox2	NM_013665	.	.	.	target	.	.	.	target	1181	Gats	NM_030719	.	.	.	target	.	.	target	1233
Snapp1	NM_013669	.	.	.	target	.	.	.	target	1182	Syt1l	NM_031393	.	.	.	target	.	.	target	1234
Gcat	NM_013847	.	.	.	target	.	.	.	target	1183	Ppp1r16a	NM_033371	.	.	.	target	.	.	target	1235
Chrna4	NM_015730	.	.	.	target	.	.	.	target	1184	Tnm16	NM_053169	.	.	.	target	.	.	target	1236
Enpp2	NM_015744	.	.	.	target															

Ppp1r8	NM_146154	target	1255	4930403C10Rik	NM_001033170	target	1307
Slc5a11	NM_146198	target	1256	9530048O09Rik	NM_001033187	target	1308
Atp10d	NM_153389	target	1257	4932417116Rik	NM_001033321	target	1309
Ilf19	NM_153511	target	1258	BC025920	NM_001033363	target	1310
A930038C07Rik	NM_172399	target	1259	Dock1	NM_001033420	target	1311
492151116Rik	NM_172407	target	1260	BC048644	NM_001033485	target	1312
Lrrc1	NM_172528	target	1261	D330010C22Rik	NM_001033489	target	1313
Kctd3	NM_172650	target	1262	AU021838	NM_001037746	target	1314
Zfp496	NM_172941	target	1263	Ctkf	NM_001037841	target	1315
BC066135	NM_173031	target	1264	Gen5l2	NM_001038010	target	1316
4933406M09Rik	NM_173771	target	1265	Anapc11	NM_001038230	target	1317
2310047H23Rik	NM_175150	target	1266	Gmfiq	NM_001039192	target	1318
Cdca2	NM_175384	target	1267	Tmm46	NM_001039466	target	1319
Gnk4	NM_175481	target	1268	Dhps	NM_001039514	target	1320
Ppm1k	NM_175523	target	1269	Parp14	NM_001039530	target	1321
Dclre1c	NM_175683	target	1270	Pkd113	NM_001039700	target	1322
9330120H11Rik	NM_177029	target	1271	A230107C01Rik	NM_001039721	target	1323
B630019A10Rik	NM_177072	target	1272	Sco1	NM_001040026	target	1324
9030227G01Rik	NM_177136	target	1273	Ung	NM_001040691	target	1325
Pptc7	NM_177242	target	1274	Oip5	NM_001042653	target	1326
4933424A10Rik	NM_177293	target	1275	Tbc1d17	NM_001042655	target	1327
Suhw2	NM_177475	target	1276	Zfp41	NM_001044718	target	1328
D430014M15	NM_177764	target	1277	BC003331	NM_001077237	target	1329
A730036117Rik	NM_177847	target	1278	Acp5	NM_007388	target	1330
Ikbkg	NM_178590	target	1279	Acvr2b	NM_007397	target	1331
Poldip3	NM_178627	target	1280	Ada	NM_007398	target	1332
Atcav	NM_178662	target	1281	Adh5	NM_007410	target	1333
AW551984	NM_178737	target	1282	Parp1	NM_007415	target	1334
BB146404	NM_178908	target	1283	Slc25a5	NM_007451	target	1335
Sfrs15	NM_178923	target	1284	Ap1m1	NM_007456	target	1336
Gbf1	NM_178930	target	1285	Aif3	NM_007498	target	1337
Zfp120	NM_181266	target	1286	Calm3	NM_007590	target	1338
Cidf	NM_181322	target	1287	Calr	NM_007591	target	1339
Wdr47	NM_181400	target	1288	Cd37	NM_007645	target	1340
Rerg	NM_181988	target	1289	Cfl1	NM_007687	target	1341
BC048679	NM_183143	target	1290	Crkl	NM_007764	target	1342
Dlx5	NM_198854	target	1291	Dpapt1	NM_007875	target	1343
Kng2	NM_201375	target	1292	Ell	NM_007924	target	1344
Ugt1a5	NM_201643	target	1293	Eno3	NM_007933	target	1345
Kcnrg	NM_206974	target	1294	Ewv1	NM_007968	target	1346
Zfp36l2	NM_001001806	target	1295	Gjb4	NM_008127	target	1347
Rtel1	NM_001001882	target	1296	Glul	NM_008131	target	1348
Nos3as	NM_001002897	target	1297	Gpx1	NM_008160	target	1349
Clc	NM_001003908	target	1298	Hcfc1	NM_008224	target	1350
Hint1	NM_008248	target	1351	Idh1	NM_010497	target	1403
Tfb2m	NM_008249	target	1352	Ier2	NM_010499	target	1404
Hyal1	NM_008317	target	1353	Invs	NM_010569	target	1405
Isgf3g	NM_008394	target	1354	Jub	NM_010590	target	1406
Junb	NM_008416	target	1355	Kif9	NM_010628	target	1407
Rps2	NM_008503	target	1356	Fabp5	NM_010634	target	1408
Ascl2	NM_008554	target	1357	Ldb1	NM_010697	target	1409
Mt2	NM_008630	target	1358	Lig1	NM_010715	target	1410
Mtap7	NM_008635	target	1359	Mad11l	NM_010752	target	1411
Nvc	NM_008692	target	1360	Mettl1	NM_010792	target	1412
Pcmt1	NM_008786	target	1361	Myo5a	NM_010864	target	1413
Plcb3	NM_008874	target	1362	Ncam1	NM_010875	target	1414
Pms2	NM_008886	target	1363	Nck1	NM_010878	target	1415
Ppp1r14b	NM_008889	target	1364	Uhrf1	NM_010931	target	1416
Pitbp1	NM_008956	target	1365	Opr1	NM_011014	target	1417
Ptprn14	NM_008976	target	1366	Pfn1	NM_011072	target	1418
Kif20a	NM_009004	target	1367	Pip5k3	NM_011086	target	1419
Rad23a	NM_009010	target	1368	Pkm2	NM_011099	target	1420
Rpl12	NM_009076	target	1369	Pltp	NM_011125	target	1421
Rpl18	NM_009077	target	1370	Pou2f1	NM_011137	target	1422
Rpl19	NM_009078	target	1371	Ppb	NM_011149	target	1423
Rpl22	NM_009079	target	1372	Rad9	NM_011237	target	1424
Rps29	NM_009093	target	1373	Rangap1	NM_011241	target	1425
Slmn3	NM_009133	target	1374	Sdf4	NM_011341	target	1426
Slah1a	NM_009172	target	1375	Shc1	NM_011368	target	1427
Sos1	NM_009231	target	1376	Slc2a3	NM_011401	target	1428
Tacr2	NM_009314	target	1377	Slc7a5	NM_011404	target	1429
Tk1	NM_009387	target	1378	Sox12	NM_011438	target	1430
Top3a	NM_009410	target	1379	Strm	NM_011501	target	1431
Phlda2	NM_009434	target	1380	Syngn3	NM_011522	target	1432
Rpl13a	NM_009438	target	1381	Tcof1	NM_011552	target	1433
Ulf1	NM_009482	target	1382	Prdx2	NM_011563	target	1434
Vil2	NM_009510	target	1383	Thoc4	NM_011568	target	1435
Wee1	NM_009516	target	1384	Clrf1a	NM_011574	target	1436
Aprt	NM_009698	target	1385	Trp53	NM_011640	target	1437
Aif4	NM_009716	target	1386	Tuba2	NM_011654	target	1438
Capns1	NM_009795	target	1387	Tubb5	NM_011655	target	1439
Cct4	NM_009837	target	1388	Txn1	NM_011660	target	1440
Cd151	NM_009842	target	1389	Ung	NM_011677	target	1441
Cish	NM_009895	target	1390	Ybx1	NM_011732	target	1442
Cln3	NM_009907	target	1391	Zfp41	NM_011759	target	1443
Cyp27b1	NM_010009	target	1392	Cfdp1	NM_011801	target	1444
Opn3	NM_010098	target	1393	Impdh1	NM_011829	target	1445
Eif1a	NM_010120	target	1394	Rhf13	NM_011883	target	1446
Gpd2	NM_010274	target	1395	Mpps12	NM_011885	target	1447
Gjb5	NM_010291	target	1396	Srp54	NM_011899	target	1448
Gclc	NM_010295	target	1397	Srp54	NM_011899	target	1449
Gstm1	NM_010358	target	1398	Hsf4	NM_011939	target	1450
Hsp90aa1	NM_010480	target	1399	Plod3	NM_011962	target	1451
Htr5b	NM_010483	target	1400	Zfp260	NM_011981	target	1452
Hyal2	NM_010489	target	1401	Rpl8	NM_012053	target	1453
Icam1	NM_010493	target	1402	Crry	NM_013499	target	1454
Eif4a2	NM_013506	target	1455	Hnrhp1	NM_021510	target	1507
Ifrd1	NM_013562	target	1456	Thap11	NM_021513	target	1508
Sod2	NM_013671	target	1457	Ak1	NM_021515	target	1509
Sp1	NM_013672	target	1458	4930511A21Rik	NM_021529	target	1510
Cops5	NM_013715	target	1459	Pnkp	NM_021549	target	1511
Rps11	NM_013725	target	1460	Nek7	NM_021605	target	1512
Rps26	NM_013765	target	1461	Gmfiq	NM_022024	target	1513
Slc25a10	NM_013770	target	1462	Sdf211	NM_022324	target	1514
Znhit2	NM_013859	target	1463	Lrrd	NM_022654	target	1515
Timm13	NM_013895	target	1464	My17	NM_022879	target	1516
Bloc1s1	NM_015740	target	1465	Rpl23	NM_022891	target	1517
Mapk6	NM_015806	target	1466	Zfp110	NM_022981	target	1518
Lsm4	NM_015816	target	1467	Dpys5	NM_023047	target	1519

Fbxl8	NM_015821				target	target	1468	Ifi30	NM_023065				target	target	1520
Incenp	NM_016692				target	target	1469	Rab8a	NM_023126				target	target	1521
Kifc1	NM_016761				target	target	1470	Rps19	NM_023133				target	target	1522
Mybbp1a	NM_016776				target	target	1471	Acin1	NM_023190				target	target	1523
Rbm3	NM_016809				target	target	1472	Ssna1	NM_023464				target	target	1524
Dnpep	NM_016878				target	target	1473	Fahd1	NM_023480				target	target	1525
B3gnt2	NM_016888				target	target	1474	1110032A03Rik	NM_023483				target	target	1526
Cd164	NM_016898				target	target	1475	Cad	NM_023525				target	target	1527
Cks1b	NM_016904				target	target	1476	Slc44a4	NM_023557				target	target	1528
Pla2g6	NM_016915				target	target	1477	Sars2	NM_023637				target	target	1529
O9-set	NM_017380				target	target	1478	Clns1a	NM_023671				target	target	1530
Pebp1	NM_018858				target	target	1479	Nfatc4	NM_023699				target	target	1531
Arl6ip1	NM_019419				target	target	1480	Sec13l1	NM_024206				target	target	1532
Rbm38	NM_019547				target	target	1481	Stt3b	NM_024222				target	target	1533
Rpl21	NM_019647				target	target	1482	Hagh	NM_024284				target	target	1534
Diap3	NM_019670				target	target	1483	Morf4l1	NM_024431				target	target	1535
Ptkp	NM_019703				target	target	1484	2310016E02Rik	NM_024460				target	target	1536
Nupr1	NM_019738				target	target	1485	Ublcp1	NM_024475				target	target	1537
Uble1a	NM_019748				target	target	1486	Tbrg1	NM_025289				target	target	1538
Fzr1	NM_019757				target	target	1487	Krtcap2	NM_025327				target	target	1539
Serinc1	NM_019760				target	target	1488	Anapc11	NM_025389				target	target	1540
Dstn	NM_019771				target	target	1489	Bccip	NM_025392				target	target	1541
Crtap	NM_019922				target	target	1490	Pqls	NM_025396				target	target	1542
Ccnl1	NM_019937				target	target	1491	1810032O08Rik	NM_025472				target	target	1543
Gcn5l2	NM_020004				target	target	1492	2310004I24Rik	NM_025510				target	target	1544
Sphk2	NM_020011				target	target	1493	Cyb5b	NM_025558				target	target	1545
Dhodh	NM_020046				target	target	1494	1810046J19Rik	NM_025559				target	target	1546
Gmnn	NM_020567				target	target	1495	2400001E08Rik	NM_025605				target	target	1547
Rps14	NM_020600				target	target	1496	Cul7	NM_025611				target	target	1548
Tbl1x	NM_020601				target	target	1497	Rwdd1	NM_025614				target	target	1549
Srd5a2l	NM_020611				target	target	1498	2310042E22Rik	NM_025634				target	target	1550
Tk2	NM_021028				target	target	1499	Rsh12a	NM_025789				target	target	1551
Gpml2	NM_021296				target	target	1500	Pnpla2	NM_025802				target	target	1552
2400006H24Rik	NM_021329				target	target	1501	Mrops18b	NM_025878				target	target	1553
Neurl	NM_021360				target	target	1502	Actr6	NM_025914				target	target	1554
Klf13	NM_021366				target	target	1503	2010315L10Rik	NM_025917				target	target	1555
Angel2	NM_021421				target	target	1504	Nradr	NM_026012				target	target	1556
1700123O20Rik	NM_021437				target	target	1505	Rplp2	NM_026020				target	target	1557
Tah	NM_021480				target	target	1506	Ikbkap	NM_026079				target	target	1558
2410016F19Rik	NM_028113				target	target	1507	Cklf	NM_029295				target	target	1611
1110008F13Rik	NM_026124				target	target	1560	Lymr7	NM_029327				target	target	1612
Map1lc3b	NM_026160				target	target	1561	Nhej1	NM_029342				target	target	1613
Rnf151	NM_026205				target	target	1562	Glyd2	NM_029420				target	target	1614
Mrpl49	NM_026246				target	target	1563	Rap2a	NM_029519				target	target	1615
2310003F16Rik	NM_026318				target	target	1564	0610040J01Rik	NM_029554				target	target	1616
Rnmt	NM_026440				target	target	1565	Txndc4	NM_029572				target	target	1617
Rgs19	NM_026446				target	target	1566	2410193C02Rik	NM_029736				target	target	1618
Nuf2	NM_026532				target	target	1567	2010315L10Rik	NM_029768				target	target	1619
Slc25a39	NM_026542				target	target	1568	Arrdc5	NM_029799				target	target	1620
Pak1ip1	NM_026550				target	target	1569	Ocel1	NM_029865				target	target	1621
Nudi2l	NM_026623				target	target	1570	Tnm35	NM_029979				target	target	1622
0610009O03Rik	NM_026660				target	target	1571	Cyp20a1	NM_030013				target	target	1623
Gabarapl2	NM_026693				target	target	1572	Mospd3	NM_030037				target	target	1624
Mrpl13	NM_026759				target	target	1573	Brd8	NM_030147				target	target	1625
Ube2c	NM_026785				target	target	1574	Cygb	NM_030206				target	target	1626
Agpat5	NM_026792				target	target	1575	Aacs	NM_030210				target	target	1627
D2Bwg1335e	NM_026828				target	target	1576	BC004004	NM_030561				target	target	1628
Ppil1	NM_026845				target	target	1577	Lsm2	NM_030597				target	target	1629
Anv1	NM_026855				target	target	1578	D3Ucl1a	NM_030685				target	target	1630
Wdr40a	NM_026893				target	target	1579	Gpr84	NM_030720				target	target	1631
Rheb1l	NM_026967				target	target	1580	Cacnb1	NM_031173				target	target	1632
Slc38a4	NM_027052				target	target	1581	Akap12	NM_031185				target	target	1633
1700030J22Rik	NM_027103				target	target	1582	Rab3d	NM_031874				target	target	1634
Trnp13	NM_027182				target	target	1583	Tcfcp2	NM_033476				target	target	1635
Def6	NM_027185				target	target	1584	Igsf9	NM_033608				target	target	1636
Rnaseh2a	NM_027187				target	target	1585	Rpl10	NM_052835				target	target	1637
2010007H12Rik	NM_027242				target	target	1586	Rheb	NM_053075				target	target	1638
Znhit1	NM_027318				target	target	1587	Tspan4	NM_053082				target	target	1639
Mapk6	NM_027418				target	target	1588	Kifc1	NM_053173				target	target	1640
Arrdc2	NM_027560				target	target	1589	Cpsf1	NM_053193				target	target	1641
Afmid	NM_027827				target	target	1590	Tle6	NM_053254				target	target	1642
0610007C21Rik	NM_027855				target	target	1591	Klf16	NM_078477				target	target	1643
Mus81	NM_027877				target	target	1592	B3gal16	NM_080445				target	target	1644
Cic	NM_027882				target	target	1593	Nek8	NM_080849				target	target	1645
Tmem24	NM_027909				target	target	1594	Rac3	NM_133223				target	target	1646
Ap2b1	NM_027915				target	target	1595	Acot8	NM_133240				target	target	1647
Slc35f2	NM_028060				target	target	1596	Sumo2	NM_133354				target	target	1648
Pgm2	NM_028132				target	target	1597	Tmem97	NM_133706				target	target	1649
1700001P01Rik	NM_028156				target	target	1598	Fbxo31	NM_133765				target	target	1650
2610028A01Rik	NM_028228				target	target	1599	Trp	NM_133780				target	target	1651
2700097O09Rik	NM_028314				target	target	1600	Cops8	NM_133805				target	target	1652
Setd5	NM_028385				target	target	1601	Lrrc59	NM_133807				target	target	1653
Anln	NM_028390				target	target	1602	Nusap1	NM_133851				target	target	1654
Cnih3	NM_028408				target	target	1603	Rcc1	NM_133878				target	target	1655
2610110G12Rik	NM_028476				target	target	1604	Emilin1	NM_133918				target	target	1656
Slc35f5	NM_028787				target	target	1605	Dohd	NM_133964				target	target	1657
Atg7	NM_028835				target	target	1606	Snapc2	NM_133968				target	target	1658
Abcb8	NM_028030				target	target	1607	Arc6	NM_133972				target	target	1659
Klc4	NM_029091				target	target	1608	Alg9	NM_133981				target	target	1660
Armet	NM_029103				target	target	1609	Rpp25	NM_133982				target	target	1661
Qtrtd1	NM_029128				target	target	1610	Tcta	NM_133986				target	target	1662
Csnk1g2	NM_134002				target	target	1663	Txndc9	NM_172054				target	target	1715
Rdh5	NM_134006				target	target	1664	Pdck	NM_172134				target	target	1716
Pex12	NM_134025				target	target	1665	Midz	NM_172162				target	target	1717
4930427A07Rik	NM_134041				target	target	1666	Ddx19b	NM_172284				target	target	1718
Mtp	NM_134092				target	target	1667	6330530A05Rik	NM_172383				target	target	1719
Nrm	NM_134122				target	target	1668	Sart2	NM_172508				target	target	1720
Ifi140	NM_134126				target	target	1669	Arl15	NM_172595				target	target	1721
Tmem109	NM_134142				target	target	1670	Pdk1	NM_172665				target	target	1722
D930010J01Rik	NM_134147				target	target	1671	Sfrs14	NM_172755				target	target	1723
Slc12a8	NM_134251				target	target	1672	Zbtb44	NM_172765				target	target	1724
Kif2c	NM_134471				target	target	1673	E130310K16Rik	NM_172987				target	target	1725
Apob48r	NM_138310				target	target	1674	Cbr3	NM_173047				target	target	1726
Exosc5	NM_138586				target	target	1675	Alkbh2	NM_175016				target	target	1727
Hexim1	NM_138753				target	target	1676	Samd4b	NM_175021				target	target	1728
Tnfp2	NM_139064				target	target	1677	4833401D15Rik	NM_175030				target	target	1729
Satb2	NM_139146				target	target	1678	Bola2	NM_175103				target	target</	

Mib2	NM_145124	.	.	.	target	target	1681	2310046O06Rik	NM_175273	target	target	1733
B3gnt7	NM_145222	.	.	.	target	target	1682	Anapc2	NM_175300	target	target	1734
Lactb2	NM_145381	.	.	.	target	target	1683	Tmem16f	NM_175344	target	target	1735
5830457O10Rik	NM_145412	.	.	.	target	target	1684	Gpd1l	NM_175380	target	target	1736
Tmc6	NM_145439	.	.	.	target	target	1685	Mars2	NM_175439	target	target	1737
Rabif	NM_145510	.	.	.	target	target	1686	Enk2	NM_175443	target	target	1738
BC003331	NM_145511	.	.	.	target	target	1687	A930012O16Rik	NM_175463	target	target	1739
Trub2	NM_145520	.	.	.	target	target	1688	Smcr8	NM_175491	target	target	1740
Thumpd1	NM_145585	.	.	.	target	target	1689	Zfp367	NM_175494	target	target	1741
Gatad2a	NM_145596	.	.	.	target	target	1690	Hist4h4	NM_175652	target	target	1742
Nup43	NM_145706	.	.	.	target	target	1691	Ppp1r10	NM_175934	target	target	1743
Dhx35	NM_145742	.	.	.	target	target	1692	Rbm35b	NM_176838	target	target	1744
Lin2b	NM_145833	.	.	.	target	target	1693	Mett14	NM_176917	target	target	1745
Zfp7	NM_145916	.	.	.	target	target	1694	Zcchc7	NM_177027	target	target	1746
BC031781	NM_145943	.	.	.	target	target	1695	Flad1	NM_177041	target	target	1747
Cdk5rap2	NM_145990	.	.	.	target	target	1696	Cc2d1b	NM_177045	target	target	1748
Tcp1112	NM_146008	.	.	.	target	target	1697	Senp5	NM_177103	target	target	1749
5730596K20Rik	NM_146091	.	.	.	target	target	1698	Cenpt	NM_177150	target	target	1750
9630058J23Rik	NM_146105	.	.	.	target	target	1699	6330408A02Rik	NM_177312	target	target	1751
Slc25a25	NM_146118	.	.	.	target	target	1700	Camk1d	NM_177343	target	target	1752
Thrap3	NM_146153	.	.	.	target	target	1701	Rhbdd3	NM_177370	target	target	1753
Lrch4	NM_146164	.	.	.	target	target	1702	BC022224	NM_177564	target	target	1754
Jtv1	NM_146165	.	.	.	target	target	1703	H2afj	NM_177688	target	target	1755
Armc5	NM_146205	.	.	.	target	target	1704	AI854703	NM_177737	target	target	1756
Aars	NM_146217	.	.	.	target	target	1705	Ogofd1	NM_177767	target	target	1757
Gprc5c	NM_147217	.	.	.	target	target	1706	Klhl18	NM_177771	target	target	1758
Ubqln1	NM_152234	.	.	.	target	target	1707	Slc5a6	NM_177870	target	target	1759
Zfp566	NM_152814	.	.	.	target	target	1708	Hnrp11	NM_178089	target	target	1760
Jand1b	NM_152895	.	.	.	target	target	1709	2700050L05Rik	NM_178115	target	target	1761
Zc3h12a	NM_153159	.	.	.	target	target	1710	Dixdc1	NM_178118	target	target	1762
Tmem41b	NM_153525	.	.	.	target	target	1711	Brip1	NM_178309	target	target	1763
Thoc1	NM_153552	.	.	.	target	target	1712	Zswim3	NM_178375	target	target	1764
Ipo9	NM_153774	.	.	.	target	target	1713	Tagln2	NM_178598	target	target	1765
4933403F05Rik	NM_153794	.	.	.	target	target	1714	Imp4	NM_178601	target	target	1766
4930579E17Rik	NM_178629	.	.	.	target	target	1767	Kcnh8	NM_001031811	target	target	1819
Cog4	NM_178693	.	.	.	target	target	1768	Kcnh8	NM_001031811	target	target	1820
Ppm1l	NM_178726	.	.	.	target	target	1769	Pak6	NM_001033254	target	target	1821
Dcctd	NM_178768	.	.	.	target	target	1770	Spryd3	NM_001033277	target	target	1822
Ints3	NM_178876	.	.	.	target	target	1771	LOC432870	NM_001034881	target	target	1823
Mapkapk3	NM_178907	.	.	.	target	target	1772	LOC546723	NM_001037169	target	target	1824
Gars	NM_180678	.	.	.	target	target	1773	Nfatc2	NM_001037177	target	target	1825
Tmc6	NM_181321	.	.	.	target	target	1774	Rusc2	NM_001037709	target	target	1826
Anapc13	NM_181394	.	.	.	target	target	1775	Fbxo39	NM_001037713	target	target	1827
Csrp2bp	NM_181417	.	.	.	target	target	1776	1110034B05Rik	NM_001037742	target	target	1828
Gpr135	NM_181752	.	.	.	target	target	1777	Timm8a2	NM_001037744	target	target	1829
Gstp2	NM_181796	.	.	.	target	target	1778	LOC380994	NM_001037748	target	target	1830
Tmc6	NM_181856	.	.	.	target	target	1779	LOC380994	NM_001037748	target	target	1831
Cdc42bpb	NM_183016	.	.	.	target	target	1780	LOC380994	NM_001037748	target	target	1832
Trim46	NM_183037	.	.	.	target	target	1781	LOC380994	NM_001037748	target	target	1833
2600005O03Rik	NM_183089	.	.	.	target	target	1782	LOC380994	NM_001037748	target	target	1834
BC051227	NM_183170	.	.	.	target	target	1783	Gngt2	NM_001038664	target	target	1835
2610318N02Rik	NM_183287	.	.	.	target	target	1784	Rnf38	NM_001038993	target	target	1836
4931440L10Rik	NM_183292	.	.	.	target	target	1785	Kif5a	NM_001039000	target	target	1837
4933440H19Rik	NM_194335	.	.	.	target	target	1786	D030013I16Rik	NM_001039164	target	target	1838
Eif5b	NM_198303	.	.	.	target	target	1787	1700019N12Rik	NM_001039494	target	target	1839
Nsfl1c	NM_198326	.	.	.	target	target	1788	Adora1	NM_001039510	target	target	1840
D630004A14Rik	NM_198675	.	.	.	target	target	1789	Slc30a2	NM_001039677	target	target	1841
Pou2f1	NM_198932	.	.	.	target	target	1790	Ahnak	NM_001039959	target	target	1842
Hdac10	NM_199198	.	.	.	target	target	1791	Akap1	NM_001042541	target	target	1843
Phf15	NM_199299	.	.	.	target	target	1792	Map2k7	NM_001042557	target	target	1844
Lrsam1	NM_199302	.	.	.	target	target	1793	Smad7	NM_001042660	target	target	1845
BC048355	NM_207161	.	.	.	target	target	1794	Mtap6	NM_001043355	target	target	1846
BC052040	NM_207264	.	.	.	target	target	1795	Zipro1	NM_001044703	target	target	1847
0610007C21Rik	NM_212470	.	.	.	target	target	1796	Zipro1	NM_001044704	target	target	1848
BC049807	NM_001002008	.	.	.	target	target	1797	Zipro1	NM_001044705	target	target	1849
Hspa2	NM_001002012	.	.	.	target	target	1798	Bdnf	NM_001048139	target	target	1850
D130007C19Rik	NM_001002773	.	.	.	target	target	1799	Mtap6	NM_001048167	target	target	1851
9930012K11Rik	NM_001004155	.	.	.	target	target	1800	Ccl27	NM_001048179	target	target	1852
LOC432637	NM_001004167	.	.	.	target	target	1801	Git2	NM_001077359	target	target	1853
Znhit3	NM_001005223	.	.	.	target	target	1802	Acads	NM_007383	target	target	1854
Mreg	NM_001005423	.	.	.	target	target	1803	Actb	NM_007393	target	target	1855
Arhgap30	NM_001005508	.	.	.	target	target	1804	Admr	NM_007412	target	target	1856
Zfp251	NM_001007568	.	.	.	target	target	1805	Adprh	NM_007414	target	target	1857
A630018P17Rik	NM_001007577	.	.	.	target	target	1806	Adrb1	NM_007419	target	target	1858
Rtn1	NM_001007596	.	.	.	target	target	1807	Slc25a4	NM_007450	target	target	1859
Adora1	NM_001008533	.	.	.	target	target	1808	Ass1	NM_007494	target	target	1860
Txnip	NM_001009935	.	.	.	target	target	1809	Bak1	NM_007523	target	target	1861
Mdk	NM_001012335	.	.	.	target	target	1810	Bdnf	NM_007540	target	target	1862
Mdk	NM_001012336	.	.	.	target	target	1811	Hrk	NM_007545	target	target	1863
2010001J22Rik	NM_001013022	.	.	.	target	target	1812	Btg2	NM_007570	target	target	1864
Lman2l	NM_001013374	.	.	.	target	target	1813	Cacna1a	NM_007578	target	target	1865
Scn4b	NM_001013390	.	.	.	target	target	1814	Anxa2	NM_007585	target	target	1866
Al747699	NM_001013770	.	.	.	target	target	1815	Calu	NM_007594	target	target	1867
Zhyve28	NM_001015039	.	.	.	target	target	1816	Camk2b	NM_007595	target	target	1868
Triobp	NM_001024716	.	.	.	target	target	1817	Capn5	NM_007602	target	target	1869
Kcnc2	NM_001025581	.	.	.	target	target	1818	Car5a	NM_007608	target	target	1870
Cbx4	NM_007625	.	.	.	target	target	1871	Mmp14	NM_008608	target	target	1923
Cd59a	NM_007652	.	.	.	target	target	1872	Mnat1	NM_008612	target	target	1924
Cd82	NM_007656	.	.	.	target	target	1873	Mov10	NM_008619	target	target	1925
Cd9	NM_007657	.	.	.	target	target	1874	Mpz	NM_008623	target	target	1926
Cdk5	NM_007668	.	.	.	target	target	1875	Mtap2	NM_008632	target	target	1927
Cdkn1a	NM_007669	.	.	.	target	target	1876	Mtnr1a	NM_008639	target	target	1928
Chl1	NM_007697	.	.	.	target	target	1877	Mybl1	NM_008651	target	target	1929
Cnga1	NM_007723	.	.	.	target	target	1878	Nbl1	NM_008675	target	target	1930
Comt	NM_007744	.	.	.	target	target	1879	Ndr1	NM_008681	target	target	1931
Crip1	NM_007763	.	.	.	target	target	1880	Npdcc1	NM_008721	target	target	1932
Cryge	NM_007777	.	.	.	target	target	1881	Npr3	NM_008728	target	target	1933
Csrp2	NM_007792	.	.	.	target	target	1882	Ocln	NM_008756	target	target	1934
Cstb	NM_007793	.	.	.	target	target	1883	Pcp2	NM_008790	target	target	1935
Arid3a	NM_007880	.	.	.	target	target	1884	Padi2	NM_008812	target	target	1936
Atn1	NM_007881	.	.	.	target	target	1885	Pip5k1c	NM_008844	target	target	1937
Dsg2	NM_007883	.	.	.	target	target	1886	Pkd2	NM_008861	target		

Emp2	NM_007929 target	1894	Ret	NM_009050 target	1946
Evx2	NM_007967 target	1895	Ralbp1	NM_009067 target	1947
Ezh1	NM_007970 target	1896	Ripk1	NM_009068 target	1948
Fzrl1	NM_007974 target	1897	Nkx1-2	NM_009123 target	1949
Faf1	NM_007983 target	1898	Scd1	NM_009127 target	1950
Fscn1	NM_007984 target	1899	Sh3bp1	NM_009164 target	1951
Fgf18	NM_008005 target	1900	Vps4b	NM_009190 target	1952
Frat1	NM_008043 target	1901	Slc12a4	NM_009195 target	1953
Gad1	NM_008077 target	1902	Slc1a1	NM_009199 target	1954
Gata3	NM_008091 target	1903	Slc4a2	NM_009207 target	1955
Gcgr	NM_008101 target	1904	Sox15	NM_009235 target	1956
Gfra2	NM_008115 target	1905	Serpinb5	NM_009257 target	1957
Ggt1	NM_008116 target	1906	Slk	NM_009289 target	1958
Grih2a	NM_008170 target	1907	Tapbp	NM_009318 target	1959
Hand1	NM_008213 target	1908	Tbx2	NM_009324 target	1960
Has3	NM_008217 target	1909	Tcf2	NM_009330 target	1961
Hdc	NM_008230 target	1910	Terf1	NM_009352 target	1962
Hes1	NM_008235 target	1911	Tlx2	NM_009392 target	1963
Hn1	NM_008258 target	1912	Tubea6	NM_009448 target	1964
Hoxa13	NM_008264 target	1913	Tubb2a	NM_009450 target	1965
Dnajb3	NM_008299 target	1914	Usp10	NM_009462 target	1966
Hspa2	NM_008301 target	1915	Vasp	NM_009499 target	1967
Kif1b	NM_008441 target	1916	Aanat	NM_009591 target	1968
Kif5a	NM_008447 target	1917	Actg1	NM_009609 target	1969
Krt19	NM_008471 target	1918	Adn	NM_009627 target	1970
L1cam	NM_008478 target	1919	Ahnak	NM_009643 target	1971
Lhb	NM_008497 target	1920	Anxa5	NM_009673 target	1972
Lrrrip1	NM_008515 target	1921	Aqp5	NM_009701 target	1973
Mmp11	NM_008606 target	1922	Artn	NM_009711 target	1974
Aif2	NM_009715 target	1975	Limk1	NM_010717 target	2027
Bcat2	NM_009737 target	1976	Lox	NM_010728 target	2028
Klf5	NM_009769 target	1977	Zbtb7a	NM_010731 target	2029
Tspo	NM_009775 target	1978	Mdk	NM_010784 target	2030
Cacna2d3	NM_009785 target	1979	Msn	NM_010833 target	2031
Ctnna1	NM_009818 target	1980	Msx1	NM_010835 target	2032
Rb1cc1	NM_009826 target	1981	Miap6	NM_010837 target	2033
Ccna4l	NM_009834 target	1982	Mapt	NM_010838 target	2034
Cd80	NM_009855 target	1983	Mthfr	NM_010840 target	2035
Cdc7	NM_009863 target	1984	Myc	NM_010849 target	2036
Cdkn1c	NM_009876 target	1985	Myo1b	NM_010863 target	2037
Ckmt1	NM_009897 target	1986	Ndn	NM_010882 target	2038
Col4a1	NM_009931 target	1987	Ndrg1	NM_010884 target	2039
Bcar1	NM_009954 target	1988	Nfat2	NM_010899 target	2040
Dpysl2	NM_009955 target	1989	Nid1	NM_010917 target	2041
Ctsw	NM_009985 target	1990	Hspa4l	NM_011020 target	2042
Cd55	NM_010016 target	1991	Pold1	NM_011131 target	2043
Eef1a1	NM_010106 target	1992	Cnot7	NM_011135 target	2044
Emp1	NM_010128 target	1993	St14	NM_011176 target	2045
En2	NM_010134 target	1994	Pscd3	NM_011182 target	2046
Eomes	NM_010136 target	1995	Ptpn12	NM_011203 target	2047
Epha2	NM_010139 target	1996	Ptprs	NM_011218 target	2048
Faah	NM_010173 target	1997	Rab5b	NM_011229 target	2049
Fbln1	NM_010180 target	1998	Rasgrp2	NM_011242 target	2050
Fkbp5	NM_010220 target	1999	Ccl27	NM_011336 target	2051
Fosl1	NM_010235 target	2000	Sgk	NM_011361 target	2052
Gna11	NM_010301 target	2001	Six3	NM_011381 target	2053
Gnai3	NM_010306 target	2002	Ski	NM_011385 target	2054
Gnb2	NM_010312 target	2003	Ncor2	NM_011424 target	2055
Edg5	NM_010333 target	2004	Sxpbp2	NM_011503 target	2056
Nmur1	NM_010341 target	2005	Tbx6	NM_011538 target	2057
Gsg1	NM_010352 target	2006	Tead2	NM_011565 target	2058
Hand2	NM_010402 target	2007	Tln1	NM_011602 target	2059
Hdac5	NM_010412 target	2008	Tubea1	NM_011653 target	2060
Foxf1a	NM_010426 target	2009	Tuft1	NM_011656 target	2061
Hoxa7	NM_010455 target	2010	Ywhah	NM_011738 target	2062
Hoxa9	NM_010456 target	2011	Zfp36	NM_011756 target	2063
Hoxb7	NM_010460 target	2012	Zipr1	NM_011757 target	2064
Hoxc12	NM_010463 target	2013	Zp3	NM_011776 target	2065
Hoxc6	NM_010465 target	2014	Coro1c	NM_011779 target	2066
Hrc	NM_010473 target	2015	Gdf15	NM_011819 target	2067
Ifnar2	NM_010509 target	2016	Mbc2	NM_011843 target	2068
Igf1	NM_010514 target	2017	Ptk9l	NM_011876 target	2069
Igfbp5	NM_010518 target	2018	Sgcb	NM_011890 target	2070
Uhm1	NM_010633 target	2019	Cd97	NM_011925 target	2071
Klf4	NM_010637 target	2020	Cicn6	NM_011929 target	2072
Klk1	NM_010639 target	2021	Gnpda1	NM_011937 target	2073
Mafb	NM_010658 target	2022	Map2k7	NM_011944 target	2074
Krt17	NM_010663 target	2023	Map3k1	NM_011945 target	2075
Lasp1	NM_010688 target	2024	Rage	NM_011973 target	2076
Lgals3	NM_010705 target	2025	Casp8ap2	NM_011997 target	2077
Lgin	NM_010709 target	2026	Racgap1	NM_012025 target	2078
Slc9a3r1	NM_012030 target	2079	Krt85	NM_016879 target	2131
Ir5	NM_012057 target	2080	Cldn7	NM_016887 target	2132
Add1	NM_013457 target	2081	Spint1	NM_016907 target	2133
Creb3	NM_013497 target	2082	Cdk2	NM_016912 target	2134
Epb4.1t1	NM_013510 target	2083	St6galnac6	NM_016973 target	2135
Epb4.1t4a	NM_013512 target	2084	O1-set	NM_017461 target	2136
Gfp12	NM_013529 target	2085	Sfn	NM_018754 target	2137
Ptpn6	NM_013545 target	2086	Six8	NM_018768 target	2138
Hist2h2aa1	NM_013549 target	2087	Gipc1	NM_018771 target	2139
Hist2h2aa1	NM_013549 target	2088	Brp44l	NM_018819 target	2140
Hist1h3a	NM_013550 target	2089	Irx5	NM_018826 target	2141
Hoxd10	NM_013554 target	2090	Slc1a4	NM_018861 target	2142
Hoxd9	NM_013555 target	2091	Pgam2	NM_018870 target	2143
Iitga3	NM_013565 target	2092	Gpr56	NM_018882 target	2144
Kcnh2	NM_013569 target	2093	Tmem37	NM_019432 target	2145
Cog1	NM_013581 target	2094	Gabbr1	NM_019439 target	2146
Msh5	NM_013600 target	2095	Nphs1	NM_019459 target	2147
Prrp1	NM_013639 target	2096	Panx1	NM_019482 target	2148
Sema6b	NM_013662 target	2097	Cldn14	NM_019500 target	2149
Sema6b	NM_013662 target	2098	Htra1	NM_019564 target	2150
Sh3gl1	NM_013664 target	2099	Cxcl14	NM_019568 target	2151
T2	NM_013682 target	2100	Espn	NM_019585 target	2152
Tcp11	NM_013687 target	2101	Ubc	NM_019639 target	2153
Txnrd2	NM_013711 target	2102	Ciplm1	NM_019649 target	2154
Chaf1a	NM_013733 target	2103	Mycbp	NM_019660 target	2155
Plek2	NM_013738 target	2104	Plcd1	NM_019676 target	2156
X99384	NM_013753 target	2105	Fmnl1	NM_019679 target	2157
Tip3	NM_013769 target	2106	Rassf1	NM_019713 target	2158

Actg	NM_013798	.	.	.	target	.	.	2107	Tle2	NM_019725	.	.	.	target	.	.	2159
Dnahc8	NM_013811	.	.	.	target	.	.	2108	Snx1	NM_019727	.	.	.	target	.	.	2160
Xbp1	NM_013842	.	.	.	target	.	.	2109	Usp8	NM_019729	.	.	.	target	.	.	2161
Ror2	NM_013846	.	.	.	target	.	.	2110	Acot9	NM_019736	.	.	.	target	.	.	2162
Ndrg2	NM_013864	.	.	.	target	.	.	2111	Gabarap	NM_019749	.	.	.	target	.	.	2163
Bcar3	NM_013867	.	.	.	target	.	.	2112	Nat6	NM_019750	.	.	.	target	.	.	2164
Cabp1	NM_013879	.	.	.	target	.	.	2113	Tmeff2	NM_019790	.	.	.	target	.	.	2165
Usp21	NM_013919	.	.	.	target	.	.	2114	Trp4	NM_019797	.	.	.	target	.	.	2166
Abi1	NM_013924	.	.	.	target	.	.	2115	Pdlim5	NM_019808	.	.	.	target	.	.	2167
Dkk1	NM_015789	.	.	.	target	.	.	2116	Pdlim5	NM_019809	.	.	.	target	.	.	2168
Rab10	NM_016676	.	.	.	target	.	.	2117	Gltp	NM_019821	.	.	.	target	.	.	2169
Gpc1	NM_016696	.	.	.	target	.	.	2118	Gsk3b	NM_019827	.	.	.	target	.	.	2170
Iggap1	NM_016721	.	.	.	target	.	.	2119	Git2	NM_019834	.	.	.	target	.	.	2171
Atp2a3	NM_016745	.	.	.	target	.	.	2120	B4gal15	NM_019835	.	.	.	target	.	.	2172
Prdx4	NM_016764	.	.	.	target	.	.	2121	Hixb9	NM_019944	.	.	.	target	.	.	2173
Ddah2	NM_016765	.	.	.	target	.	.	2122	Rnf14	NM_020012	.	.	.	target	.	.	2174
Mcrs1	NM_016766	.	.	.	target	.	.	2123	Trim44	NM_020267	.	.	.	target	.	.	2175
Ech1	NM_016772	.	.	.	target	.	.	2124	Tob2	NM_020507	.	.	.	target	.	.	2176
Cntnap1	NM_016782	.	.	.	target	.	.	2125	A730008L03Rik	NM_021393	.	.	.	target	.	.	2177
Chst3	NM_016803	.	.	.	target	.	.	2126	Pvrl1	NM_021424	.	.	.	target	.	.	2178
Banp	NM_016812	.	.	.	target	.	.	2127	Efemp2	NM_021474	.	.	.	target	.	.	2179
Irf6	NM_016851	.	.	.	target	.	.	2128	Myoz1	NM_021508	.	.	.	target	.	.	2180
Gipc2	NM_016867	.	.	.	target	.	.	2129	Nup160	NM_021512	.	.	.	target	.	.	2181
Krt85	NM_016879	.	.	.	target	.	.	2130	Wsb2	NM_021539	.	.	.	target	.	.	2182
Cenph	NM_021886	.	.	.	target	.	.	2183	Coq10b	NM_026424	.	.	.	target	.	.	2235
Fxyd7	NM_022007	.	.	.	target	.	.	2184	2010110K16Rik	NM_026442	.	.	.	target	.	.	2236
Ralb	NM_022327	.	.	.	target	.	.	2185	Ppm1m	NM_026447	.	.	.	target	.	.	2237
Sp5	NM_022435	.	.	.	target	.	.	2186	270055K07Rik	NM_026481	.	.	.	target	.	.	2238
Pdlim5	NM_022554	.	.	.	target	.	.	2187	Cdc42ep3	NM_026514	.	.	.	target	.	.	2239
Tmepai	NM_022995	.	.	.	target	.	.	2188	Txn15	NM_026559	.	.	.	target	.	.	2240
Gfer	NM_023040	.	.	.	target	.	.	2189	9430023L20Rik	NM_026566	.	.	.	target	.	.	2241
Gngt2	NM_023121	.	.	.	target	.	.	2190	Ndufb4	NM_026610	.	.	.	target	.	.	2242
Ranbp17	NM_023146	.	.	.	target	.	.	2191	BC061039	NM_026624	.	.	.	target	.	.	2243
Cxcl16	NM_023158	.	.	.	target	.	.	2192	Rpa3	NM_026632	.	.	.	target	.	.	2244
Pycard	NM_023258	.	.	.	target	.	.	2193	5730536A07Rik	NM_026635	.	.	.	target	.	.	2245
Ndel1	NM_023317	.	.	.	target	.	.	2194	Eifb	NM_026695	.	.	.	target	.	.	2246
Mylc2b	NM_023402	.	.	.	target	.	.	2195	Tlcl1	NM_026708	.	.	.	target	.	.	2247
Npc2	NM_023409	.	.	.	target	.	.	2196	Ankrd13a	NM_026718	.	.	.	target	.	.	2248
Tnfrsf13	NM_023517	.	.	.	target	.	.	2197	Cdc42ep2	NM_026772	.	.	.	target	.	.	2249
Pex13	NM_023651	.	.	.	target	.	.	2198	Mocos	NM_026779	.	.	.	target	.	.	2250
Igf2bp3	NM_023670	.	.	.	target	.	.	2199	Pmvk	NM_026784	.	.	.	target	.	.	2251
Txnip	NM_023719	.	.	.	target	.	.	2200	Smyd2	NM_026796	.	.	.	target	.	.	2252
Mgea5	NM_023799	.	.	.	target	.	.	2201	Arl8a	NM_026823	.	.	.	target	.	.	2253
Rab3c	NM_023852	.	.	.	target	.	.	2202	Pygo2	NM_026869	.	.	.	target	.	.	2254
Omdmd1	NM_024180	.	.	.	target	.	.	2203	Ypel3	NM_026875	.	.	.	target	.	.	2255
Ppp6c	NM_024209	.	.	.	target	.	.	2204	Chmp2a	NM_026885	.	.	.	target	.	.	2256
Cmtm3	NM_024217	.	.	.	target	.	.	2205	Stom1	NM_026942	.	.	.	target	.	.	2257
Plekha1	NM_024413	.	.	.	target	.	.	2206	220002K05Rik	NM_026955	.	.	.	target	.	.	2258
Unc84a	NM_024451	.	.	.	target	.	.	2207	Dctn2	NM_027151	.	.	.	target	.	.	2259
BC005537	NM_024473	.	.	.	target	.	.	2208	2310046K01Rik	NM_027172	.	.	.	target	.	.	2260
Sdhc	NM_025321	.	.	.	target	.	.	2209	Centd2	NM_027180	.	.	.	target	.	.	2261
0610009D07Rik	NM_025323	.	.	.	target	.	.	2210	Tli	NM_027192	.	.	.	target	.	.	2262
Dhrs10	NM_025330	.	.	.	target	.	.	2211	1810054D07Rik	NM_027238	.	.	.	target	.	.	2263
Ypel3	NM_025347	.	.	.	target	.	.	2212	Zfp715	NM_027264	.	.	.	target	.	.	2264
1110005A23Rik	NM_025364	.	.	.	target	.	.	2213	Sdro	NM_027301	.	.	.	target	.	.	2265
Prr13	NM_025385	.	.	.	target	.	.	2214	2610034B18Rik	NM_027420	.	.	.	target	.	.	2266
Arl4	NM_025404	.	.	.	target	.	.	2215	Brp44	NM_027430	.	.	.	target	.	.	2267
2610021B07Rik	NM_025479	.	.	.	target	.	.	2216	Pak4	NM_027470	.	.	.	target	.	.	2268
Mgst3	NM_025569	.	.	.	target	.	.	2217	Dcamkl2	NM_027539	.	.	.	target	.	.	2269
Abi3	NM_025659	.	.	.	target	.	.	2218	2310047D13Rik	NM_027773	.	.	.	target	.	.	2270
Gnpt	NM_025768	.	.	.	target	.	.	2219	9130008F23Rik	NM_027834	.	.	.	target	.	.	2271
110001H23Rik	NM_025806	.	.	.	target	.	.	2220	Stk11p	NM_027886	.	.	.	target	.	.	2272
Mfsd1	NM_025813	.	.	.	target	.	.	2221	Klhdc3	NM_027910	.	.	.	target	.	.	2273
1200009O22Rik	NM_025817	.	.	.	target	.	.	2222	Wdr16	NM_027963	.	.	.	target	.	.	2274
Carhsp1	NM_025821	.	.	.	target	.	.	2223	Mad21	NM_027985	.	.	.	target	.	.	2275
Cdc3711	NM_025950	.	.	.	target	.	.	2224	Noxo1	NM_027988	.	.	.	target	.	.	2276
Acbd4	NM_025988	.	.	.	target	.	.	2225	Esco2	NM_028039	.	.	.	target	.	.	2277
Rnaseh2b	NM_026001	.	.	.	target	.	.	2226	Cyb5r1	NM_028057	.	.	.	target	.	.	2278
Tmem77	NM_026013	.	.	.	target	.	.	2227	Slc39a4	NM_028064	.	.	.	target	.	.	2279
Ccdc77	NM_026028	.	.	.	target	.	.	2228	Ppp1r14d	NM_028104	.	.	.	target	.	.	2280
Cmtm6	NM_026036	.	.	.	target	.	.	2229	Tmem175	NM_028223	.	.	.	target	.	.	2281
Mboat2	NM_026037	.	.	.	target	.	.	2230	Sgol1	NM_028232	.	.	.	target	.	.	2282
Lass4	NM_026058	.	.	.	target	.	.	2231	Lrpprc	NM_028233	.	.	.	target	.	.	2283
Slc25a19	NM_026071	.	.	.	target	.	.	2232	4933435A13Rik	NM_028304	.	.	.	target	.	.	2284
Wfdc2	NM_026323	.	.	.	target	.	.	2233	2900006B13Rik	NM_028398	.	.	.	target	.	.	2285
4930578I06Rik	NM_026359	.	.	.	target	.	.	2234	Prkcdp	NM_028444	.	.	.	target	.	.	2286
3110043J09Rik	NM_028455	.	.	.	target	.	.	2287	Tulp4	NM_054040	.	.	.	target	.	.	2339
Etha1	NM_028643	.	.	.	target	.	.	2288	Hist2h3c2	NM_054045	.	.	.	target	.	.	2340
4930404H21Rik	NM_028654	.	.	.	target	.	.	2289	B3gnt5	NM_054052	.	.	.	target	.	.	2341
Rfn2	NM_028713	.	.	.	target	.	.	2290	Rdh1	NM_080436	.	.	.	target	.	.	2342
Als2	NM_028717	.	.	.	target	.	.	2291	Zcchc14	NM_080855	.	.	.	target	.	.	2343
Cyp2s1	NM_028775	.	.	.	target	.	.	2292	Cyp4f13	NM_130882	.	.	.	target	.	.	2344
Sec14l1	NM_028777	.	.	.	target	.	.	2293	Prmt2	NM_133182	.	.	.	target	.	.	2345
Robo4	NM_028783	.	.	.	target	.	.	2294	Steap3	NM_133186	.	.	.	target	.	.	2346
Katn1	NM_028805	.	.	.	target	.	.	2295	Il1r2	NM_133193	.	.	.	target	.	.	2347
4932438H23Rik	NM_028905	.	.	.	target	.	.	2296	Mfn2	NM_133201	.	.	.	target	.	.	2348
4933435A13Rik	NM_028956	.	.	.	target	.	.	2297	Znrf1	NM_133206	.	.	.	target	.	.	2349
4933427D14Rik	NM_028963	.	.	.	target	.	.	2298	Kcnh7	NM_133207	.	.	.	target	.	.	2350
Pck2	NM_028994	.	.	.	target	.	.	2299	Serlad3	NM_133210	.	.	.	target	.	.	2351
Trim14	NM_029077	.	.	.	target	.	.	2300	Slc24a6	NM_133221	.	.	.	target	.	.	2352
Lmbr11	NM_029098	.	.	.	target	.	.	2301	Glic1	NM_133236	.	.	.	target	.	.	2353
Ankrd53	NM_029245	.	.	.	target	.	.	2302	Acot7	NM_133348	.	.	.	target	.	.	2354
Ccdc83	NM_029256	.	.	.	target	.	.	2303	Prima1	NM_133364	.	.	.	target	.	.	2355
Tm4sf5	NM_029360	.	.	.	target	.	.	2304	Cryz11	NM_133679	.	.	.	target	.	.	2356
4930402H24Rik	NM_029432	.	.	.	target	.	.	2305	Mosc2	NM_133684	.	.	.	target	.	.	2357
Nln	NM_029447	.	.	.	target	.	.	2306	2810048G17Rik	NM_133746	.	.	.	target	.	.	2358
Got11	NM_029674	.	.	.	target	.	.	2307	4833439L19Rik	NM_133797	.	.	.	target	.	.	2359
1700127D06Rik	NM_029831	.	.	.	target	.	.	2308	4930504E06Rik	NM_133858	.	.	.	target	.	.	2360
C330008K14Rik	NM_029942	.	.	.	target	.	.	2309	Cept1	NM_133869	.	.	.	target	.	.	2361
Snapp3	NM_029949	.	.	.	target	.	.	2310	Pafah2	NM_133880	.	.	.	target	.	.	2362
Tmem50b	NM_030018	.	.	.	target	.	.	2311	Slc44a1	NM_133891	.	.	.	target	.	.	2363
4930461P20Rik	NM_030046	.	.	.	target	.	.	2312	Krba1	NM_133922	.	.	.	target	.	.	2364
Phf23	NM_030064	.	.	.	target	.	.	2313	Arhgef18	NM_133962	.	.	.	target	.	.	2365

Nptxr	NM_030689	.	.	.	target	.	2320	Pou4f2	NM_138944	target	.	2372
Sacm1l	NM_030692	.	.	.	target	.	2321	Cspg4	NM_139001	target	.	2373
Hspb8	NM_030704	.	.	.	target	.	2322	Tbc1d19	NM_144517	target	.	2374
Pum1	NM_030722	.	.	.	target	.	2323	Lgi4	NM_144556	target	.	2375
Sorcs2	NM_030889	.	.	.	target	.	2324	Tmem63a	NM_144794	target	.	2376
Kri8	NM_031170	.	.	.	target	.	2325	Sgtb	NM_144838	target	.	2377
Gtf2a1	NM_031391	.	.	.	target	.	2326	BC021614	NM_144869	target	.	2378
Nqfr	NM_033217	.	.	.	target	.	2327	Appb1	NM_144931	target	.	2379
Clc1c	NM_033444	.	.	.	target	.	2328	Usp3	NM_144937	target	.	2380
Vps37a	NM_033560	.	.	.	target	.	2329	Prokr2	NM_144944	target	.	2381
Wbscr1	NM_033561	.	.	.	target	.	2330	Hist1h3g	NM_145073	target	.	2382
Bcl3	NM_033601	.	.	.	target	.	2331	Chst10	NM_145142	target	.	2383
Fxyd4	NM_033648	.	.	.	target	.	2332	Gtpbp6	NM_145147	target	.	2384
Fxyd1	NM_052991	.	.	.	target	.	2333	Oas2	NM_145227	target	.	2385
Fxyd1	NM_052992	.	.	.	target	.	2334	Tmem51	NM_145402	target	.	2386
Car7	NM_053070	.	.	.	target	.	2335	Zfp503	NM_145459	target	.	2387
Trim7	NM_053166	.	.	.	target	.	2336	Lzts2	NM_145503	target	.	2388
Sfxn3	NM_053197	.	.	.	target	.	2337	Epb4.115	NM_145506	target	.	2389
Dhrs8	NM_053262	.	.	.	target	.	2338	Farp2	NM_145519	target	.	2390
Mall	NM_145532	.	.	.	target	.	2391	Sox30	NM_173384	target	.	2443
BC021891	NM_145608	.	.	.	target	.	2392	Kcns3	NM_173417	target	.	2444
Hist1h1d	NM_145713	.	.	.	target	.	2393	A830043J08Rik	NM_173425	target	.	2445
Cias1	NM_145827	.	.	.	target	.	2394	Vcpip1	NM_173443	target	.	2446
6430527G18Rik	NM_145836	.	.	.	target	.	2395	Ube2o	NM_173755	target	.	2447
AW549877	NM_145930	.	.	.	target	.	2396	Klf8	NM_173780	target	.	2448
Ccdc25	NM_145944	.	.	.	target	.	2397	Leprot	NM_175036	target	.	2449
C330016O10Rik	NM_145974	.	.	.	target	.	2398	4930515G01Rik	NM_175120	target	.	2450
Plekh3	NM_146030	.	.	.	target	.	2399	Trpm4	NM_175130	target	.	2451
C530044N13Rik	NM_146067	.	.	.	target	.	2400	Arhgap26	NM_175164	target	.	2452
Csnk1a1	NM_146087	.	.	.	target	.	2401	Plekhf2	NM_175175	target	.	2453
9130404D14Rik	NM_146119	.	.	.	target	.	2402	Rnf38	NM_175201	target	.	2454
Nrd1	NM_146150	.	.	.	target	.	2403	Tmem65	NM_175212	target	.	2455
Pdik1l	NM_146156	.	.	.	target	.	2404	Fzd10	NM_175284	target	.	2456
Slco4a1	NM_148933	.	.	.	target	.	2405	D930048N14Rik	NM_175289	target	.	2457
Slc1a3	NM_148938	.	.	.	target	.	2406	A130022J15Rik	NM_175313	target	.	2458
Chrb4	NM_148944	.	.	.	target	.	2407	Sphy2d1	NM_175318	target	.	2459
Slc44a2	NM_152808	.	.	.	target	.	2408	Ndg2	NM_175329	target	.	2460
Plcd3	NM_152813	.	.	.	target	.	2409	Gtf2a1	NM_175335	target	.	2461
Ctdsp1	NM_153088	.	.	.	target	.	2410	2700081O15Rik	NM_175381	target	.	2462
Cd109	NM_153098	.	.	.	target	.	2411	A230106M15Rik	NM_175474	target	.	2463
Klf1c	NM_153103	.	.	.	target	.	2412	Tmem74	NM_175502	target	.	2464
Fev	NM_153111	.	.	.	target	.	2413	6430604K15Rik	NM_175560	target	.	2465
Oplah	NM_153122	.	.	.	target	.	2414	Hist1h4d	NM_175654	target	.	2466
Irgg	NM_153134	.	.	.	target	.	2415	Hist1h4f	NM_175655	target	.	2467
Hist1h4h	NM_153173	.	.	.	target	.	2416	Hist1h4m	NM_175657	target	.	2468
4930429A22Rik	NM_153530	.	.	.	target	.	2417	Hist1h4m	NM_175657	target	.	2469
Phldb1	NM_153537	.	.	.	target	.	2418	Hist1h2af	NM_175661	target	.	2470
Gak	NM_153569	.	.	.	target	.	2419	Hoxc5	NM_175730	target	.	2471
Katnal1	NM_153572	.	.	.	target	.	2420	D230002A01Rik	NM_176904	target	.	2472
Atg4d	NM_153583	.	.	.	target	.	2421	C230013L11Rik	NM_176985	target	.	2473
BC029169	NM_153782	.	.	.	target	.	2422	Vwc2	NM_177033	target	.	2474
Arhgap22	NM_153800	.	.	.	target	.	2423	Pde4dip	NM_177145	target	.	2475
Plekhg3	NM_153804	.	.	.	target	.	2424	B430209F14Rik	NM_177188	target	.	2476
Ppp1r9b	NM_172261	.	.	.	target	.	2425	Cdkl2	NM_177270	target	.	2477
Phyh1	NM_172267	.	.	.	target	.	2426	Rpap1	NM_177294	target	.	2478
D730001G18Rik	NM_172433	.	.	.	target	.	2427	Arl4c	NM_177305	target	.	2479
Sh3bgl2	NM_172507	.	.	.	target	.	2428	4732474A20Rik	NM_177307	target	.	2480
Plc3	NM_172574	.	.	.	target	.	2429	Parp16	NM_177460	target	.	2481
Tmem63c	NM_172583	.	.	.	target	.	2430	Mtmr9	NM_177594	target	.	2482
Fcho2	NM_172591	.	.	.	target	.	2431	BC022623	NM_177632	target	.	2483
Zfp523	NM_172617	.	.	.	target	.	2432	Lrcc61	NM_177736	target	.	2484
Slco4c1	NM_172658	.	.	.	target	.	2433	Rgma	NM_177740	target	.	2485
D030051N19Rik	NM_172669	.	.	.	target	.	2434	9030224M15Rik	NM_177793	target	.	2486
Arhgef10	NM_172751	.	.	.	target	.	2435	B4galnt4	NM_177897	target	.	2487
4732496O08Rik	NM_172877	.	.	.	target	.	2436	Hyal3	NM_178020	target	.	2488
Wdfy3	NM_172882	.	.	.	target	.	2437	Hmga2	NM_178057	target	.	2489
Ccdc113	NM_172914	.	.	.	target	.	2438	Pml	NM_178087	target	.	2490
Zfp512	NM_172993	.	.	.	target	.	2439	Hist1h2ai	NM_178182	target	.	2491
D030041N04Rik	NM_173012	.	.	.	target	.	2440	Hist1h2ao	NM_178185	target	.	2492
Csnk1g1	NM_173185	.	.	.	target	.	2441	Hist1h2ao	NM_178185	target	.	2493
Prune	NM_173347	.	.	.	target	.	2442	Hist1h2ae	NM_178187	target	.	2494
Hist1h2ad	NM_178188	.	.	.	target	.	2495	Plec1	NM_201392	target	.	2547
Hist1h4a	NM_178192	.	.	.	target	.	2496	Plec1	NM_201393	target	.	2548
Hist1h2bf	NM_178195	.	.	.	target	.	2497	Plec1	NM_201394	target	.	2549
Hist1h2bg	NM_178196	.	.	.	target	.	2498	Flrt2	NM_201518	target	.	2550
Hist1h3d	NM_178204	.	.	.	target	.	2499	Sly	NM_201530	target	.	2551
Hist1h3h	NM_178206	.	.	.	target	.	2500	Sly	NM_201530	target	.	2552
Hist2h2aa2	NM_178212	.	.	.	target	.	2501	Sly	NM_201530	target	.	2553
Hist2h2aa2	NM_178212	.	.	.	target	.	2502	Sly	NM_201530	target	.	2554
Hist2h3c1	NM_178216	.	.	.	target	.	2503	Ugt1a1	NM_201645	target	.	2555
Hist2h3c1	NM_178216	.	.	.	target	.	2504	Ltk	NM_206941	target	.	2556
Tieg3	NM_178357	.	.	.	target	.	2505	Ltk	NM_206942	target	.	2557
Zfp369	NM_178364	.	.	.	target	.	2506	Gpr152	NM_206973	target	.	2558
Snupn	NM_178374	.	.	.	target	.	2507	Plac9	NM_207229	target	.	2559
Jakmp1	NM_178394	.	.	.	target	.	2508	Plac9	NM_207229	target	.	2560
BC034204	NM_178420	.	.	.	target	.	2509	Plac9	NM_207229	target	.	2561
C230052I12Rik	NM_178643	.	.	.	target	.	2510	E130006D01Rik	NM_207252	target	.	2562
A530088H08Rik	NM_178656	.	.	.	target	.	2511	B230218L05Rik	NM_207260	target	.	2563
Depdc1b	NM_178683	.	.	.	target	.	2512	C230071H18Rik	NM_207265	target	.	2564
C130074G19Rik	NM_178692	.	.	.	target	.	2513	Efnas	NM_207654	target	.	2565
Stk32a	NM_178749	.	.	.	target	.	2514	Al842396	NM_213729	target	.	2566
E130309F12Rik	NM_178756	.	.	.	target	.	2515	BC031181	NM_001001181	target	.	2567
Hisppd2a	NM_178795	.	.	.	target	.	2516	Hexdc	NM_001001333	target	.	2568
C76566	NM_178879	.	.	.	target	.	2517	BC056474	NM_001001493	target	.	2569
Spata7	NM_178914	.	.	.	target	.	2518	A930013B10Rik	NM_001001497	target	.	2570
Hic2	NM_178922	.	.	.	target	.	2519	D1Bwg1363e	NM_001001565	target	.	2571
Nnat	NM_180960	.	.	.	target	.	2520	D1Bwg1363e	NM_001001566	target	.	2572
Syt14	NM_181546	.	.	.	target	.	2521	C230021P08Rik	NM_001001884	target	.	2573
Cd59b	NM_181858	.	.	.	target	.	2522	Rpl17	NM_001002239	target	.	2574
Nfkbil2	NM_183091	.	.	.	target	.	2523	Nup85	NM_001002929	target	.	2575
2610203E10Rik	NM_183220	.	.	.	target	.	2524	Gnn	NM_001003910	target	.	2576
Stk35	NM_183262	.	.	.	target	.	2525	Atg9a	NM_001003917	target	.	2577
Calu	NM_184053	.	.	.	target	.	2526	Brsk1	NM_001003920	target	.	2578
Nanos3	NM_194059	.	.	.	target	.	2527	Gnn	NM_001003939	target	.	2579
Fxyd1	NM_194321	.	.	.	target	.	2528	Crtc1	NM_001004062	target	.	2580
Unc84b	NM_194342	.	.	.	target	.	2529	Ckap2	NM_001004140	.						

D15Wsu169e	NM_198420	.	.	.	target	.	2533	Hps5	NM_001005248	target	2585
Igsf21	NM_198610	.	.	.	target	.	2534	Gm237	NM_001005419	target	2586
B3qnt4	NM_198611	.	.	.	target	.	2535	Gm996	NM_001005424	target	2587
BC057627	NM_198631	.	.	.	target	.	2536	Zcwpw1	NM_001005426	target	2588
Al646023	NM_198860	.	.	.	target	.	2537	Txlna	NM_001005506	target	2589
Ugcg11	NM_198899	.	.	.	target	.	2538	1100001122Rik	NM_001005589	target	2590
Ppm1m	NM_198931	.	.	.	target	.	2539	Mtus1	NM_001005585	target	2591
Enpp4	NM_199016	.	.	.	target	.	2540	Slc7a6os	NM_001007567	target	2592
BC024868	NM_199149	.	.	.	target	.	2541	D8Erd738e	NM_001007571	target	2593
Rrm2b	NM_199476	.	.	.	target	.	2542	Nol10	NM_001008421	target	2594
Gdpd5	NM_201352	.	.	.	target	.	2543	11-set	NM_001009818	target	2595
Slc6a7	NM_201353	.	.	.	target	.	2544	BC088983	NM_001009951	target	2596
Gm1631	NM_201366	.	.	.	target	.	2545	Ppp1r13l	NM_001010836	target	2597
Plec1	NM_201391	.	.	.	target	.	2546	Fut10	NM_001012517	target	2598
Al316807	NM_001012667	.	.	.	target	target	2599	Ndufb6	NM_001033305	target	2651
Tgfbra1	NM_001013025	.	.	.	target	target	2600	Cox18	NM_001033310	target	2652
Ttf2	NM_001013026	.	.	.	target	target	2601	Gm603	NM_001033338	target	2653
E2f8	NM_001013368	.	.	.	target	target	2602	6430526N21Rik	NM_001033383	target	2654
Nrp	NM_001013372	.	.	.	target	target	2603	Lgr6	NM_001033409	target	2655
Utp18	NM_001013375	.	.	.	target	target	2604	Gal3sta4	NM_001033416	target	2656
Rpp38	NM_001013376	.	.	.	target	target	2605	Gm1103	NM_001033466	target	2657
E130306D19Rik	NM_001013377	.	.	.	target	target	2606	Kcnk6	NM_001033525	target	2658
Usp1	NM_001013378	.	.	.	target	target	2607	C130040N14Rik	NM_001033818	target	2659
Rsad1	NM_001013381	.	.	.	target	target	2608	Ak2	NM_001033966	target	2660
1110054O05Rik	NM_001013577	.	.	.	target	target	2609	Ncoa4	NM_001033988	target	2661
BC072620	NM_001013758	.	.	.	target	target	2610	Ccne2	NM_001037134	target	2662
Amt	NM_001013814	.	.	.	target	target	2611	2310033E01Rik	NM_001037143	target	2663
Zmynd12	NM_001014900	.	.	.	target	target	2612	2700094K13Rik	NM_001037279	target	2664
Espl1	NM_001014976	.	.	.	target	target	2613	Cstf3	NM_001037326	target	2665
Tyw1	NM_001015876	.	.	.	target	target	2614	Zfp1	NM_001037665	target	2666
Rasef	NM_001017427	.	.	.	target	target	2615	LOC432670	NM_001037717	target	2667
Kbtbd7	NM_001024135	.	.	.	target	target	2616	Rai1	NM_001037764	target	2668
Trappc1	NM_001024206	.	.	.	target	target	2617	LOC622404	NM_001037913	target	2669
Cris1	NM_001024385	.	.	.	target	target	2618	EG623661	NM_001037918	target	2670
AA536717	NM_001024512	.	.	.	target	target	2619	Dnajb6	NM_001037940	target	2671
4833426J09Rik	NM_001024606	.	.	.	target	target	2620	Dnajb6	NM_001037941	target	2672
Pcpn	NM_001024622	.	.	.	target	target	2621	Dbi	NM_001037999	target	2673
Cebpz	NM_001024806	.	.	.	target	target	2622	Banf1	NM_001038231	target	2674
Ddx49	NM_001024922	.	.	.	target	target	2623	Usp14	NM_001038589	target	2675
Cyb5d2	NM_001024926	.	.	.	target	target	2624	Gng7	NM_001038655	target	2676
D4Erd429e	NM_001025106	.	.	.	target	target	2625	Cdc42se1	NM_001038708	target	2677
Pus1	NM_001025561	.	.	.	target	target	2626	Seh1l	NM_001039088	target	2678
Pus1	NM_001025562	.	.	.	target	target	2627	Eif4e2	NM_001039169	target	2679
LOC217066	NM_001025564	.	.	.	target	target	2628	Zfhx2	NM_001039198	target	2680
Pdzd4	NM_001029868	.	.	.	target	target	2629	Hdh2	NM_001039201	target	2681
Sec23ip	NM_001029982	.	.	.	target	target	2630	2410004P22Rik	NM_001039206	target	2682
Ndufs1	NM_001030274	.	.	.	target	target	2631	Rkh2d	NM_001039214	target	2683
BC068171	NM_001030307	.	.	.	target	target	2632	EG632778	NM_001039243	target	2684
Mrlp1	NM_001031808	.	.	.	target	target	2633	Wdr37	NM_001039388	target	2685
2610207I05Rik	NM_001031814	.	.	.	target	target	2634	Wdr37	NM_001039389	target	2686
BC065397	NM_001033001	.	.	.	target	target	2635	Tcoer1	NM_001039474	target	2687
Gm166	NM_001033040	.	.	.	target	target	2636	Lipe	NM_001039507	target	2688
Serac1	NM_001033127	.	.	.	target	target	2637	Pnkcd	NM_001039509	target	2689
1200015F23Rik	NM_001033136	.	.	.	target	target	2638	Rm3	NM_001039521	target	2690
1700029J07Rik	NM_001033141	.	.	.	target	target	2639	4930594M22Rik	NM_001039531	target	2691
AU014645	NM_001033201	.	.	.	target	target	2640	Pigl	NM_001039536	target	2692
Gm71	NM_001033236	.	.	.	target	target	2641	4922505G16Rik	NM_001039557	target	2693
BC013491	NM_001033243	.	.	.	target	target	2642	Mif5	NM_001039657	target	2694
Gm266	NM_001033248	.	.	.	target	target	2643	BC022593	NM_001039723	target	2695
09-mar	NM_001033262	.	.	.	target	target	2644	1200003I07Rik	NM_001039967	target	2696
Gis2	NM_001033264	.	.	.	target	target	2645	Txn14	NM_001042408	target	2697
Tmem55b	NM_001033271	.	.	.	target	target	2646	Rab13	NM_001042499	target	2698
Uap111	NM_001033293	.	.	.	target	target	2647	Bim	NM_001042527	target	2699
Ddx31	NM_001033294	.	.	.	target	target	2648	Hbs1l	NM_001042593	target	2700
Gmps	NM_001033300	.	.	.	target	target	2649	LOC208595	NM_001042670	target	2701
Gm129	NM_001033302	.	.	.	target	target	2650	Zfp2	NM_001044697	target	2702
Zfp2	NM_001044698	.	.	.	target	target	2703	Cbr1	NM_0007620	target	2755
Zfp2	NM_001044699	.	.	.	target	target	2704	Ccnd1	NM_0007631	target	2756
Zfp2	NM_001044700	.	.	.	target	target	2705	Ccnf	NM_0007634	target	2757
Gm740	NM_001045525	.	.	.	target	target	2706	Cct2	NM_0007636	target	2758
Morc3	NM_001045529	.	.	.	target	target	2707	Cct5	NM_0007637	target	2759
LOC544797	NM_001045536	.	.	.	target	target	2708	Cdc2a	NM_0007659	target	2760
Pick1	NM_001045558	.	.	.	target	target	2709	Cdc21l	NM_0007661	target	2761
Mink1	NM_001045959	.	.	.	target	target	2710	Cctn3	NM_0007684	target	2762
Mink1	NM_001045964	.	.	.	target	target	2711	Cfi	NM_0007686	target	2763
Snrpa	NM_001046637	.	.	.	target	target	2712	Chrm4	NM_0007699	target	2764
1110020P15Rik	NM_001047158	.	.	.	target	target	2713	Clcn3	NM_0007711	target	2765
Zcsl2	NM_001047433	.	.	.	target	target	2714	Clk4	NM_0007714	target	2766
Rpl38	NM_001048057	.	.	.	target	target	2715	Cox7c	NM_0007749	target	2767
Rpl38	NM_001048058	.	.	.	target	target	2716	Cox8a	NM_0007750	target	2768
Mon1b	NM_001048143	.	.	.	target	target	2717	Crat	NM_0007760	target	2769
Zpata	NM_001048148	.	.	.	target	target	2718	Csnk2a1	NM_0007788	target	2770
9430057O19Rik	NM_001048190	.	.	.	target	target	2719	Cutl2	NM_0007804	target	2771
9430057O19Rik	NM_001048191	.	.	.	target	target	2720	Cyca	NM_0007808	target	2772
9430057O19Rik	NM_001048192	.	.	.	target	target	2721	Dapk3	NM_0007828	target	2773
9430057O19Rik	NM_001048193	.	.	.	target	target	2722	Dbi	NM_0007830	target	2774
9630025I21Rik	NM_001076791	.	.	.	target	target	2723	Dck	NM_0007832	target	2775
Aco1	NM_007386	.	.	.	target	target	2724	Dscr3	NM_0007834	target	2776
Adora2b	NM_007413	.	.	.	target	target	2725	Ddit3	NM_0007837	target	2777
Amd2	NM_007444	.	.	.	target	target	2726	Ddost	NM_0007838	target	2778
Prdx3	NM_007452	.	.	.	target	target	2727	Dhx9	NM_0007842	target	2779
Prdx6	NM_007453	.	.	.	target	target	2728	Degs1	NM_0007853	target	2780
Ap1g2	NM_007455	.	.	.	target	target	2729	Slc29a2	NM_0007854	target	2781
Birc2	NM_007465	.	.	.	target	target	2730	Dffb	NM_0007859	target	2782
Arf1	NM_007476	.	.	.	target	target	2731	Dlgh1	NM_0007862	target	2783
Arf3	NM_007478	.	.	.	target	target	2732	Dlx4	NM_0007867	target	2784
Arf6	NM_007481	.	.	.	target	target	2733	Dnajc1	NM_0007869	target	2785
Atf1	NM_007497	.	.	.	target	target	2734	Drd4	NM_0007878	target	2786
Atm	NM_007499	.	.	.	target	target	2735	Eef2	NM_0007907	target	2787
Atp5g1	NM_007506	.	.	.	target	target	2736	Ddx19a	NM_0007916	target	2788
Atp6v1a	NM_007508	.	.	.	target	target	2737	Eif4ebp1	NM_0007918	target	2789
Atp6v1e1	NM_007510	.	.	.	target	target										

Bckdha	NM_007533	.	.	.	target	2746	Fbl	NM_007991	.	.	.	target	2798
Bid	NM_007544	.	.	.	target	2747	Fbp2	NM_007994	.	.	.	target	2799
Blm	NM_007550	.	.	.	target	2748	Fen1	NM_007999	.	.	.	target	2800
Bmp8b	NM_007559	.	.	.	target	2749	Fzd7	NM_008057	.	.	.	target	2801
Bmpr2	NM_007561	.	.	.	target	2750	Fzd8	NM_008058	.	.	.	target	2802
C1qbp	NM_007573	.	.	.	target	2751	Ganab	NM_008060	.	.	.	target	2803
Caml	NM_007596	.	.	.	target	2752	Gaa	NM_008064	.	.	.	target	2804
Canx	NM_007597	.	.	.	target	2753	Gdf9	NM_008110	.	.	.	target	2805
Casp2	NM_007610	.	.	.	target	2754	Gdi2	NM_008112	.	.	.	target	2806
Slc6a9	NM_008135	.	.	.	target	2807	Nme1	NM_008704	.	.	.	target	2859
Gna-rt1	NM_008136	.	.	.	target	2808	Nme2	NM_008705	.	.	.	target	2860
Gnat2	NM_008141	.	.	.	target	2809	Npm1	NM_008722	.	.	.	target	2861
Gnb2l1	NM_008143	.	.	.	target	2810	Npm3	NM_008723	.	.	.	target	2862
Bscl2	NM_008144	.	.	.	target	2811	Nrtn	NM_008738	.	.	.	target	2863
Gpl1	NM_008155	.	.	.	target	2812	Nrs2	NM_008747	.	.	.	target	2864
Gnk5	NM_008168	.	.	.	target	2813	Nxph1	NM_008751	.	.	.	target	2865
Grin1	NM_008169	.	.	.	target	2814	Pabpc1	NM_008774	.	.	.	target	2866
Nr3c1	NM_008173	.	.	.	target	2815	Pafah1b3	NM_008776	.	.	.	target	2867
Gtf2h1	NM_008186	.	.	.	target	2816	Pax5	NM_008782	.	.	.	target	2868
Thumpd3	NM_008188	.	.	.	target	2817	Igbb1	NM_008784	.	.	.	target	2869
Guk1	NM_008193	.	.	.	target	2818	Pde6d	NM_008801	.	.	.	target	2870
Hdgf	NM_008231	.	.	.	target	2819	Pfk1	NM_008826	.	.	.	target	2871
Hes2	NM_008236	.	.	.	target	2820	Pgk1	NM_008828	.	.	.	target	2872
Hhex	NM_008245	.	.	.	target	2821	Phb	NM_008831	.	.	.	target	2873
Map4k1	NM_008279	.	.	.	target	2822	Pick1	NM_008837	.	.	.	target	2874
Hrsp12	NM_008287	.	.	.	target	2823	Phox2b	NM_008888	.	.	.	target	2875
Hsf1	NM_008296	.	.	.	target	2824	Pnn	NM_008891	.	.	.	target	2876
Hspa4	NM_008300	.	.	.	target	2825	Pola1	NM_008892	.	.	.	target	2877
Hspe1	NM_008303	.	.	.	target	2826	Pola2	NM_008893	.	.	.	target	2878
Hif9c	NM_008307	.	.	.	target	2827	Pold2	NM_008894	.	.	.	target	2879
Icam5	NM_008319	.	.	.	target	2828	Pp2b	NM_008906	.	.	.	target	2880
Id3	NM_008321	.	.	.	target	2829	Ppia	NM_008907	.	.	.	target	2881
Idh3g	NM_008323	.	.	.	target	2830	Ppm1a	NM_008910	.	.	.	target	2882
Ifi2	NM_008332	.	.	.	target	2831	Prkar2a	NM_008924	.	.	.	target	2883
Il9r	NM_008374	.	.	.	target	2832	Psen1	NM_008943	.	.	.	target	2884
Kcnb1	NM_008379	.	.	.	target	2833	Psm1	NM_008944	.	.	.	target	2885
Eif3s6	NM_008388	.	.	.	target	2834	Psm2	NM_008945	.	.	.	target	2886
Itga6	NM_008397	.	.	.	target	2835	Psm3	NM_008948	.	.	.	target	2887
Itgb1bp1	NM_008403	.	.	.	target	2836	Psm5	NM_008950	.	.	.	target	2888
Str3a	NM_008408	.	.	.	target	2837	Pten	NM_008960	.	.	.	target	2889
Kcnk1	NM_008430	.	.	.	target	2838	Ptrf	NM_008986	.	.	.	target	2890
Kcnu1	NM_008432	.	.	.	target	2839	Rab23	NM_008999	.	.	.	target	2891
Kpna1	NM_008465	.	.	.	target	2840	Rab24	NM_009000	.	.	.	target	2892
Mycl1	NM_008506	.	.	.	target	2841	Rab3a	NM_009001	.	.	.	target	2893
Lmp	NM_008511	.	.	.	target	2842	Map4k2	NM_009006	.	.	.	target	2894
Ltc4s	NM_008521	.	.	.	target	2843	Rad23b	NM_009011	.	.	.	target	2895
Mcm3	NM_008563	.	.	.	target	2844	Rad50	NM_009012	.	.	.	target	2896
Mcm5	NM_008566	.	.	.	target	2845	Rad51ap1	NM_009013	.	.	.	target	2897
Mcm6	NM_008567	.	.	.	target	2846	Rad54l	NM_009015	.	.	.	target	2898
Mcm7	NM_008568	.	.	.	target	2847	Rbbp4	NM_009030	.	.	.	target	2899
Men1	NM_008583	.	.	.	target	2848	Rbm4	NM_009032	.	.	.	target	2900
Mest	NM_008590	.	.	.	target	2849	Rbmxt1	NM_009033	.	.	.	target	2901
Mns1	NM_008613	.	.	.	target	2850	Rela	NM_009045	.	.	.	target	2902
Mtap4	NM_008633	.	.	.	target	2851	Tnm27	NM_009054	.	.	.	target	2903
Mthfd2	NM_008638	.	.	.	target	2852	Rag1ap1	NM_009057	.	.	.	target	2904
Mut	NM_008650	.	.	.	target	2853	Ring1	NM_009066	.	.	.	target	2905
Myd116	NM_008654	.	.	.	target	2854	Rnps1	NM_009070	.	.	.	target	2906
Myo1c	NM_008659	.	.	.	target	2855	Rpl26	NM_009080	.	.	.	target	2907
Naga	NM_008669	.	.	.	target	2856	Rpl28	NM_009081	.	.	.	target	2908
Nfe2l1	NM_008686	.	.	.	target	2857	Rpl29	NM_009082	.	.	.	target	2909
Nipsnap1	NM_008698	.	.	.	target	2858	Rpl30	NM_009083	.	.	.	target	2910
Rpo1-1	NM_009085	.	.	.	target	2911	Xrcc5	NM_009533	.	.	.	target	2963
Rpo1-2	NM_009086	.	.	.	target	2912	Yap1	NM_009534	.	.	.	target	2964
Rpo1-3	NM_009087	.	.	.	target	2913	Ywhae	NM_009536	.	.	.	target	2965
Rpo1-4	NM_009088	.	.	.	target	2914	Yy1	NM_009537	.	.	.	target	2966
Rps15	NM_009091	.	.	.	target	2915	Zfp105	NM_009544	.	.	.	target	2967
Rps4x	NM_009094	.	.	.	target	2916	Pcgf2	NM_009545	.	.	.	target	2968
Rps5	NM_009095	.	.	.	target	2917	Zfp94	NM_009568	.	.	.	target	2969
Rps6	NM_009096	.	.	.	target	2918	Map3k12	NM_009582	.	.	.	target	2970
Rps6ka1	NM_009097	.	.	.	target	2919	Dnajc2	NM_009584	.	.	.	target	2971
Rps8	NM_009098	.	.	.	target	2920	Abi1	NM_009594	.	.	.	target	2972
Rrm1	NM_009103	.	.	.	target	2921	Accn2	NM_009597	.	.	.	target	2973
Rrm2	NM_009104	.	.	.	target	2922	Parp2	NM_009632	.	.	.	target	2974
Rsu1	NM_009105	.	.	.	target	2923	Adsl	NM_009634	.	.	.	target	2975
S100a13	NM_009113	.	.	.	target	2924	Akr1b3	NM_009658	.	.	.	target	2976
Sap18	NM_009119	.	.	.	target	2925	Amd1	NM_009665	.	.	.	target	2977
Sec23a	NM_009147	.	.	.	target	2926	Apex1	NM_009687	.	.	.	target	2978
Sfrs5	NM_009159	.	.	.	target	2927	Aqr	NM_009702	.	.	.	target	2979
Shmt1	NM_009171	.	.	.	target	2928	Atox1	NM_009720	.	.	.	target	2980
Siah1b	NM_009173	.	.	.	target	2929	Atp5f1	NM_009725	.	.	.	target	2981
Sfrs10	NM_009186	.	.	.	target	2930	Bckdk	NM_009739	.	.	.	target	2982
Slc16a1	NM_009196	.	.	.	target	2931	Bcl7b	NM_009745	.	.	.	target	2983
Snap23	NM_009222	.	.	.	target	2932	Glb1	NM_009752	.	.	.	target	2984
Snrp70	NM_009224	.	.	.	target	2933	Brc2	NM_009765	.	.	.	target	2985
Snrpd1	NM_009226	.	.	.	target	2934	Bub1b	NM_009773	.	.	.	target	2986
Spnb2	NM_009260	.	.	.	target	2935	Pdia4	NM_009787	.	.	.	target	2987
Sephs2	NM_009266	.	.	.	target	2936	Aspm	NM_009791	.	.	.	target	2988
Srm	NM_009272	.	.	.	target	2937	Car11	NM_009800	.	.	.	target	2989
Ssr4	NM_009279	.	.	.	target	2938	Cone2	NM_009830	.	.	.	target	2990
Ss18	NM_009280	.	.	.	target	2939	Cong1	NM_009831	.	.	.	target	2991
Stat1	NM_009283	.	.	.	target	2940	Ccnk	NM_009832	.	.	.	target	2992
Taf6	NM_009315	.	.	.	target	2941	Cent1	NM_009833	.	.	.	target	2993
Tarbp2	NM_009319	.	.	.	target	2942	Cct3	NM_009836	.	.	.	target	2994
Tbxa2r	NM_009325	.	.	.	target	2943	Cct8	NM_009840	.	.	.	target	2995
Tcf15	NM_009328	.	.	.	target	2944	Cd68	NM_009853	.	.	.	target	2996
Acat2	NM_009338	.	.	.	target	2945	Cdh1	NM_009864	.	.	.	target	2997
Tert	NM_009354	.	.	.	target	2946	Cdk4	NM_009870	.	.	.	target	2998
Tfdp1	NM_009361	.	.	.	target	2947	Cdk6	NM_009873	.	.	.	target	2999
Tgfb2	NM_009367	.	.	.	target	2948	Cdk7	NM_009874	.	.	.	target	3000
Tkt	NM_009388	.	.	.	target	2949	Cdkn2d	NM_009878	.	.	.	target	3001
Ran	NM_009391	.	.	.	target	2950	Cicn2	NM_009900	.	.	.	target	3002
Top1	NM_009408	.	.	.	target	2951	Cxcr4	NM_009911	.	.	.	target	3003
Tpp2	NM_009418	.	.	.	target	2952	Cops2	NM_009939	.	.	.	target	3004
Traf4	NM_009423	.	.	.	target	2953	Igf2bp1	NM_009951	.	.	.	target	3005
Tst	NM_009437	.	.	.	target	2954	Csnk2b	NM_009975	.	.	.	target	3006
Psmd3	NM_009439	.	.	.	target	2955	Ctbp2	NM_009980	.	.	.	target	3007
Tuba4	NM_009447	.	.	.	target	2956	Ctsd	NM_009983	.	.	.	target	3008
Ube2l3	NM_009456	.	.	.	target	2957	Dbt	NM_010022	.	.	.	target	3009
Ube2b	NM_009458	.	.	.	target	2958	Dci	NM_010023	.	.	.	target	3010

Umps	NM_009471	target	2959	Dhfr	NM_010049	target	3011
Uros	NM_009479	target	2960	Dok2	NM_010071	target	3012
Uty	NM_009484	target	2961	Dpm1	NM_010072	target	3013
Xrcc1	NM_009532	target	2962	Dvl1	NM_010091	target	3014
E2f3	NM_010093	target	3015	Matr3	NM_010771	target	3067
Rhbd1f1	NM_010117	target	3016	Mea1	NM_010787	target	3068
Emp3	NM_010129	target	3017	Mif	NM_010798	target	3069
Fgf8	NM_010205	target	3018	Psmc7	NM_010817	target	3070
Fh1	NM_010209	target	3019	Mpg	NM_010822	target	3071
Ffx1	NM_010218	target	3020	Msh3	NM_010829	target	3072
Fkbp8	NM_010223	target	3021	Ncl	NM_010880	target	3073
Fpgs	NM_010236	target	3022	Ndufs6	NM_010888	target	3074
Fif1	NM_010240	target	3023	Nedd4	NM_010890	target	3075
Fut4	NM_010242	target	3024	Nefh	NM_010904	target	3076
Xrcc6	NM_010247	target	3025	Nfs1	NM_010911	target	3077
Gamt	NM_010255	target	3026	NfyA	NM_010913	target	3078
Gart	NM_010256	target	3027	Nsmaf	NM_010945	target	3079
Gdap2	NM_010269	target	3028	Ogdh	NM_010956	target	3080
Gck	NM_010292	target	3029	P4hb	NM_011032	target	3081
Gnas	NM_010309	target	3030	Prdx1	NM_011034	target	3082
Gnb5	NM_010313	target	3031	Pcdc6	NM_011051	target	3083
Gng3	NM_010316	target	3032	Pcdc11	NM_011053	target	3084
Gnpat	NM_010322	target	3033	Pfdn2	NM_011070	target	3085
Got2	NM_010325	target	3034	Abcb1b	NM_011075	target	3086
Gp1bb	NM_010327	target	3035	Prkd	NM_011103	target	3087
Emb	NM_010330	target	3036	Pkdrej	NM_011105	target	3088
Gpaa1	NM_010331	target	3037	Pa2g4	NM_011119	target	3089
Grb7	NM_010346	target	3038	Ppp5c	NM_011155	target	3090
Gstt2	NM_010361	target	3039	Prodh	NM_011172	target	3091
Gsto1	NM_010362	target	3040	PsmA3	NM_011184	target	3092
Gstz1	NM_010363	target	3041	Psmb1	NM_011185	target	3093
H2-Ke2	NM_010385	target	3042	Psmc2	NM_011188	target	3094
Hdac3	NM_010411	target	3043	Psmc3	NM_011192	target	3095
Hipk3	NM_010434	target	3044	Ptp4a1	NM_011200	target	3096
Hmox1	NM_010442	target	3045	Ptpn3	NM_011207	target	3097
Hlnpab	NM_010448	target	3046	Pts	NM_011220	target	3098
Hsd17b7	NM_010476	target	3047	Rab18	NM_011225	target	3099
Hspd1	NM_010477	target	3048	Rabggb	NM_011231	target	3100
Elavl3	NM_010487	target	3049	Rad1	NM_011232	target	3101
Ifi3	NM_010561	target	3050	Rad52	NM_011236	target	3102
Ilk	NM_010562	target	3051	Ranbp1	NM_011239	target	3103
Inha	NM_010564	target	3052	Ranbp2	NM_011240	target	3104
Jag2	NM_010588	target	3053	Recc1	NM_011258	target	3105
Kcnab2	NM_010598	target	3054	C80913	NM_011274	target	3106
Kcnab3	NM_010599	target	3055	Rnaseh1	NM_011275	target	3107
Kif11	NM_010615	target	3056	Rnf4	NM_011278	target	3108
Kpna2	NM_010655	target	3057	Rnf7	NM_011279	target	3109
Ldha	NM_010699	target	3058	Rpa2	NM_011284	target	3110
Ldlr	NM_010700	target	3059	Rpl10a	NM_011287	target	3111
Lig3	NM_010716	target	3060	Mrlp23	NM_011288	target	3112
Lipe	NM_010719	target	3061	Rpl27	NM_011289	target	3113
Tmed1	NM_010744	target	3062	Rpl7	NM_011291	target	3114
Mxd4	NM_010753	target	3063	Rpl9	NM_011292	target	3115
Mafk	NM_010757	target	3064	Polr2j	NM_011293	target	3116
Magoh	NM_010760	target	3065	Rps18	NM_011296	target	3117
Man2b1	NM_010764	target	3066	Rps7	NM_011300	target	3118
Ruvbl2	NM_011304	target	3119	Psmc13	NM_011875	target	3171
Rxb	NM_011306	target	3120	Spry1	NM_011896	target	3172
Ncor1	NM_011308	target	3121	Mpdu1	NM_011900	target	3173
Khdrrb1	NM_011317	target	3122	Whsc2	NM_011914	target	3174
Sec61g	NM_011343	target	3123	Decr2	NM_011933	target	3175
Sfrs2	NM_011358	target	3124	Flo	NM_011936	target	3176
Sh2b1	NM_011363	target	3125	Map2k6	NM_011943	target	3177
Sin3a	NM_011378	target	3126	Mapk1	NM_011949	target	3178
Six5	NM_011383	target	3127	Nubp1	NM_011955	target	3179
Slc20a2	NM_011394	target	3128	Nubp2	NM_011956	target	3180
Smarcb1	NM_011418	target	3129	Orc5	NM_011959	target	3181
Smn1	NM_011420	target	3130	Parg	NM_011960	target	3182
Sncg	NM_011430	target	3131	PsmA5	NM_011967	target	3183
Eftud2	NM_011431	target	3132	PsmA6	NM_011968	target	3184
Snrpc	NM_011432	target	3133	PsmA7	NM_011969	target	3185
Sod1	NM_011434	target	3134	Psmb2	NM_011970	target	3186
Spint2	NM_011464	target	3135	Poli	NM_011972	target	3187
Srebf1	NM_011480	target	3136	Rpl27a	NM_011975	target	3188
Nhp21l	NM_011482	target	3137	Slc27a1	NM_011977	target	3189
Aurka	NM_011497	target	3138	Mmp23	NM_011985	target	3190
Strap	NM_011499	target	3139	Cln8	NM_012000	target	3191
Surf5	NM_011513	target	3140	Cops6	NM_012002	target	3192
Sdc1	NM_011519	target	3141	Cops7a	NM_012003	target	3193
Taldo1	NM_011528	target	3142	Eif2s3x	NM_012010	target	3194
Task1	NM_011571	target	3143	Exo1	NM_012012	target	3195
Nr1d2	NM_011584	target	3144	Ecsit	NM_012029	target	3196
Timm17a	NM_011590	target	3145	Nit1	NM_012049	target	3197
Timm44	NM_011592	target	3146	Rps3	NM_012052	target	3198
Tie1	NM_011599	target	3147	Asns	NM_012055	target	3199
Top2a	NM_011623	target	3148	Pde6g	NM_012065	target	3200
Hsp90b1	NM_011631	target	3149	Adrb3	NM_013462	target	3201
Ttrc	NM_011638	target	3150	Gla	NM_013463	target	3202
Ube2i	NM_011665	target	3151	Bop1	NM_013481	target	3203
Ube3a	NM_011668	target	3152	Btk	NM_013482	target	3204
Vars2	NM_011690	target	3153	Cnbp	NM_013493	target	3205
Dctn6	NM_011722	target	3154	Leprel2	NM_013534	target	3206
Zfp1	NM_011742	target	3155	Emg1	NM_013536	target	3207
Zfp106	NM_011743	target	3156	Gstp1	NM_013541	target	3208
Zfp259	NM_011752	target	3157	H2-Ke6	NM_013543	target	3209
Ash2l	NM_011791	target	3158	Eif2ak1	NM_013557	target	3210
Banf1	NM_011793	target	3159	Hsp110	NM_013559	target	3211
Farslb	NM_011811	target	3160	Lifr	NM_013584	target	3212
Fiz1	NM_011813	target	3161	Naca	NM_013608	target	3213
E430034L04Rik	NM_011816	target	3162	Odc1	NM_013614	target	3214
Hcst	NM_011827	target	3163	Odc1	NM_013614	target	3215
Hs2st1	NM_011828	target	3164	Sypl	NM_013635	target	3216
Impdh2	NM_011830	target	3165	Psmb10	NM_013640	target	3217
Map2k5	NM_011840	target	3166	Surf1	NM_013677	target	3218
Mta2	NM_011842	target	3167	Surf2	NM_013678	target	3219
Dnajb6	NM_011847	target	3168	Tbp	NM_013684	target	3220
Nek4	NM_011849	target	3169	Tcp1	NM_013686	target	3221
Pcbp1	NM_011865	target	3170	Tctc1	NM_013688	target	3222
Cd52	NM_013706	target	3223	Nub1	NM_016736	target	3275

G3bp	NM_013716				target	3224	Rpl13	NM_016738				target	3276
Mix1	NM_013729				target	3225	Gpiap1	NM_016739				target	3277
Nufip1	NM_013745				target	3226	Ctps	NM_016748				target	3278
Phlda3	NM_013750				target	3227	Slc35b1	NM_016752				target	3279
Nbn	NM_013752				target	3228	Rgs14	NM_016758				target	3280
Dnajb9	NM_013760				target	3229	Hadh2	NM_016763				target	3281
Rpl3	NM_013762				target	3230	Pbx3	NM_016768				target	3282
Tbl2	NM_013763				target	3231	Atp5b	NM_016774				target	3283
Pmf5	NM_013768				target	3232	Dnajc5	NM_016775				target	3284
Yme11	NM_013771				target	3233	Nasp	NM_016777				target	3285
Ptdss2	NM_013782				target	3234	Nptx2	NM_016789				target	3286
Naqlu	NM_013792				target	3235	Txn1	NM_016792				target	3287
Atp5l	NM_013795				target	3236	Srpk1	NM_016795				target	3288
Hk2	NM_013820				target	3237	Srm1	NM_016799				target	3289
Trove2	NM_013835				target	3238	Rgl1	NM_016846				target	3290
Abcf2	NM_013853				target	3239	Bysl	NM_016859				target	3291
Tnfrsf19	NM_013869				target	3240	Vti1a	NM_016862				target	3292
Pmm1	NM_013872				target	3241	Hif3a	NM_016868				target	3293
Sult4a1	NM_013873				target	3242	Tomm40	NM_016871				target	3294
Gtse1	NM_013882				target	3243	Deaf1	NM_016874				target	3295
Fbxw2	NM_013890				target	3244	Cnot4	NM_016877				target	3296
Timm9	NM_013896				target	3245	Pmm2	NM_016881				target	3297
Timm8b	NM_013897				target	3246	Hnrpc	NM_016884				target	3298
Timm10	NM_013899				target	3247	Ppp2r1a	NM_016891				target	3299
Fbxl6	NM_013909				target	3248	Ccs	NM_016892				target	3300
Snai3	NM_013914				target	3249	Ak2	NM_016895				target	3301
Adat1	NM_013925				target	3250	Timm23	NM_016897				target	3302
Siva	NM_013929				target	3251	Rab25	NM_016899				target	3303
Mapk8ip3	NM_013931				target	3252	Nphp1	NM_016902				target	3304
Ddx25	NM_013932				target	3253	Galk1	NM_016905				target	3305
Vapa	NM_013933				target	3254	Sec61a1	NM_016906				target	3306
Slc33a1	NM_015728				target	3255	Tsnax	NM_016909				target	3307
Casp9	NM_015733				target	3256	Ppm1d	NM_016910				target	3308
Galt4	NM_015737				target	3257	Tcir1	NM_016921				target	3309
Abce1	NM_015751				target	3258	Rps3a	NM_016959				target	3310
Dos	NM_015761				target	3259	Stag3	NM_016964				target	3311
Hspa14	NM_015765				target	3260	Ccnl	NM_017367				target	3312
Snrpa	NM_015782				target	3261	Zranb2	NM_017381				target	3313
Zbbp	NM_015785				target	3262	Rab11a	NM_017382				target	3314
Fbxo8	NM_015791				target	3263	Clpp	NM_017393				target	3315
Dic1	NM_015802				target	3264	Ddx20	NM_017397				target	3316
Nt5c	NM_015807				target	3265	Mrpl39	NM_017404				target	3317
Polg2	NM_015810				target	3266	Pbx2	NM_017463				target	3318
Hmga1	NM_016660				target	3267	Copp	NM_017477				target	3319
Ahcy	NM_016661				target	3268	Mre11a	NM_018736				target	3320
Mxd3	NM_016662				target	3269	Rai12	NM_018740				target	3321
Chek2	NM_016681				target	3270	Bet1l	NM_018742				target	3322
Sfrp4	NM_016687				target	3271	Eif357	NM_018749				target	3323
Map3k6	NM_016693				target	3272	Nme6	NM_018757				target	3324
Coil	NM_016706				target	3273	Apba3	NM_018758				target	3325
Mink1	NM_016713				target	3274	Prpf40a	NM_018785				target	3326
Mkm1	NM_018810				target	3275	Stub1	NM_019719				target	3327
Abhd2	NM_018811				target	3276	Cyb561d2	NM_019720				target	3328
Cpsf3	NM_018813				target	3277	Gps2	NM_019726				target	3329
Apom	NM_018816				target	3278	Nme3	NM_019730				target	3330
Slc23a2	NM_018824				target	3279	Nme4	NM_019731				target	3331
Fbnp4	NM_018828				target	3280	Foxo3a	NM_019740				target	3332
Ap3m1	NM_018829				target	3281	Ncoa4	NM_019744				target	3333
Rplp1	NM_018853				target	3282	Zip113	NM_019747				target	3334
Agpat1	NM_018862				target	3283	Hira2	NM_019752				target	3335
Nol5	NM_018868				target	3284	Tubd1	NM_019756				target	3336
Snx12	NM_018875				target	3285	Ptges3	NM_019766				target	3337
Setdb1	NM_018877				target	3286	Morf4l2	NM_019768				target	3338
Paxip1	NM_018878				target	3287	1110004F10Rik	NM_019772				target	3339
Tusca4	NM_018879				target	3288	Akap8	NM_019774				target	3340
2410003P15Rik	NM_018888				target	3289	AL033314	NM_019776				target	3341
Pigb	NM_018889				target	3290	Vps29	NM_019780				target	3342
Pabpn1	NM_019402				target	3291	Pldn	NM_019788				target	3343
Rnf5	NM_019403				target	3292	Ube2g2	NM_019803				target	3344
B3gal4	NM_019420				target	3293	Aatf	NM_019816				target	3345
Cd320	NM_019421				target	3294	Timm22	NM_019818				target	3346
Rpp30	NM_019428				target	3295	Arcp3	NM_019824				target	3347
Ndufb11	NM_019435				target	3296	Trpc4ap	NM_019828				target	3348
Ndufa1	NM_019443				target	3297	Stx5a	NM_019829				target	3349
Myo10	NM_019472				target	3298	Pmt1	NM_019830				target	3350
Gprk2l	NM_019497				target	3299	2610024G14Rik	NM_019836				target	3351
Pdss1	NM_019501				target	3300	Rpl36a	NM_019865				target	3352
Dgke	NM_019505				target	3301	Hnrph2	NM_019868				target	3353
Rabggta	NM_019519				target	3302	Ard1	NM_019870				target	3354
Dscr2	NM_019537				target	3303	Uba52	NM_019883				target	3355
Ddx21	NM_019553				target	3304	Txn2	NM_019913				target	3356
Uchl5	NM_019562				target	3305	Dnajb12	NM_019965				target	3357
Rev1l	NM_019570				target	3306	Arl10	NM_019968				target	3358
Wwox	NM_019573				target	3307	Psrc1	NM_019976				target	3359
Patz1	NM_019574				target	3308	Selk	NM_019979				target	3360
Scamp4	NM_019575				target	3309	Ick	NM_019987				target	3361
Gtbbp2	NM_019581				target	3310	Aldh9a1	NM_019993				target	3362
Tbc1d1	NM_019636				target	3311	Alg2	NM_019998				target	3363
Pitpnb	NM_019640				target	3312	Frap1	NM_020009				target	3364
Rpn2	NM_019642				target	3313	Pigo	NM_020035				target	3365
Tera	NM_019643				target	3314	Trfp	NM_020048				target	3366
Metap2	NM_019648				target	3315	Nrxn2	NM_020253				target	3367
Hsd17b12	NM_019657				target	3316	Pdxp	NM_020271				target	3368
Ykt6	NM_019661				target	3317	Ddx24	NM_020494				target	3369
Stam2	NM_019667				target	3318	Xpo4	NM_020506				target	3370
Ankrd49	NM_019683				target	3319	Fzd2	NM_020510				target	3371
Ruvbl1	NM_019685				target	3320	Park7	NM_020569				target	3372
Pus1	NM_019700				target	3321	Angptl4	NM_020581				target	3373
Hbs1l	NM_019702				target	3322	Terf2ip	NM_020584				target	3374
Rbck1	NM_019705				target	3323	Golga7	NM_020585				target	3375
Mbtps1	NM_019709				target	3324	Zc3h8	NM_020594				target	3376
Smc1a	NM_019710				target	3325	Rlbp1	NM_020599				target	3377
Orc6l	NM_019716				target	3326	Wdr46	NM_020603				target	3378
Atp5c1	NM_020615				target	3327	Oxct2a	NM_022033				target	3379
D930014E17Rik	NM_020616				target	3328	Milt1	NM_022328				target	3380
Spnb3	NM_021287				target	3329	Herpud1	NM_022331				target	3381
Dbil5	NM_021294				target	3330	Abhd8	NM_022419				target	3382
Wdr12	NM_021312				target	3331	Sirt3	NM_022433				target	3383
Tacc2	NM_021314				target	3332	Thop1	NM_022653				target	3384

Hspc171	NM_025486	.	.	.	target	3650	Pspc1	NM_025682	.	.	.	target	3702
2310004L02Rik	NM_025504	.	.	.	target	3651	Sltm	NM_025690	.	.	.	target	3703
Bizf1	NM_025505	.	.	.	target	3652	Tmem41a	NM_025693	.	.	.	target	3704
2310008M10Rik	NM_025509	.	.	.	target	3653	3230401D17Rik	NM_025699	.	.	.	target	3705
Exosc3	NM_025513	.	.	.	target	3654	4432406C05Rik	NM_025708	.	.	.	target	3706
Rtcd1	NM_025517	.	.	.	target	3655	4933439F18Rik	NM_025757	.	.	.	target	3707
Dus2l	NM_025518	.	.	.	target	3656	4933434E20Rik	NM_025762	.	.	.	target	3708
2310011J03Rik	NM_025521	.	.	.	target	3657	4933439F11Rik	NM_025766	.	.	.	target	3709
Srp19	NM_025527	.	.	.	target	3658	Pkrp1	NM_025774	.	.	.	target	3710
Nudt8	NM_025529	.	.	.	target	3659	Bss1l	NM_025784	.	.	.	target	3711
Alkbh7	NM_025538	.	.	.	target	3660	0610006i08Rik	NM_025791	.	.	.	target	3712
2410001C21Rik	NM_025542	.	.	.	target	3661	Wdr45l	NM_025793	.	.	.	target	3713
Mrps15	NM_025544	.	.	.	target	3662	Ncapf2	NM_025795	.	.	.	target	3714
Rsl1d1	NM_025546	.	.	.	target	3663	Hint3	NM_025798	.	.	.	target	3715
Ckap1	NM_025548	.	.	.	target	3664	Serbp1	NM_025814	.	.	.	target	3716
2410004B18Rik	NM_025555	.	.	.	target	3665	1200016B10Rik	NM_025819	.	.	.	target	3717
1810049H13Rik	NM_025560	.	.	.	target	3666	Appbp2	NM_025825	.	.	.	target	3718
2010012O05Rik	NM_025563	.	.	.	target	3667	Lman2	NM_025828	.	.	.	target	3719
Cyc1	NM_025567	.	.	.	target	3668	Mpi1	NM_025837	.	.	.	target	3720
Mrp120	NM_025570	.	.	.	target	3669	1110004B13Rik	NM_025838	.	.	.	target	3721
2810428I15Rik	NM_025577	.	.	.	target	3670	Bzw2	NM_025840	.	.	.	target	3722
Mrps25	NM_025578	.	.	.	target	3671	Prpf38b	NM_025845	.	.	.	target	3723
Taf12	NM_025579	.	.	.	target	3672	Sdhd	NM_025848	.	.	.	target	3724
Rpl15	NM_025586	.	.	.	target	3673	Ddx18	NM_025860	.	.	.	target	3725
Rpl36al	NM_025589	.	.	.	target	3674	Acad8	NM_025862	.	.	.	target	3726
Rpl35	NM_025592	.	.	.	target	3675	Tnm59	NM_025863	.	.	.	target	3727
Mrp15l	NM_025595	.	.	.	target	3676	2310028N02Rik	NM_025864	.	.	.	target	3728
2610524G07Rik	NM_025596	.	.	.	target	3677	Txnac14	NM_025868	.	.	.	target	3729
2610528E23Rik	NM_025599	.	.	.	target	3678	Trit1	NM_025873	.	.	.	target	3730
Ccdc59	NM_025602	.	.	.	target	3679	Rbm8a	NM_025875	.	.	.	target	3731
1810042K04Rik	NM_025604	.	.	.	target	3680	2410002O22Rik	NM_025879	.	.	.	target	3732
Asrg1	NM_025610	.	.	.	target	3681	2410002F23Rik	NM_025880	.	.	.	target	3733
Eid1	NM_025613	.	.	.	target	3682	Zdhhc6	NM_025883	.	.	.	target	3734
2810004N23Rik	NM_025615	.	.	.	target	3683	Med19	NM_025885	.	.	.	target	3735
Timm50	NM_025616	.	.	.	target	3684	1500003O22Rik	NM_025897	.	.	.	target	3736
Metap1	NM_025633	.	.	.	target	3685	Irf2	NM_025903	.	.	.	target	3737
2310079N02Rik	NM_025636	.	.	.	target	3686	1600012F09Rik	NM_025904	.	.	.	target	3738
Exosc1	NM_025644	.	.	.	target	3687	1600012F09Rik	NM_025904	.	.	.	target	3739
Cris1	NM_025646	.	.	.	target	3688	Mina	NM_025910	.	.	.	target	3740
Farsla	NM_025648	.	.	.	target	3689	Tmem88	NM_025915	.	.	.	target	3741
Mad2l1bp	NM_025649	.	.	.	target	3690	Rpl11	NM_025919	.	.	.	target	3742
Itpa	NM_025922	.	.	.	target	3743	Eif2s3	NM_026114	.	.	.	target	3795
Mrp145	NM_025927	.	.	.	target	3744	2410127L17Rik	NM_026120	.	.	.	target	3796
Rabl4	NM_025931	.	.	.	target	3745	Unc50	NM_026123	.	.	.	target	3797
Higd2a	NM_025933	.	.	.	target	3746	Erp29	NM_026129	.	.	.	target	3798
Rio2	NM_025934	.	.	.	target	3747	Spr	NM_026130	.	.	.	target	3799
Tbc1d7	NM_025935	.	.	.	target	3748	3230401101Rik	NM_026140	.	.	.	target	3800
Paics	NM_025939	.	.	.	target	3749	Nudcd1	NM_026149	.	.	.	target	3801
Polr3d	NM_025945	.	.	.	target	3750	4921536K21Rik	NM_026150	.	.	.	target	3802
2010100O12Rik	NM_025946	.	.	.	target	3751	Retsat	NM_026159	.	.	.	target	3803
Lsm14a	NM_025948	.	.	.	target	3752	Ergic2	NM_026168	.	.	.	target	3804
2610529C04Rik	NM_025952	.	.	.	target	3753	120001118Rik	NM_026177	.	.	.	target	3805
1700012G19Rik	NM_025954	.	.	.	target	3754	D1Ert161e	NM_026187	.	.	.	target	3806
2310038H17Rik	NM_025964	.	.	.	target	3755	Calocco1	NM_026192	.	.	.	target	3807
1700034H14Rik	NM_025969	.	.	.	target	3756	Ap4b1	NM_026193	.	.	.	target	3808
Zbtb80s	NM_025970	.	.	.	target	3757	Atic	NM_026195	.	.	.	target	3809
Rpl14	NM_025974	.	.	.	target	3758	2010200O16Rik	NM_026198	.	.	.	target	3810
Btar	NM_025976	.	.	.	target	3759	Ahi1	NM_026203	.	.	.	target	3811
2510048L02Rik	NM_025977	.	.	.	target	3760	Tmed9	NM_026211	.	.	.	target	3812
Mastl	NM_025979	.	.	.	target	3761	Agpat2	NM_026212	.	.	.	target	3813
Ube2g1	NM_025985	.	.	.	target	3762	Gstcd	NM_026231	.	.	.	target	3814
Ndufa6	NM_025987	.	.	.	target	3763	Pigm	NM_026234	.	.	.	target	3815
Fbxo5	NM_025995	.	.	.	target	3764	Ubxo5	NM_026257	.	.	.	target	3816
2610204K14Rik	NM_025997	.	.	.	target	3765	Rnf41	NM_026259	.	.	.	target	3817
Mtdh	NM_026002	.	.	.	target	3766	Akt1s1	NM_026270	.	.	.	target	3818
Nt5c3	NM_026004	.	.	.	target	3767	Nob1	NM_026277	.	.	.	target	3819
Eef1g	NM_026007	.	.	.	target	3768	Spbc24	NM_026282	.	.	.	target	3820
2610209A20Rik	NM_026010	.	.	.	target	3769	Ctdp1	NM_026295	.	.	.	target	3821
Zmat5	NM_026015	.	.	.	target	3770	0610007P06Rik	NM_026304	.	.	.	target	3822
Dullard	NM_026017	.	.	.	target	3771	Mrp18	NM_026310	.	.	.	target	3823
Zmynd19	NM_026021	.	.	.	target	3772	2610029G23Rik	NM_026312	.	.	.	target	3824
Nudcd2	NM_026023	.	.	.	target	3773	Sic25a37	NM_026331	.	.	.	target	3825
Ube2t	NM_026024	.	.	.	target	3774	Sltm	NM_026337	.	.	.	target	3826
2700085E05Rik	NM_026029	.	.	.	target	3775	Pop1	NM_026340	.	.	.	target	3827
Eif2s2	NM_026030	.	.	.	target	3776	Dph2	NM_026344	.	.	.	target	3828
Utp11l	NM_026031	.	.	.	target	3777	Ccdc130	NM_026350	.	.	.	target	3829
2810055F11Rik	NM_026038	.	.	.	target	3778	Ppid	NM_026352	.	.	.	target	3830
Med18	NM_026039	.	.	.	target	3779	Ergic2	NM_026355	.	.	.	target	3831
Srfbp1	NM_026040	.	.	.	target	3780	Jagn1	NM_026365	.	.	.	target	3832
2810430M08Rik	NM_026041	.	.	.	target	3781	Hermk2	NM_026366	.	.	.	target	3833
Wdr85	NM_026044	.	.	.	target	3782	Gpatc2	NM_026367	.	.	.	target	3834
2810452K22Rik	NM_026048	.	.	.	target	3783	Ahctf1	NM_026375	.	.	.	target	3835
Gemin6	NM_026053	.	.	.	target	3784	Dgat2	NM_026384	.	.	.	target	3836
Rpl39	NM_026055	.	.	.	target	3785	Ubxo2	NM_026390	.	.	.	target	3837
2900073G15Rik	NM_026064	.	.	.	target	3786	Nmral1	NM_026393	.	.	.	target	3838
D10Erd322e	NM_026065	.	.	.	target	3787	Bxcd2	NM_026396	.	.	.	target	3839
Thex1	NM_026067	.	.	.	target	3788	1500041N16Rik	NM_026399	.	.	.	target	3840
Med31	NM_026068	.	.	.	target	3789	Mrp63	NM_026401	.	.	.	target	3841
Rpl37	NM_026069	.	.	.	target	3790	Sic35a4	NM_026404	.	.	.	target	3842
3110049J23Rik	NM_026085	.	.	.	target	3791	Tmem39a	NM_026407	.	.	.	target	3843
1700037H04Rik	NM_026091	.	.	.	target	3792	Ddx55	NM_026409	.	.	.	target	3844
Snrpd3	NM_026095	.	.	.	target	3793	Mrf	NM_026422	.	.	.	target	3845
Opct1	NM_026111	.	.	.	target	3794	2410018C20Rik	NM_026423	.	.	.	target	3846
Uxs1	NM_026430	.	.	.	target	3847	Rab14	NM_026697	.	.	.	target	3899
Tmem66	NM_026432	.	.	.	target	3848	Sic39a13	NM_026721	.	.	.	target	3900
Rbm18	NM_026434	.	.	.	target	3849	1100001I22Rik	NM_026724	.	.	.	target	3901
Ppa1	NM_026438	.	.	.	target	3850	Ict1	NM_026729	.	.	.	target	3902
1700020C11Rik	NM_026443	.	.	.	target	3851	Ppp1r14a	NM_026731	.	.	.	target	3903
Rbm13	NM_026453	.	.	.	target	3852	Phf5a	NM_026737	.	.	.	target	3904
Ube2f	NM_026454	.	.	.	target	3853	D11Erd18e	NM_026740	.	.	.	target	3905
Wdr55	NM_026464	.	.	.	target	3854	1110007M04Rik	NM_026742	.	.	.	target	3906
Rps27l	NM_026467	.	.	.	target	3855	Mrps18a	NM_026768	.	.	.	target	3907
Atp5g2	NM_026468	.	.	.	target	3856	Syf2	NM_026780	.	.	.	target	3908
Mki67p	NM_026472	.	.	.	target	3857	Deb1	NM_026794	.	.	.	target	3909
Atad1	NM_026487	.	.	.	target	3858	Mlh1	NM_026810	.	.	.	target	3910
Hormad1	NM_026489	.	.	.	target	3859	Taf11	NM_026836	.	.	.	target	3911
Ppcs	NM_026494	.	.	.	target	3860	2310061C15Rik	NM_026844	.	.	.	target	3912
Srsf6	NM_026499	.	.	.	target	3861	Zfp644	NM_026856	.	.	.	target	3913
1110004E09Rik	NM_026502	.	.	.	target	3862	Xrcc6bp1	NM_026858	.	.	.	target	3914

Snrpg	NM_026506	target	3863	Maf1	NM_026859	target	3915
Zwilch	NM_026507	target	3864	Phgdh1	NM_026861	target	3916
Trap1	NM_026508	target	3865	Ubp2	NM_026872	target	3917
281002N01Rik	NM_026511	target	3866	Ptcd2	NM_026873	target	3918
2810417H13Rik	NM_026515	target	3867	1190005F20Rik	NM_026876	target	3919
Rpl22l1	NM_026517	target	3868	Aspcr1	NM_026877	target	3920
3110023E09Rik	NM_026522	target	3869	Ras11b	NM_026878	target	3921
Mid1ip1	NM_026524	target	3870	1500011H22Rik	NM_026883	target	3922
lsg20l1	NM_026531	target	3871	Phk2	NM_026888	target	3923
Rps13	NM_026533	target	3872	1500010J02Rik	NM_026889	target	3924
Chd1l	NM_026539	target	3873	Ssu72	NM_026899	target	3925
A930016P21Rik	NM_026546	target	3874	Anapc10	NM_026904	target	3926
Pacd2l	NM_026549	target	3875	Thap7	NM_026909	target	3927
Cdca8	NM_026560	target	3876	Mitd1	NM_026913	target	3928
Gcsh	NM_026572	target	3877	1500032L24Rik	NM_026914	target	3929
Inoc1	NM_026574	target	3878	Zdhhc3	NM_026917	target	3930
Nola1	NM_026578	target	3879	Hbid2	NM_026921	target	3931
D10Wsu102e	NM_026579	target	3880	Ebna1bp2	NM_026932	target	3932
Bcas2	NM_026602	target	3881	2610312B22Rik	NM_026934	target	3933
Denr	NM_026603	target	3882	1810015A11Rik	NM_026940	target	3934
Leprot1	NM_026609	target	3883	Snrpd2	NM_026943	target	3935
Ndufb2	NM_026612	target	3884	Cnot8	NM_026949	target	3936
2810027O19Rik	NM_026613	target	3885	1810035L17Rik	NM_026958	target	3937
Ndufa5	NM_026614	target	3886	Comtd1	NM_026965	target	3938
3110057O12Rik	NM_026622	target	3887	Bola1	NM_026975	target	3939
Nola2	NM_026631	target	3888	Dtwd1	NM_026981	target	3940
9530058B02Rik	NM_026633	target	3889	Zfp688	NM_026999	target	3941
A030007L17Rik	NM_026637	target	3890	Gtpbp4	NM_027000	target	3942
Ifi80	NM_026641	target	3891	Kctd5	NM_027008	target	3943
Rpa1	NM_026653	target	3892	3300002I08Rik	NM_027017	target	3944
Toe1	NM_026654	target	3893	Dcps	NM_027030	target	3945
Mto1	NM_026658	target	3894	Wdfy1	NM_027057	target	3946
Cep57	NM_026665	target	3895	Ubl7	NM_027086	target	3947
Ubn1	NM_026666	target	3896	Bap1	NM_027088	target	3948
Aph1c	NM_026674	target	3897	2310003L22Rik	NM_027093	target	3949
0610011F06Rik	NM_026686	target	3898	Mrp130	NM_027098	target	3950
Fastkd3	NM_027123	target	3951	D5Wsu178e	NM_027652	target	4003
Afg3l2	NM_027130	target	3952	Pcgr6	NM_027654	target	4004
Mtfm1	NM_027134	target	3953	Dym	NM_027727	target	4005
Spsb3	NM_027141	target	3954	Ccdc57	NM_027745	target	4006
Exosc8	NM_027148	target	3955	Rcbtb1	NM_027764	target	4007
Ddx51	NM_027156	target	3956	Kctd6	NM_027782	target	4008
Ccdc115	NM_027159	target	3957	Tmem80	NM_027797	target	4009
Ipmk	NM_027184	target	3958	Pnpt1	NM_027869	target	4010
Smyd3	NM_027188	target	3959	Ubiad1	NM_027873	target	4011
Dph5	NM_027193	target	3960	Telo2	NM_027880	target	4012
Leng1	NM_027203	target	3961	Vps11	NM_027889	target	4013
Mrp112	NM_027204	target	3962	Gtf3c2	NM_027901	target	4014
Tmem147	NM_027215	target	3963	Raver1	NM_027911	target	4015
Polr2f	NM_027231	target	3964	Ints12	NM_027927	target	4016
2010003J03Rik	NM_027236	target	3965	2610016C23Rik	NM_027930	target	4017
Ints4	NM_027256	target	3966	Tarsl1	NM_027931	target	4018
Obfc2b	NM_027257	target	3967	Zbtb43	NM_027947	target	4019
Polr2j	NM_027259	target	3968	Phf7	NM_027949	target	4020
Josd3	NM_027261	target	3969	Syce2	NM_027954	target	4021
1110034A24Rik	NM_027269	target	3970	Mlf1p	NM_027973	target	4022
2810025M15Rik	NM_027274	target	3971	Acls5	NM_027976	target	4023
Ptcd3	NM_027275	target	3972	Cdadc1	NM_027986	target	4024
2810432D09Rik	NM_027278	target	3973	Dus4l	NM_028002	target	4025
Dnajb4	NM_027287	target	3974	2310047M10Rik	NM_028005	target	4026
Manba	NM_027288	target	3975	Tom11	NM_028011	target	4027
2310005N01Rik	NM_027310	target	3976	Xrcc4	NM_028012	target	4028
Ubez2a1	NM_027315	target	3977	2410008K03Rik	NM_028022	target	4029
Iifi35	NM_027320	target	3978	2410004F06Rik	NM_028034	target	4030
Prpf31	NM_027328	target	3979	Acad10	NM_028037	target	4031
Vps36	NM_027338	target	3980	Ddx28	NM_028038	target	4032
Nars	NM_027350	target	3981	Rpusd4	NM_028040	target	4033
2700038N03Rik	NM_027356	target	3982	Ddx54	NM_028041	target	4034
Pigw	NM_027388	target	3983	Erc8	NM_028042	target	4035
2610018I03Rik	NM_027394	target	3984	Fbxo22	NM_028049	target	4036
Bag5	NM_027404	target	3985	Tnrc5	NM_028065	target	4037
Wdr77	NM_027432	target	3986	1810055G02Rik	NM_028077	target	4038
2610304G08Rik	NM_027434	target	3987	Nat13	NM_028108	target	4039
Atad2	NM_027435	target	3988	Tpx2	NM_028109	target	4040
Mipep	NM_027436	target	3989	Trub1	NM_028115	target	4041
Rnf167	NM_027445	target	3990	2610510J17Rik	NM_028131	target	4042
5730409G15Rik	NM_027446	target	3991	2810423E13Rik	NM_028140	target	4043
Wars2	NM_027462	target	3992	Zfp661	NM_028141	target	4044
Ecd	NM_027475	target	3993	1700030K09Rik	NM_028170	target	4045
Sf4	NM_027481	target	3994	Luc7l	NM_028190	target	4046
Epc1	NM_027497	target	3995	Xpc5	NM_028198	target	4047
4933434E20Rik	NM_027500	target	3996	2210009G21Rik	NM_028201	target	4048
Armc9	NM_027507	target	3997	Brap	NM_028227	target	4049
3200002M19Rik	NM_027532	target	3998	Shmt2	NM_028230	target	4050
Fvt1	NM_027534	target	3999	2600005C20Rik	NM_028244	target	4051
Prdm5	NM_027547	target	4000	Rps6kb1	NM_028259	target	4052
Ints10	NM_027590	target	4001	Satd3	NM_028262	target	4053
4931440B09Rik	NM_027644	target	4002	Utp14a	NM_028276	target	4054
2700059L22Rik	NM_028300	target	4055	Hnrpr	NM_028871	target	4107
2810006K23Rik	NM_028310	target	4056	Tmed5	NM_028876	target	4108
Ccdc12	NM_028312	target	4057	4932417H02Rik	NM_028898	target	4109
2810028N01Rik	NM_028315	target	4058	Rmi1	NM_028904	target	4110
Zfp444	NM_028316	target	4059	Ppapdc2	NM_028922	target	4111
1110004B13Rik	NM_028336	target	4060	Eaf1	NM_028932	target	4112
Sass6	NM_028349	target	4061	4933425K02Rik	NM_028946	target	4113
Tdp1	NM_028354	target	4062	8430406I07Rik	NM_028984	target	4114
2410104I19Rik	NM_028364	target	4063	9130404D08Rik	NM_028993	target	4115
2900024O10Rik	NM_028372	target	4064	Mrp147	NM_029017	target	4116
Pfn4	NM_028376	target	4065	S100bbp	NM_029036	target	4117
Ndufv2	NM_028388	target	4066	5730419I09Rik	NM_029081	target	4118
Ccnt2	NM_028399	target	4067	5830415F09Rik	NM_029086	target	4119
Tmem138	NM_028411	target	4068	Rg9mtd1	NM_029092	target	4120
Ciz1	NM_028412	target	4069	Pik3cb	NM_029094	target	4121
Glx5	NM_028419	target	4070	1110008J03Rik	NM_029096	target	4122
3110005G23Rik	NM_028427	target	4071	1110014J01Rik	NM_029101	target	4123
3110009E18Rik	NM_028439	target	4072	4930481F22Rik	NM_029139	target	4124
3110082I17Rik	NM_028469	target	4073	Pelp1	NM_029231	target	4125
Ubp2l	NM_028475	target	4074	Josd3	NM_029248	target	4126
Ccdc18	NM_028481	target	4075								

1700037C18Rik	NM_028484				target	4076	Wbp7	NM_029274				target	4128
Ccdc103	NM_028492				target	4077	2610033H07Rik	NM_029278				target	4129
Calr3	NM_028500				target	4078	Secisbp2	NM_029279				target	4130
1700065D16Rik	NM_028533				target	4079	Dynlr2	NM_029297				target	4131
Rasip1	NM_028544				target	4080	D14Erd581e	NM_029320				target	4132
2410091C18Rik	NM_028611				target	4081	Ttc32	NM_029321				target	4133
1110012M11Rik	NM_028617				target	4082	Ccdc101	NM_029339				target	4134
1110008B24Rik	NM_028632				target	4083	Med25	NM_029365				target	4135
Man2c1	NM_028636				target	4084	1700025E21Rik	NM_029373				target	4136
Eif3s12	NM_028659				target	4085	Tex22	NM_029381				target	4137
Rap2b	NM_028712				target	4086	Senp2	NM_029457				target	4138
3930401K13Rik	NM_028720				target	4087	Hormad2	NM_029458				target	4139
4632404H12Rik	NM_028726				target	4088	Tcam1	NM_029467				target	4140
D12Erd551e	NM_028731				target	4089	Adal	NM_029475				target	4141
Pam	NM_028761				target	4090	Tmem49	NM_029478				target	4142
Tmem43	NM_028766				target	4091	Rab30	NM_029494				target	4143
Armc8	NM_028768				target	4092	6330548G22Rik	NM_029532				target	4144
Rnf6	NM_028774				target	4093	6530401D17Rik	NM_029541				target	4145
Ampd2	NM_028779				target	4094	Pwp2b	NM_029546				target	4146
Nudt9	NM_028794				target	4095	Trmt5	NM_029580				target	4147
Arpc5l	NM_028809				target	4096	1700018B08Rik	NM_029597				target	4148
Gtf2e1	NM_028812				target	4097	Fahd2a	NM_029629				target	4149
2810403A07Rik	NM_028814				target	4098	Abhd14b	NM_029631				target	4150
Xpo6	NM_028816				target	4099	Gpr172b	NM_029643				target	4151
Acsl3	NM_028817				target	4100	Mgmn1	NM_029657				target	4152
Igce	NM_028833				target	4101	1700012H05Rik	NM_029660				target	4153
2210009G21Rik	NM_028834				target	4102	Msd2	NM_029662				target	4154
Armc1	NM_028840				target	4103	Eef1d	NM_029663				target	4155
Spata17	NM_028848				target	4104	Ipo11	NM_029665				target	4156
3732413I11Rik	NM_028862				target	4105	1700123D08Rik	NM_029687				target	4157
1110005A03Rik	NM_028865				target	4106	Mdh1b	NM_029696				target	4158
Afrp1	NM_029702				target	4159	Nfkbi	NM_030612				target	4211
Atn3	NM_029705				target	4160	Gys1	NM_030678				target	4212
2410187C16Rik	NM_029734				target	4161	Senp3	NM_030702				target	4213
Eprs	NM_029735				target	4162	Polh	NM_030715				target	4214
Cluap1	NM_029738				target	4163	Acox3	NM_030721				target	4215
Rpl18a	NM_029751				target	4164	Trim23	NM_030731				target	4216
Bni3bp	NM_029752				target	4165	Tcfap4	NM_031182				target	4217
2410166I05Rik	NM_029759				target	4166	Slc19a1	NM_031196				target	4218
Dtl	NM_029766				target	4167	Mapbbp	NM_031248				target	4219
Rps9	NM_029767				target	4168	Ii23a	NM_031252				target	4220
Ccdc116	NM_029779				target	4169	Mov10l1	NM_031260				target	4221
Bicd2	NM_029791				target	4170	Ngrn	NM_031375				target	4222
1700021C14Rik	NM_029801				target	4171	Dbr1	NM_031403				target	4223
Hnrpm	NM_029804				target	4172	Slc12a9	NM_031406				target	4224
2310014L17Rik	NM_029809				target	4173	Dpp7	NM_031843				target	4225
2900062L11Rik	NM_029823				target	4174	Cenpq	NM_031863				target	4226
Hdh2	NM_029826				target	4175	Prkab1	NM_031869				target	4227
260009E05Rik	NM_029832				target	4176	Msh4	NM_031870				target	4228
Trub1	NM_029839				target	4177	Bat4	NM_032460				target	4229
Atg16l1	NM_029846				target	4178	Bat4	NM_032460				target	4230
Arsk	NM_029847				target	4179	Gtpbp3	NM_032544				target	4231
Gbbp11	NM_029868				target	4180	Tars	NM_033074				target	4232
Slc35e3	NM_029875				target	4181	D17H6S56E-5	NM_033075				target	4233
Yif1b	NM_029887				target	4182	Nudt19	NM_033080				target	4234
Zfp142	NM_029888				target	4183	Sreb1	NM_033218				target	4235
Sik3	NM_029916				target	4184	Ptdsr	NM_033398				target	4236
Zfp422-rs1	NM_029952				target	4185	D17H6S53E	NM_033477				target	4237
Mnab	NM_029956				target	4186	Ubqln4	NM_033526				target	4238
Mrps5	NM_029963				target	4187	Kif7	NM_033563				target	4239
6030458C11Rik	NM_029998				target	4188	Wbscr16	NM_033572				target	4240
D730039F16Rik	NM_030021				target	4189	Pcdhgb4	NM_033576				target	4241
Mccc2	NM_030026				target	4190	Pcdhgb5	NM_033577				target	4242
Trappc6b	NM_030057				target	4191	Pcdhga5	NM_033588				target	4243
Lsmd1	NM_030083				target	4192	Pcdhga8	NM_033591				target	4244
1500032D16Rik	NM_030087				target	4193	Pcdhga9	NM_033592				target	4245
3300001G02Rik	NM_030093				target	4194	Pcdhga11	NM_033594				target	4246
Tmem33	NM_030108				target	4195	Hist2h4	NM_033596				target	4247
D530033C11Rik	NM_030132				target	4196	Dqx1	NM_033606				target	4248
D11Lgp2e	NM_030150				target	4197	Atp6v0b	NM_033617				target	4249
2610021K21Rik	NM_030172				target	4198	Chrac1	NM_053068				target	4250
Armc9	NM_030184				target	4199	Atg5	NM_053069				target	4251
Zfp623	NM_030199				target	4200	Lrp8	NM_053073				target	4252
2310079F23Rik	NM_030208				target	4201	Ifitm5	NM_053088				target	4253
Sp2	NM_030220				target	4202	Kars	NM_053092				target	4254
Dist	NM_030225				target	4203	Tac4	NM_053093				target	4255
Polr3h	NM_030229				target	4204	Pcdhb16	NM_053102				target	4256
Setd8	NM_030241				target	4205	Pcdhb17	NM_053142				target	4257
Ier5l	NM_030244				target	4206	Pcdhb18	NM_053143				target	4258
Cdk5rap3	NM_030248				target	4207	Mrlp3	NM_053159				target	4259
Apobec3	NM_030255				target	4208	Mrlp27	NM_053161				target	4260
BC003324	NM_030259				target	4209	Mrlp34	NM_053162				target	4261
Vps16	NM_030559				target	4210	Mrlp36	NM_053163				target	4262
Ccrk	NM_053180				target	4263	2310061J03Rik	NM_133677				target	4315
Ddx50	NM_053183				target	4264	Sac3d1	NM_133678				target	4316
Ric8	NM_053194				target	4265	2410104I19Rik	NM_133691				target	4317
Egln2	NM_053208				target	4266	Pipf6	NM_133701				target	4318
Dok4	NM_053246				target	4267	Nol11	NM_133702				target	4319
Slc5a5	NM_053248				target	4268	Pycr2	NM_133705				target	4320
Zmynd10	NM_053253				target	4269	2210412D01Rik	NM_133722				target	4321
Gtf2ird2	NM_053266				target	4270	Slf13	NM_133726				target	4322
Rad51c	NM_053269				target	4271	Kptn	NM_133727				target	4323
Dhcr24	NM_053272				target	4272	4931406C07Rik	NM_133732				target	4324
Ttyh2	NM_053273				target	4273	Wdr23	NM_133734				target	4325
Def8	NM_054046				target	4274	2900064A13Rik	NM_133749				target	4326
Pip5k2b	NM_054051				target	4275	3110048E14Rik	NM_133750				target	4327
Pawr	NM_054056				target	4276	Tubgcp2	NM_133755				target	4328
Prosc	NM_054057				target	4277	Xab1	NM_133756				target	4329
Afg3l1	NM_054070				target	4278	Mtlf2	NM_133767				target	4330
Slc19a2	NM_054087				target	4279	Adck4	NM_133770				target	4331
Bai3	NM_057171				target	4280	Ssbp4	NM_133772				target	4332
Fubp1	NM_057172				target	4281	Stard4	NM_133774				target	4333
Recql4	NM_058214				target	4282	Smc4	NM_133786				target	4334
Igfb8	NM_080419				target	4283	Nmd3	NM_133787				target	4335
Celsr3	NM_080437				target	4284	R74862	NM_133790				target	4336
Psmi5	NM_080554				target	4285	Qars	NM_133794				target	4337
Snx4	NM_080557				target	4286	Arhgdia	NM_133796				target	4338
Ubox5	NM_080562				target	4287	Kmo	NM_133809				target	4339
Aco2	NM_080633				target	4288	Lbr	NM_133815				target	4340

Lnx2	NM_080795	target	4289	A1597479	NM_133818	target	4341
D17Wsu104e	NM_080837	target	4290	Mmaa	NM_133823	target	4342
Socsa4	NM_080843	target	4291	Creb1	NM_133828	target	4343
Asb15	NM_080847	target	4292	Gltscr2	NM_133831	target	4344
Pask	NM_080850	target	4293	Rdh10	NM_133832	target	4345
Snag1	NM_130796	target	4294	Ehd4	NM_133838	target	4346
Cdk9	NM_130860	target	4295	2010311D03Rik	NM_133839	target	4347
Idh3b	NM_130884	target	4296	Tm9sf4	NM_133847	target	4348
Anp32b	NM_130889	target	4297	Snapap	NM_133854	target	4349
Rtn4ip1	NM_130892	target	4298	Usp53	NM_133857	target	4350
Dazap1	NM_133188	target	4299	Dc1re1b	NM_133865	target	4351
Mmr4	NM_133215	target	4300	Adpm12	NM_133883	target	4352
Xpnpep1	NM_133216	target	4301	Stx12	NM_133887	target	4353
Atp13a1	NM_133224	target	4302	Smpd3b	NM_133888	target	4354
Nup155	NM_133227	target	4303	Papd4	NM_133905	target	4355
Pikfb3	NM_133232	target	4304	Ube3c	NM_133907	target	4356
Mic1	NM_133241	target	4305	Eif3s9	NM_133916	target	4357
Rbm39	NM_133242	target	4306	Mlixp	NM_133917	target	4358
Rbm39	NM_133242	target	4307	Chchd4	NM_133928	target	4359
Ppargc1b	NM_133249	target	4308	5830446M03Rik	NM_133934	target	4360
Mutyh	NM_133250	target	4309	Vrk3	NM_133945	target	4361
Prss8	NM_133351	target	4310	Sf3b3	NM_133953	target	4362
Slc12a6	NM_133649	target	4311	Cog4	NM_133973	target	4363
Cd81	NM_133655	target	4312	Imp3	NM_133976	target	4364
Eroc3	NM_133658	target	4313	Usp52	NM_133992	target	4365
Osgep	NM_133676	target	4314	Pwp1	NM_133993	target	4366
1810008A18Rik	NM_133998	target	4367	Slc39a6	NM_139143	target	4419
Zcd1	NM_134007	target	4368	Fus	NM_139149	target	4420
Ncln	NM_134009	target	4369	Carf	NM_139150	target	4421
Nup107	NM_134010	target	4370	Cog8	NM_139229	target	4422
Tbrg4	NM_134011	target	4371	Nol6	NM_139236	target	4423
Fbxw11	NM_134015	target	4372	Reep6	NM_139292	target	4424
Mat2b	NM_134017	target	4373	Car9	NM_139305	target	4425
Pnpo	NM_134021	target	4374	Stard7	NM_139308	target	4426
Smek2	NM_134034	target	4375	Fcmd	NM_139309	target	4427
Aldh6a1	NM_134042	target	4376	1110031B06Rik	NM_144521	target	4428
111002B05Rik	NM_134054	target	4377	Zfp622	NM_144523	target	4429
Ddx41	NM_134059	target	4378	Nmnat3	NM_144533	target	4430
Epd2	NM_134065	target	4379	Tmem38a	NM_144534	target	4431
AW209491	NM_134067	target	4380	Thyn1	NM_144543	target	4432
Adk	NM_134079	target	4381	Zfp119	NM_144546	target	4433
Ppf1	NM_134084	target	4382	Bivm	NM_144558	target	4434
D15Wsu75e	NM_134095	target	4383	Pycr1	NM_144795	target	4435
Topors	NM_134097	target	4384	Hnrpl1	NM_144802	target	4436
D15Mgi27	NM_134100	target	4385	Utp6	NM_144826	target	4437
Gpsm3	NM_134116	target	4386	BC011248	NM_144857	target	4438
Gpsn2	NM_134118	target	4387	Dus3l	NM_144858	target	4439
Pp1f19	NM_134129	target	4388	Wdr36	NM_144863	target	4440
A630042L21Rik	NM_134134	target	4389	Eif1	NM_144866	target	4441
Slc39a3	NM_134135	target	4390	BC019561	NM_144867	target	4442
Tnfrsf5ip1	NM_134138	target	4391	Pcnx13	NM_144868	target	4443
Wdr74	NM_134139	target	4392	Ndufs8	NM_144870	target	4444
Otub1	NM_134150	target	4393	Suv420h1	NM_144871	target	4445
Yars	NM_134151	target	4394	5630401D24Rik	NM_144877	target	4446
Fut10	NM_134161	target	4395	Exosc2	NM_144886	target	4447
Yipf2	NM_138303	target	4396	Slc35c2	NM_144893	target	4448
Nme7	NM_138314	target	4397	Zqpat	NM_144894	target	4449
1700088E04Rik	NM_138581	target	4398	Pet112l	NM_144896	target	4450
Spq21	NM_138584	target	4399	Msto1	NM_144898	target	4451
Cherp	NM_138585	target	4400	Csde1	NM_144901	target	4452
D6Wsu176e	NM_138587	target	4401	6330416G13Rik	NM_144905	target	4453
D7Wsu128e	NM_138589	target	4402	Rad9b	NM_144912	target	4454
D6Wsu163e	NM_138594	target	4403	Bcdm3	NM_144913	target	4455
Gldc	NM_138595	target	4404	Rbed1	NM_144917	target	4456
Atp5o	NM_138597	target	4405	Smyd5	NM_144918	target	4457
D11Wsu99e	NM_138598	target	4406	Crsp6	NM_144933	target	4458
Torrm70a	NM_138599	target	4407	Frs3	NM_144939	target	4459
Cds2	NM_138651	target	4408	Rbm7	NM_144948	target	4460
Mvd	NM_138656	target	4409	Eif4a1	NM_144958	target	4461
Pprf8	NM_138659	target	4410	Pitrm1	NM_145131	target	4462
1810047C23Rik	NM_138668	target	4411	Rnh1	NM_145135	target	4463
Nadk	NM_138671	target	4412	Eif3s6ip	NM_145139	target	4464
Nol1	NM_138747	target	4413	Abcc10	NM_145140	target	4465
Ppp2r4	NM_138748	target	4414	Pomt1	NM_145145	target	4466
Zfp286	NM_138949	target	4415	Prc1	NM_145150	target	4467
Rassf3	NM_138956	target	4416	Angptl6	NM_145154	target	4468
Csda	NM_139117	target	4417	Slc25a28	NM_145156	target	4469
Spats2	NM_139140	target	4418	Alms1	NM_145223	target	4470
Yipf3	NM_145353	target	4471	Ankrd27	NM_145633	target	4523
Nsun2	NM_145354	target	4472	Tinf2	NM_145705	target	4524
BC020002	NM_145374	target	4473	Cd3eap	NM_145822	target	4525
Tnpo2	NM_145390	target	4474	Ehmt2	NM_145830	target	4526
Bag2	NM_145392	target	4475	Rasgef1b	NM_145839	target	4527
Tbl3	NM_145396	target	4476	Rgs9bp	NM_145840	target	4528
BC002059	NM_145397	target	4477	Abhd14a	NM_145919	target	4529
Pikag2	NM_145401	target	4478	Fntb	NM_145927	target	4530
Pmt7	NM_145404	target	4479	Sum1	NM_145937	target	4531
BC021438	NM_145416	target	4480	Alg3	NM_145939	target	4532
Rnpep	NM_145417	target	4481	BC025462	NM_145946	target	4533
D10Wsu52e	NM_145422	target	4482	1110007A13Rik	NM_145955	target	4534
Atpaf2	NM_145427	target	4483	Kcrn14	NM_145963	target	4535
Dhrs7b	NM_145428	target	4484	BC027231	NM_145972	target	4536
Arb2	NM_145429	target	4485	Prepl	NM_145984	target	4537
Nle1	NM_145431	target	4486	L3mbtl2	NM_145993	target	4538
Mrm1	NM_145433	target	4487	Lss	NM_146006	target	4539
Nr1d1	NM_145434	target	4488	Mgat2	NM_146035	target	4540
Eif2b2	NM_145445	target	4489	B4gal7	NM_146045	target	4541
Oxnad1	NM_145460	target	4490	Atf7	NM_146065	target	4542
D14Erd500e	NM_145462	target	4491	Gspt1	NM_146066	target	4543
BC006662	NM_145466	target	4492	2310009H04Rik	NM_146068	target	4544
Skp2	NM_145468	target	4493	Lrcc3	NM_146069	target	4545
Depdc6	NM_145470	target	4494	Tfb1m	NM_146074	target	4546
C030006K11Rik	NM_145472	target	4495	2610024E20Rik	NM_146084	target	4547
Setd4	NM_145482	target	4496	Appb3	NM_146085	target	4548
Zfp758	NM_145484	target	4497	Lyplal1	NM_146106	target	4549
Prr3	NM_145487	target	4498	Aamp	NM_146110	target	4550
BC011426	NM_145490	target	4499	A830007P12Rik	NM_146115	target	4551
Rin1	NM_145495	target	4500	Hnrpa3	NM_146130	target	4552
Spfh1	NM_145502	target	4501	Usp1	NM_146144	target	4553

Al450540	NM_145505	target	4502	Ipo13	NM_146152	target	4554
Rabepk	NM_145522	target	4503	C230096C10Rik	NM_146157	target	4555
Cstf3	NM_145529	target	4504	Ncapd2	NM_146171	target	4556
Zfp189	NM_145547	target	4505	Cnot3	NM_146176	target	4557
Gnl2	NM_145552	target	4506	Zfp764	NM_146203	target	4558
Tardbp	NM_145556	target	4507	Cul4a	NM_146207	target	4559
Hibadh	NM_145567	target	4508	Git25d1	NM_146211	target	4560
Mat2a	NM_145569	target	4509	BC025546	NM_146215	target	4561
Mmps35	NM_145573	target	4510	Vac14	NM_146216	target	4562
Atpd3	NM_145582	target	4511	Rfwd3	NM_146218	target	4563
Kif22	NM_145588	target	4512	BC024814	NM_146247	target	4564
Txnif6	NM_145598	target	4513	Pnp1a	NM_146251	target	4565
Zfp330	NM_145600	target	4514	Glox1	NM_146256	target	4566
D230025D16Rik	NM_145604	target	4515	Ehmt2	NM_147151	target	4567
Klhdc4	NM_145605	target	4516	Tagap1	NM_147155	target	4568
Ppan	NM_145610	target	4517	Plekha4	NM_148927	target	4569
Parp3	NM_145619	target	4518	Ly6g5b	NM_148939	target	4570
Rnu3p2	NM_145620	target	4519	170036D21Rik	NM_148940	target	4571
Eif4b	NM_145625	target	4520	Elov4	NM_148941	target	4572
Rbm10	NM_145627	target	4521	3110023B02Rik	NM_152807	target	4573
Polr2h	NM_145632	target	4522	Cdc5l	NM_152810	target	4574
Ttc27	NM_152817	target	4575	Rpl32	NM_172086	target	4627
Las11	NM_152822	target	4576	Entpd6	NM_172117	target	4628
Pop1	NM_152894	target	4577	Zc3h3	NM_172121	target	4629
Mapre2	NM_153058	target	4578	Mterf	NM_172135	target	4630
Zfp472	NM_153063	target	4579	AY078069	NM_172142	target	4631
Leap2	NM_153069	target	4580	Bnip1	NM_172149	target	4632
Lrrc25	NM_153074	target	4581	Twistnb	NM_172253	target	4633
Thtpa	NM_153083	target	4582	Zcsl2	NM_172254	target	4634
Nupl2	NM_153092	target	4583	Cep68	NM_172260	target	4635
Phospho1	NM_153104	target	4584	Eif25b	NM_172265	target	4636
Gtpbp10	NM_153116	target	4585	Snx8	NM_172277	target	4637
Nat10	NM_153126	target	4586	Rnf40	NM_172281	target	4638
Klh12	NM_153128	target	4587	Nup133	NM_172288	target	4639
Slc35e4	NM_153142	target	4588	Foxred1	NM_172291	target	4640
Kctd11	NM_153143	target	4589	Ccnb1	NM_172301	target	4641
Zfp740	NM_153194	target	4590	Dnajc16	NM_172338	target	4642
Fbxo7	NM_153195	target	4591	Snapc4	NM_172339	target	4643
Eif2c3	NM_153402	target	4592	Slc16a13	NM_172371	target	4644
Drbp1	NM_153405	target	4593	AA536717	NM_172379	target	4645
Pomt2	NM_153415	target	4594	Cdc42se1	NM_172395	target	4646
Aaas	NM_153416	target	4595	9130011J15Rik	NM_172396	target	4647
Grwd1	NM_153419	target	4596	1110057K04Rik	NM_172401	target	4648
Nphp4	NM_153424	target	4597	Slc25a32	NM_172402	target	4649
Ubap2l	NM_153489	target	4598	Nup93	NM_172410	target	4650
Rnf113a1	NM_153503	target	4599	Gpc2	NM_172412	target	4651
E230022H04Rik	NM_153515	target	4600	Asxl2	NM_172421	target	4652
Bcl2l13	NM_153516	target	4601	Fastkd2	NM_172422	target	4653
Lrrc20	NM_153542	target	4602	2310042L06Rik	NM_172428	target	4654
Gnl3	NM_153547	target	4603	Tbc1d16	NM_172443	target	4655
Aldh18a1	NM_153554	target	4604	Wdr37	NM_172445	target	4656
Qsox1	NM_153559	target	4605	Mttr	NM_172480	target	4657
Nudt6	NM_153561	target	4606	8030451K01Rik	NM_172501	target	4658
Yrdc	NM_153566	target	4607	A730008H23Rik	NM_172505	target	4659
Noc4l	NM_153570	target	4608	Gabbp2	NM_172512	target	4660
AW049829	NM_153571	target	4609	Nut	NM_172521	target	4661
Ccdc95	NM_153580	target	4610	5730593F17Rik	NM_172543	target	4662
Nars2	NM_153591	target	4611	Rufy1	NM_172557	target	4663
Cdk8	NM_153599	target	4612	Gemin5	NM_172558	target	4664
Cpt1c	NM_153679	target	4613	Cntrob	NM_172560	target	4665
Prkag3	NM_153744	target	4614	Rhbdf2	NM_172572	target	4666
Prkag3	NM_153745	target	4615	Zfp277	NM_172575	target	4667
Paox	NM_153783	target	4616	Wdr41	NM_172590	target	4668
Cdk13	NM_153785	target	4617	Wdhd1	NM_172598	target	4669
Bclaf1	NM_153787	target	4618	Rab2b	NM_172601	target	4670
Traf7	NM_153792	target	4619	Tmem44	NM_172614	target	4671
4631403P03Rik	NM_153793	target	4620	Btdb9	NM_172618	target	4672
Polr2b	NM_153798	target	4621	Vps52	NM_172620	target	4673
Nupl1	NM_170591	target	4622	4632411B12Rik	NM_172652	target	4674
2610205E22Rik	NM_170592	target	4623	Slc39a10	NM_172653	target	4675
Rps15a	NM_170669	target	4624	D2Wsu81e	NM_172660	target	4676
Abcc10	NM_170680	target	4625	Lrp4	NM_172668	target	4677
Iars	NM_172015	target	4626	Samd10	NM_172676	target	4678
Acad9	NM_172678	target	4679	Gpkow	NM_173747	target	4731
D930015E06Rik	NM_172681	target	4680	Nudcd3	NM_173748	target	4732
4732418C07Rik	NM_172698	target	4681	5830457H20Rik	NM_173756	target	4733
Zmpste24	NM_172700	target	4682	Mmps27	NM_173757	target	4734
Guf1	NM_172711	target	4683	A230062G08Rik	NM_173765	target	4735
Sdad1	NM_172713	target	4684	9630054F20Rik	NM_173784	target	4736
C330023M02Rik	NM_172722	target	4685	A230051G13Rik	NM_173785	target	4737
Tufm	NM_172745	target	4686	Rcc2	NM_173867	target	4738
Hrip3	NM_172746	target	4687	9430057O19Rik	NM_174849	target	4739
Kctd13	NM_172747	target	4688	1810063B05Rik	NM_174987	target	4740
Heatr3	NM_172757	target	4689	Mrlp22	NM_175001	target	4741
Elmo3	NM_172760	target	4690	Pth2	NM_175004	target	4742
Rbm34	NM_172762	target	4691	Eny2	NM_175009	target	4743
BB114286	NM_172763	target	4692	Gimap5	NM_175035	target	4744
6620401K05Rik	NM_172774	target	4693	Ccdc126	NM_175098	target	4745
Dock4	NM_172803	target	4694	Repin1	NM_175099	target	4746
Lmln	NM_172823	target	4695	Sf3b5	NM_175102	target	4747
G630039H03Rik	NM_172824	target	4696	2310022A10Rik	NM_175107	target	4748
Ankmy1	NM_172850	target	4697	5730577I03Rik	NM_175110	target	4749
Adc	NM_172875	target	4698	Rae1	NM_175112	target	4750
2210010B09Rik	NM_172919	target	4699	3300001M20Rik	NM_175113	target	4751
Alkbh5	NM_172943	target	4700	1110038D17Rik	NM_175133	target	4752
2600001B17Rik	NM_172947	target	4701	Tsr2	NM_175146	target	4753
Cops7b	NM_172974	target	4702	2310022B05Rik	NM_175149	target	4754
Gtf3c4	NM_172977	target	4703	Galk2	NM_175154	target	4755
Ube3a	NM_173010	target	4704	2610204G22Rik	NM_175157	target	4756
Mtap1s	NM_173013	target	4705	Zdhc1	NM_175160	target	4757
Mon1b	NM_173015	target	4706	Abxn7l2	NM_175183	target	4758
BC048403	NM_173022	target	4707	3110056O03Rik	NM_175195	target	4759
A630047E20Rik	NM_173032	target	4708	1700058C01Rik	NM_175198	target	4760
BC057893	NM_173033	target	4709	4833408A19Rik	NM_175203	target	4761
AW413431	NM_173037	target	4710	Ankrd9	NM_175207	target	4762
Mcph1	NM_173189	target	4711	Tasp1	NM_175225	target	4763
Eif5	NM_173363	target	4712	Rnf139	NM_175226	target	4764
Eif5	NM_173363	target	4713	5830427D03Rik	NM_175232	target	4765
Sfrs1	NM_173374	target	4714	Adhfe1	NM_175236	target	4766

2810046L04Rik	NM_173382	target	4715	Myh10	NM_175260	target	4767
E330016A19Rik	NM_173386	target	4716	4931406H21Rik	NM_175264	target	4768
Slc43a2	NM_173388	target	4717	Epm2aip1	NM_175266	target	4769
Tgjf2	NM_173396	target	4718	Srd5a1	NM_175283	target	4770
D930001I22Rik	NM_173397	target	4719	C430004E15Rik	NM_175286	target	4771
Zbtb5	NM_173399	target	4720	AA408296	NM_175292	target	4772
Gpr26	NM_173410	target	4721	Zfp513	NM_175311	target	4773
Zbtb37	NM_173424	target	4722	E130012A19Rik	NM_175332	target	4774
1700047E16Rik	NM_173431	target	4723	Nhlrc1	NM_175340	target	4775
Iws1	NM_173441	target	4724	2700049P18Rik	NM_175382	target	4776
Rccd1	NM_173445	target	4725	Rg9mid2	NM_175389	target	4777
Rpusd2	NM_173450	target	4726	Exocsc4	NM_175399	target	4778
Tmem11	NM_173453	target	4727	2410014A08Rik	NM_175403	target	4779
BC027344	NM_173738	target	4728	C030004A17Rik	NM_175411	target	4780
Maoa	NM_173740	target	4729	Ccdc40	NM_175430	target	4781
Dusp18	NM_173745	target	4730	A830093I24Rik	NM_175431	target	4782
Zfp526	NM_175436	target	4783	A730011L01Rik	NM_177394	target	4835
A630077B13Rik	NM_175449	target	4784	Bcl2	NM_177410	target	4836
Wdr18	NM_175450	target	4785	Psat1	NM_177420	target	4837
Zfp574	NM_175477	target	4786	Lrrc29	NM_177449	target	4838
Gpr150	NM_175495	target	4787	Zmym6	NM_177462	target	4839
6430598A04Rik	NM_175521	target	4788	Btdb12	NM_177472	target	4840
Eda2r	NM_175540	target	4789	D19Bwg1357e	NM_177474	target	4841
Wdfy2	NM_175546	target	4790	Zfp3	NM_177565	target	4842
Wdr3	NM_175552	target	4791	BC049762	NM_177567	target	4843
Zfp446	NM_175558	target	4792	9930104L06Rik	NM_177573	target	4844
Hist2h2bb	NM_175666	target	4793	Mlixp	NM_177582	target	4845
9930021D14Rik	NM_175682	target	4794	Frat2	NM_177603	target	4846
Fchsdl1	NM_175684	target	4795	Ctnna3	NM_177612	target	4847
Cdv3	NM_175833	target	4796	A230042K10Rik	NM_177622	target	4848
Cdv3	NM_175833	target	4797	Zfp281	NM_177643	target	4849
G6pc3	NM_175935	target	4798	Rasal2	NM_177644	target	4850
C030006K11Rik	NM_176828	target	4799	Arme1	NM_177647	target	4851
4931440F15Rik	NM_176829	target	4800	Tmem15	NM_177648	target	4852
2810485I05Rik	NM_176836	target	4801	Tmem69	NM_177670	target	4853
Tpikb	NM_176842	target	4802	D4Erd429e	NM_177672	target	4854
Ints5	NM_176843	target	4803	BC046331	NM_177673	target	4855
Mimk1	NM_176893	target	4804	1600021P15Rik	NM_177718	target	4856
A430057M04Rik	NM_176925	target	4805	Ppp1r3b	NM_177741	target	4857
A230063L24Rik	NM_176940	target	4806	Eme1	NM_177752	target	4858
9330133O14Rik	NM_176948	target	4807	D11Wsu47e	NM_177777	target	4859
Lig4	NM_176953	target	4808	A630008I04	NM_177849	target	4860
6330416L07Rik	NM_176962	target	4809	Tmem67	NM_177861	target	4861
Smyd4	NM_177009	target	4810	Al847670	NM_177869	target	4862
A230078I05Rik	NM_177056	target	4811	BC038925	NM_177878	target	4863
3110048E14Rik	NM_177067	target	4812	4933411G11Rik	NM_177880	target	4864
4930412M03Rik	NM_177098	target	4813	D330038O06Rik	NM_177899	target	4865
4833442J19Rik	NM_177101	target	4814	Fads6	NM_178035	target	4866
03-mar	NM_177115	target	4815	Thra	NM_178060	target	4867
D230037D09Rik	NM_177140	target	4816	Lsg1	NM_178069	target	4868
B230317F23Rik	NM_177148	target	4817	Nme7	NM_178071	target	4869
A530082C11Rik	NM_177186	target	4818	Mcf21	NM_178076	target	4870
4930518F03Rik	NM_177191	target	4819	4732466D17Rik	NM_178079	target	4871
Ascc31	NM_177214	target	4820	Hist2h3b	NM_178215	target	4872
9530056K15Rik	NM_177218	target	4821	Asb7	NM_178236	target	4873
Fastkd1	NM_177244	target	4822	Ndor1	NM_178239	target	4874
Cstf3	NM_177253	target	4823	Smg5	NM_178246	target	4875
A630052C17Rik	NM_177255	target	4824	Ankrd27	NM_178263	target	4876
Gtm2	NM_177266	target	4825	Canpm	NM_178269	target	4877
4732415M23Rik	NM_177279	target	4826	Cdc23	NM_178347	target	4878
Tnpo3	NM_177296	target	4827	Dhx33	NM_178367	target	4879
Plsd	NM_177298	target	4828	Slc9a8	NM_178371	target	4880
Xpnpep3	NM_177310	target	4829	Cidec	NM_178373	target	4881
Serac1	NM_177311	target	4830	Commf10	NM_178377	target	4882
Tsr1	NM_177325	target	4831	Iqcc	NM_178378	target	4883
C730025P13Rik	NM_177344	target	4832	Cox10	NM_178379	target	4884
Zfp771	NM_177362	target	4833	2410018C17Rik	NM_178390	target	4885
Gemin4	NM_177367	target	4834	Snapp1	NM_178392	target	4886
Ubxh8	NM_178397	target	4887	Utp15	NM_178918	target	4939
Wipi2	NM_178398	target	4888	Tmem153	NM_178919	target	4940
9130221H12Rik	NM_178400	target	4889	Al662250	NM_178926	target	4941
BC010787	NM_178577	target	4890	Pdqr1	NM_178939	target	4942
Tnfrsf21	NM_178589	target	4891	Atad3a	NM_179203	target	4943
Bat5	NM_178592	target	4892	Foxn2	NM_180974	target	4944
Gjc1	NM_178596	target	4893	A130010J15Rik	NM_181048	target	4945
Camk2g	NM_178597	target	4894	AA881470	NM_181066	target	4946
Vkorc1	NM_178600	target	4895	Rab18	NM_181070	target	4947
Grim1a	NM_178602	target	4896	1200003I07Rik	NM_181274	target	4948
Mrp150	NM_178603	target	4897	Rasgef1b	NM_181318	target	4949
Txn14	NM_178604	target	4898	Slc25a29	NM_181328	target	4950
D13Wsu17Te	NM_178605	target	4899	Coil	NM_181329	target	4951
E2f7	NM_178609	target	4900	Gtf2h5	NM_181392	target	4952
Krr1	NM_178610	target	4901	Rnpepl1	NM_181405	target	4953
1810026J23Rik	NM_178619	target	4902	Zbed4	NM_181412	target	4954
2600014M03Rik	NM_178620	target	4903	Anks1	NM_181413	target	4955
2700094F01Rik	NM_178625	target	4904	Arhgap11a	NM_181416	target	4956
Ints7	NM_178632	target	4905	BC050092	NM_181419	target	4957
Htatip	NM_178637	target	4906	Supv3l1	NM_181423	target	4958
Tigd5	NM_178646	target	4907	Lvl1	NM_181470	target	4959
Ubxh6	NM_178648	target	4908	Ipo7	NM_181517	target	4960
Jmj4	NM_178659	target	4909	Elf5a	NM_181582	target	4961
6030413G23Rik	NM_178664	target	4910	Shq1	NM_181590	target	4962
8030462N17Rik	NM_178670	target	4911	Itpkc	NM_181593	target	4963
Scld2	NM_178672	target	4912	Ecdc4	NM_181594	target	4964
Sec22c	NM_178677	target	4913	2310002B06Rik	NM_181649	target	4965
Unc45b	NM_178680	target	4914	Prdm4	NM_181650	target	4966
6430537H07Rik	NM_178689	target	4915	Rpo1-3	NM_181730	target	4967
Zyg11bl	NM_178694	target	4916	Hcfc1r1	NM_181821	target	4968
Prrg4	NM_178695	target	4917	D8Erd457e	NM_181854	target	4969
B930041F14Rik	NM_178699	target	4918	Oxct2b	NM_181859	target	4970
Pcid2	NM_178708	target	4919	Till12	NM_183017	target	

BC049715	NM_178776	target	4928	4930583K01Rik	NM_183267	target	4980
Slc7a6	NM_178798	target	4929	Chchd8	NM_183270	target	4981
Trim65	NM_178802	target	4930	1110002N22Rik	NM_183275	target	4982
Zfp277	NM_178845	target	4931	Ctnn1	NM_183315	target	4983
Gnl3	NM_178846	target	4932	Snapp5	NM_183316	target	4984
Sirt5	NM_178848	target	4933	Nup54	NM_183392	target	4985
Son	NM_178880	target	4934	Pde4a	NM_183408	target	4986
Pmt6	NM_178891	target	4935	Epb4.1	NM_183428	target	4987
Tyr1	NM_178897	target	4936	C030004A17Rik	NM_194257	target	4988
Al553587	NM_178909	target	4937	Bms1l	NM_194339	target	4989
Al839735	NM_178915	target	4938	Cdk10	NM_194446	target	4990
Rutbc1	NM_197943	target	4991	Gpr176	NM_201367	target	5043
300004C01Rik	NM_197959	target	4992	Xkr8	NM_201368	target	5044
1110020P15Rik	NM_197979	target	4993	Plec1	NM_201386	target	5045
Ddx39	NM_197982	target	4994	Plec1	NM_201387	target	5046
1810009O10Rik	NM_197989	target	4995	Plec1	NM_201388	target	5047
2210021J22Rik	NM_197998	target	4996	Plec1	NM_201389	target	5048
1700001O22Rik	NM_198000	target	4997	Plec1	NM_201390	target	5049
6330578E17Rik	NM_198006	target	4998	Prihr	NM_201615	target	5050
Cep78	NM_198019	target	4999	Sphk2	NM_203280	target	5051
Igcc	NM_198026	target	5000	Dhx37	NM_203319	target	5052
Tubgcp3	NM_198031	target	5001	Jtb	NM_206924	target	5053
Hnrpa3	NM_198090	target	5002	Jtb	NM_206924	target	5054
Bst2	NM_198095	target	5003	4930519N13Rik	NM_207204	target	5055
Tbkbp1	NM_198100	target	5004	Al314976	NM_207219	target	5056
Tra2a	NM_198102	target	5005	Centb5	NM_207223	target	5057
Exoc8	NM_198103	target	5006	Tsga10	NM_207228	target	5058
ORF34	NM_198105	target	5007	Ccdc87	NM_207268	target	5059
Gnl3l	NM_198110	target	5008	Plcxd1	NM_207279	target	5060
Lrrc24	NM_198119	target	5009	BC067068	NM_207522	target	5061
Fastkd5	NM_198176	target	5010	Osbp1a	NM_207530	target	5062
Aspscr1	NM_198223	target	5011	Rps24	NM_207635	target	5063
Yars2	NM_198246	target	5012	Dmn	NM_207663	target	5064
Nup188	NM_198304	target	5013	Dadd2	NM_207677	target	5065
Pagr9	NM_198414	target	5014	Ccnl2	NM_207678	target	5066
Pols	NM_198600	target	5015	Bcl2l1	NM_207681	target	5067
F630043A04Rik	NM_198605	target	5016	Elav2	NM_207686	target	5068
Wdsof1	NM_198606	target	5017	Espn	NM_207687	target	5069
4930572J05Rik	NM_198607	target	5018	1110034C04Rik	NM_211355	target	5070
Ccdc85b	NM_198616	target	5019	AU019823	NM_212449	target	5071
Al480653	NM_198626	target	5020	A930008G19Rik	NM_212473	target	5072
1810024B03Rik	NM_198630	target	5021	Stat3	NM_213660	target	5073
4430402118Rik	NM_198651	target	5022								
6430706D22Rik	NM_198652	target	5023								
4833432M17Rik	NM_198654	target	5024								
Tbc1d2	NM_198664	target	5025								
Cugbp1	NM_198683	target	5026								
Sypl	NM_198710	target	5027								
D17Ert441e	NM_198937	target	5028								
C430048L16Rik	NM_198957	target	5029								
Sgol2	NM_199007	target	5030								
Ippk	NM_199056	target	5031								
Ddx17	NM_199079	target	5032								
Ddx17	NM_199080	target	5033								
Suz12	NM_199196	target	5034								
1110032A13Rik	NM_199197	target	5035								
Mtq1	NM_199301	target	5036								
Zfp341	NM_199304	target	5037								
Ccdc32	NM_199310	target	5038								
AA408556	NM_199447	target	5039								
Copg	NM_201244	target	5040								
Cybas3	NM_201351	target	5041								
BC050210	NM_201365	target	5042								

5 anni in una pagina di ringraziamenti...

Con il solito sprint finale che caratterizza le mie gare sportive, finalmente sono arrivato alla fine di questa lunga e faticosa prova di vita che ingloba tutta la mia esperienza universitaria! Desidero ringraziare il Prof. Nicola Elvassore che, oltre ad aver supervisionato questo lavoro, mi ha dato la possibilità di far parte del FANTASTICO gruppo BioERA. Negli ultimi mesi l'esperienza di lavoro presso il BioERA mi ha permesso di imparare divertendomi, grazie a tutti i ragazzi del Lab. In particolare ringrazio Federica Michielin che, armandosi di molta pazienza, mi ha fatto da "Beatrice" in laboratorio e mi ha introdotto alla biologia con l'approccio giusto: ovvero sullo stile di "Siamo fatti così, esplorando il corpo umano". Voglio esprimere un ringraziamento particolare a Camilla Luni la quale, non solo mi ha seguito costantemente in questo lavoro, ma soprattutto ha creduto in me dandomi la possibilità di applicare le mie competenze nello sviluppo del modello, esaltando così la mia voglia di fare!

Un ringraziamento speciale lo rivolgo Stefano Penazzi, noto come Il Penaldi, compagno di studio insostituibile e grande amico. Grazie a quel soggetto ho affrontato con il giusto spirito le battaglie poste dall'università alternando stimolo reciproco alle balle da orsi che hanno accompagnato la preparazione degli ultimi giorni, e ore, prima degli esami. Alcuni momenti sono stati veramente difficili, ma insieme siamo sempre riusciti a cavarcela egregiamente!!! Grazie anche a Luca, Giammarco (alias il Tuba) e Lucio per aver fatto da "veri amici" nel momento del bisogno. Grazie anche ai miei camerati del Triathlon con i quali ho condiviso quella sana fatica che mi permetteva di inseguire un sogno in tutte le gare in giro per l'Italia: mi rivolgo in particolare a Alessandro, Alberto, Marco, Luca, Bigoli, Luis ed Enrico (noto ormai come Gentile Sig.). In tutto questo contesto ringrazio Sara Fasoli che ha vissuto e condiviso le mie avventure didattiche e sportive. La ringrazio per aver accettato la persona che sono appoggiando le mie scelte; grazie a questo abbiamo fatto squadra. Rimanendo sui filosofi ringrazio la coppia delle meraviglie Davide e Valentina, amici "acquisiti" con i quali ho passato serate a discutere degli argomenti più disparati: dall'entropia a Platone passando per la presa in giro delle bionde di scienza della formazione... chi c'era sà!

Sento di rivolgere un ringraziamento particolare alla mia famiglia ed in particolare a quella macchina ben oliata dei miei fratelli, che mi hanno sempre fatto percepire il loro appoggio spronandomi quindi a dare il massimo. Grazie anche alla città di Padova che ha fatto da cornice a questa esperienza unica.

Questi cinque anni sono stati per me una vera e propria palestra di vita: l'università mi ha permesso di mettermi costantemente alla prova e di creare rapporti importanti. Uscendo dagli archi del dipartimento di Ingegneria da *anzianissimo*, torno *pivolo* per la terza volta, portandomi a casa un bagaglio di esperienze professionali ed umani di assoluto rilievo. Come buon augurio per quello che verrà posso solo lanciare un...

PALE A PRORA!!! VOGA VOGA VOGA ISSA!!!