



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2016 00812

(22) Data de depozit: 10/11/2016

(41) Data publicării cererii:
30/05/2018 BOPI nr. 5/2018

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE ÎN DOMENIUL
PATOLOGIEI ȘI ȘTIINȚELOR
BIOMEDICALE VICTOR BABEȘ,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 99-101,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• SPITALUL UNIVERSITAR DE URGENȚĂ
MILITAR CENTRAL "DR.CAROL DAVILA"
BUCUREȘTI, STR. MIRCEA VULCĂNESCU
NR. 88, BUCUREȘTI, B, RO;
• SPITALUL UNIVERSITAR DE URGENȚĂ
ELIAS BUCUREȘTI, BD. MĂRĂȘTI NR. 17,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;

• CENTRUL MEDICAL LOTUS MED,
STR. CALISTRAT GROZOVICI NR. 1,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• INVENTATORI NEDECLARAȚI, *, RO

(74) Mandatar:
ANDRA MUȘATESCU CABINET DE
PROPRIETATE INDUSTRIALĂ,
CALEA 13 SEPTEMBRIE NR.121, BL.127,
ET.5, AP.21, SECTOR 5, BUCUREȘTI

(54) DISPOZITIV PENTRU INVESTIGAREA TUMORILOR
NEUROENDOCRINE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un dispozitiv pentru investigarea tumorilor neuroendocrine, utilizat în oncopatologie. Dispozitivul conform invenției stabilește nivelul de exprimare a unor gene dintr-o probă de țesut tumoral, cu ajutorul reacției în lanț a polimerazei, precedată de revers transcriere (RT-qPCR) cuprinzând o placă de reacție PCR cu godeuri dispuse matriceal, în care în fiecare godeu, pe coloană, se află câte două secvențe specifice pentru fiecare dintre cele 18 gene de interes, având simbolurile conform codului din nomenclatorul HGNC, semnificative pentru definirea gradului de diferențiere și a răspunsului terapeutic, respectiv, secvențe

specifice pentru cele două gene de referință ACTB, GAPDH și cele patru gene de control: HGDC, pentru controlul de contaminare cu ADN genomic uman, RTC, pentru controlul reacției de revers- transcriere și PPC, pentru controlul reacției, astfel că, pentru investigarea în paralel a patru probe, placa de PCR este prevăzută cu 96 de godeuri dispuse matriceal 8x12, fiecărei probe fiindu-i repartizate câte 3 coloane.

Revendicări: 4
Figuri: 1



Prezenta invenția se referă la un **dispozitiv pentru investigarea tumorilor neuroendocrine**, care se poate aplica în medicină, în special în oncopatologie.

Tumorile neuroendocrine sunt neoplasme cu localizare, în principal, în zona gastro-enteropancreatică și a arborelui bronșic.

Stabilirea statusului de diferențiere, a sensibilității la medicamente și a prognosticului tumorilor neuro-endocrine se bazează în prezent pe criteriile histologice derivate din observarea microscopică, în combinație cu date biologice suplimentare cu privire la tipul de hormoni secretați, la rata activității de proliferare, la prezența receptorilor și la căile de semnalizare. Deoarece în cele mai multe cazuri unicul mod de diagnosticare este reprezentat de examinarea țesuturilor fixate în formol și incluse în parafină (FFPE), au fost propuse panouri de teste imunohistochimice, iar acestea constituie o parte esențială a diagnosticului. Aceste teste se realizează pe secțiuni seriate ale tumorii și presupun identificarea mai multor proteine (markeri de proliferare celulară și de diferențiere celulară, receptori pentru hormoni, molecule de semnalizare) prin intermediul reacției antigen-anticorp utilizându-se anticorpi împotriva acestor proteine. Dezavantajele utilizării imunohistochimiei sunt:

- fixarea în formol și includerea în parafină a fragmentelor tisulare pot să afecteze specificitatea și sensibilitatea reacțiilor deoarece numeroase antigene sunt sensibile la un astfel de tratament;
- specificitatea și sensibilitatea reactivilor imunohistochimici disponibili în prezent este uneori discutabilă (în special pentru subtipuri ale receptorilor pentru somatostatine – SSTR);
- indisponibilitatea pe piață a unor anticorpi pentru o anumită proteină de interes;
- evaluarea nivelului proteinei nu este cantitativă; în cel mai bun caz poate fi semicantitativă, fiind bazată pe evaluarea subiectivă a examinatorului prin vizualizarea reacției la microscop.

O alternativă la imunohistochimie este **analiza expresiei genelor** ce codifică aceste proteine cu ajutorul reacției în lanț a polimerazei (PCR) cunoscută din brevetul US4683195A. Sunt cunoscute de asemenea mai multe variante de PCR printre care qPCR (*quantitative PCR*) și reacția în lanț a polimerazei precedată de revers transcriere (RT-PCR, *Reverse Transcription PCR*) și combinații ale acestor tehnologii precum RT-qPCR. Mai multe studii (Papotti et al. 2001, Papotti et al. 2002), au condus la concluzia că această abordare permite determinarea prin RT-qPCR a nivelului de ARN mesager specific pentru diferitele subtipuri de receptori pentru somatostatine (SSTR) în tumorile neuroendocrine din zona gastro-enteropancreatică și pulmonară. Datele obținute se corelează cu absorbția în

Octreotidului radioactiv, determinată prin scintigrafie (Octreoscan). Analiza expresiei genice s-a realizat utilizând ARN extras din țesuturi proaspete prezervate prin congelare, ceea ce face ca această abordare valoroasă pentru scopuri de cercetare să fie dificil de aplicat în diagnosticul de rutină, întrucât cea mai utilizată tehnică de prezervare a țesuturilor tumorale este prin fixare în formol și includere în parafină.

În ultimii ani, procedurile de analiză a profilului genic în tumori se pot realiza și în cazul ARN extras din țesuturi fixate în formol și incluse în parafină. Această abordare s-a dovedit valoroasă pentru determinarea profilului expresiei unui subtip de receptor pentru somatostatina (SSTR) într-o serie de tumori endocrine pancreatice (Nakayama et al., 2010). Diverse companii (Qiagen, Roche, Life Technologies) oferă kit-uri gata de lucru concepute pentru a investiga diferite procese metabolice și căi de semnalizare, cu seturi de gene selectate.

Publicația PCT WO2010136716 din 02.12.2010, a cererii de brevet internațională cu titlul "Panel de gene pentru pronosticul cancerului de prostată" prezintă o invenție care se referă la o placă de reacție microfluidică pentru diagnosticul și / sau prognosticul **cancerului de prostată**, prin analiza nivelului de expresie al genelor BRCA1, BRCA2, AR, IGF1, EphB2, AMACR, ESR1, ESR2, BCL2, RNASEL, MUC1, IL-18, COL4A3, GSTP1 și RASSF1 prin tehnica reacției în lanț a polimerazei precedată de revers transcriere (RT-qPCR).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este realizarea unui dispozitiv pentru investigarea tumorilor neuroendocrine, cu ajutorul reacției în lanț a polimerazei, utilizând ARN extras din țesuturi FFPE și a unui panel redus de gene.

Dispozitivul pentru **investigarea tumorilor** neuroendocrine prin stabilirea nivelului de exprimare a unor gene dintr-un material genetic reprezentat de țesut tumoral cu ajutorul reacției în lanț a polimerazei precedată de revers transcriere (RT-qPCR) cuprinzând o placă pentru PCR cu godeuri dispuse matriceal, conform invenției, conține în fiecare godeu al plăcii, pe coloană, câte două secvențe specifice (*primeri*) pentru fiecare din cele 18 gene de interes, semnificative pentru definirea gradului de diferențiere și a răspunsului terapeutic în tumorile neuroendocrine, gene care codifică hormoni, receptori pentru hormoni, markeri de angiogeneză și de proliferare, precum și pentru gene de referință, care se exprimă cvasiconstant în toate țesuturile și gene de control al reacției PCR.

Prin aplicarea prezentei invenții se preconizează obținerea următoarelor avantaje în raport cu stadiul tehnicii:

- Identificarea și cuantificarea genelor subexprimate. Prin tehnica de imunohistochimie,



se pot identifica numai proteinele codificate de genele supraexprimate, existând și în acest caz un nivel minim de la care acestea pot fi detectate.

- Estimarea cantitativă a nivelului de exprimare a unei gene. Prin tehnica de imunohistochimie estimarea, în cel mai bun caz, poate fi semicantitativă, fiind bazată pe evaluarea subiectivă a examinatorului cu ajutorul microscopului.
- Procedura este rapidă (aproximativ 3 ore să fie completă) și simplă, în cadrul aceluiași test obținându-se informații referitoare la 18 gene.
- Numărul relativ redus de gene de interes, permite asamblarea de dispozitive adaptate pentru diagnosticarea simultană a 4 pacienți ceea ce conduce la reducerea prețului de cost per test.
- Permite o diagnosticare diferențiată a tumorilor neuroendocrine folosind un panel restrâns de gene;
- Permite evaluarea sensibilității la terapie.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figura 1 care reprezintă schema de configurare a unei plăci de reacție conform invenției **pentru testarea simultană a 4 pacienți cu tumori neuroendocrine.**

Invenția este constituită dintr-un dispozitiv sub forma unei plăci PCR ~~pentru diagnostic, prognostic și modulare a terapiei tumorilor neuroendocrine~~ ce conține secvențe specifice (primeri) pentru fiecare genă de interes.

Funcție de varianta PCR și de mașina PCR/amplificatorul ADN, sunt utilizate plăci de reacție corespunzătoare acestora. Sunt cunoscute în stadiul tehnicii o gamă largă de plăci PCR cu godeuri (tuburi PCR) de diferite forme și capacități (dar identice pe aceeași placă), dispuse matriceal, realizate din diferite materiale plastice de uz medical (de exemplu polipropilenă).

Astfel există plăci cu câteva godeuri (de exemplu cu 8 godeuri a câte 100μl (microlitri/godeu), dispuse pe o singură linie/coloană), până la plăci cu câteva sute de godeuri (de exemplu 384 godeuri x50μl, dispuse matriceal. Fiecare godeu are un conținut specific de mixtură de reacție.

În cadrul unui exemplu preferat de realizare a dispozitivului acesta este realizat sub forma unei plăci de reacție cu 96 de godeuri cilindrice cu terminație conică și capacitate de 200 μl, dispuse matriceal pe 8 linii notate de la A-H și 12 coloane notate cu 1-12. În urma experimentelor/testelor pe tesuturi tumorale neuroendocrine cu diferite localizări: pulmonară – PM, intestinală – IN și pancreatică - PC, au fost selectate un număr de gene de interes dintre cele care codifică hormoni, receptori, markeri de proliferare și angiogeneza, markeri de

predicție a răspunsului la tratament. Prin teste repetate, numărul de gene de interes a fost



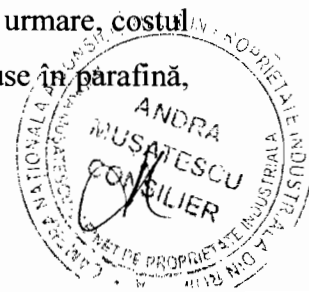
redus progresiv până la 18. Biomarkerii codificați de aceste gene de interes, sunt reprezentați de hormoni, receptori, markeri neuroendocrini, markeri de proliferare, markeri de angiogeneza, precum și markeri de predicție a răspunsului la tratament și sunt specificați în tabelul 1 de mai jos.

Tabel 1. Proteinele de interes pentru realizarea unui dispozitiv/placă de reacție de diagnostic, prognostic și modulare a terapiei tumorilor NE.

Hormoni	insulina (<i>INS</i>), gastrina (<i>GAST</i>), prohormonul pancreatic (<i>PPY</i>)
Markeri neuroendocrini	cromogranina A (<i>CHGA</i>), O-6-metilguanina-DNA metiltransferaza (<i>MGMT</i>), sinaptofizina (<i>SYP</i>), proteina neurosecretoare VGF (<i>VGF</i>)
Receptori	receptori pentru somatostatinele 1, 2, 3, 5 (<i>SSTR1</i> , <i>SSTR2</i> , <i>SSTR3</i> , <i>SSTR5</i>), gastrin releasing peptide receptor (<i>GRPR</i>)
Markeri de proliferare	MKI67 FHA domain-interacting nucleolar phosphoprotein (<i>MKI67</i>), ciclina D1 (<i>CCND1</i>).
Markeri de angiogeneza	caderina 13 (<i>CDH13</i>), slit homolog 2 protein (<i>SLIT2</i>),
Markeri ai răspunsului terapie	serin/treonin-protein kinaza mTOR (<i>MTOR</i>), timidilat sintaza <i>TYMS</i>

Dispozitivul, în varianta preferată de realizare, este reprezentat de o placă PCR cu 96 de godeuri, în fiecare godeu existând secvențe specifice (*primeri*) pentru o genă de interes din cele selectate ca având importanță în diagnosticarea tumorilor neuroendocrine. În desemnarea genelor de interes s-a avut în vedere, în cadrul testărilor identificarea strictă a acelor gene cu valoare semnificativă pentru caracterizarea tumorilor neuroendocrine cu diferite localizări, pentru reducerea numărului lor și implicit a costurilor per test. Astfel au fost selectate astfel 18 gene ce codifică proteinele de interes indicate în Tabelul 1 care conține denumirea proteinei și simbolul genei corespunzătoare conform codului din nomenclatorul HGNC. Pentru validarea testului s-au mai introdus în placa de reacție secvențe specifice (*primeri*) pentru gene de referință, gene care se exprimă cvasiconstant în toate țesuturile, secvențe specifice pentru controlul reacției de revers-transcriere, controlul reacției de amplificare a ADN și secvențe specifice pentru controlul contaminării cu ADN genomic.

Rezultă astfel, un număr de 24 de gene ce permite asamblarea de dispozitive adaptate pentru studiul simultan a 4 pacienți (o placă de reacție cuprinde 96 de godeuri) și, prin urmare, costul per test este mult redus. Din ARN extras din țesuturile fixate în formol și incluse în parafină,



dar și din țesuturile proaspete prezervate prin congelare, se detectează nivelul de expresie a ARN mesager pentru cele 18 gene de interes selectate. Aceste gene sunt: *INS*, *GAST*, *PPY*, *CHGA*, *SYP*, *VGF*, *SSTR1*, *SSTR2*, *SSTR3*, *SSTR5*, *GRPR*, *MTOR*, *MGMT*, *TYMS*, *MKI67*, *CCND1*, *CDH13*, *SLIT2* (nomenclatură HGNC – HUGO Gene Nomenclature Committee). Restul până la 24 sunt reprezentate de 2 gene de referință și 4 gene de control ale testului. Cele două gene de referință și cele patru gene de control au simbolurile conform codului din nomenclatorul HGNC: *ACTB*, *GAPDH*, care se exprimă cvasiconstant în toate țesuturile, *HGDC*, pentru controlul de contaminare cu ADN genomic uman, *RTC* pentru controlul reacției de revers-transcriere și *PPC* pentru controlul reacției de amplificare a ADN. Fiecărui pacient îi sunt repatizate câte 3 coloane: coloanele 1-3 pentru pacientul 1, coloanele 4-6 pentru pacientul 2, coloanele 7-9 pentru pacientul 3, coloanele 10-12 pentru pacientul 4.

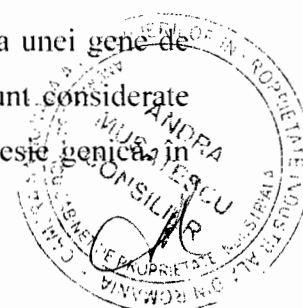
Obținerea unor date cu privire la gradul de diferențiere al tumorii oferă informații esențiale pentru înțelegerea originii, a simptomelor clinice, posibilitățile de urmărire postoperatorie a pacienților prin măsurarea nivelurilor de hormoni din sânge. De asemenea, markerii pentru stabilirea sensibilității la terapie se bazează pe detecția nivelurilor de exprimare a receptorilor pentru diferiți hormoni și, în mod special, pentru somatostatina precum și a genelor ce intervin în activitatea de proliferare pentru estimarea reacției la medicamente (citotoxice). Evaluarea prognosticului se realizează pe baza identificării activității proliferative și de angiogeneza.

Dispozitivul conform invenției se utilizează astfel:

Pentru fiecare caz se realizează RT-qPCR (*revers transcription quantitative PCR*). În prima etapă se extrage și se purifică ARN total din țesutul tumoral, de la 4 pacienți, calitatea și cantitatea acestuia verificându-se prin spectrofotometrie. După extracție, ARN cu caracteristici corespunzătoare cerințelor testului se supune reacției de revers-transcriere, după care ADN complementar se verifică spectrofotometric. Apoi se utilizează dispozitivul realizat conform invenției.

Etapă propriu-zisă de identificare a expresiei genice se realizează prin real-time PCR, pe o mașină PCR adecvată, folosind dispozitivul conform invenției.

La finalizarea PCR se vor analiza valorile ciclului de prag C_T (*threshold cycle*). În prima etapă se verifică valorile C_T obținute pentru controalele testului pentru validarea acestuia, ~~respectându-se indicațiile producătorului~~. Calculul nivelului de expresie genică relativă se exprimă în valoarea *fold regulation* și se realizează prin compararea valorii C_T a unei gene de interes în țesutul tumoral cu valoarea C_T a aceleiași gene în țesutul normal. Sunt considerate normale valorile cuprinse în intervalul (-2; 2). Valorile negative indică subexpresie genică în

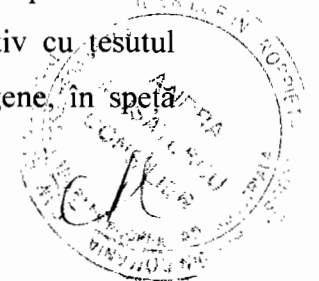


timp ce valorile pozitive indică supraexpresie genică. În Tabelul 2 sunt redate rezultate ale testelor obținute utilizând dispozitivul inventat. Sunt prezentate valorile expresiei genice pentru fiecare din cele 3 tipuri de tumori neuroendocrine analizate: pulmonare - PM, intestinal - IN și pancreatică - PC. În tabelul 2, sunt redate Cu font îngroșat (bold) sunt evidențiate în tabel genele supraexprimate, iar cu font italic subliniat genele subexprimate.

Tabel 2. Valorile fold regulation in cazul carcinoamelor neuroendocrine cu localizare pulmonară – PM, intestinală – IN și pancreatică- PC

Numar caz/Gene	Fold regulation								
	PM 1	PM 2	PM 3	IN 4	IN 5	IN 6	PC 7	PC 8	PC 9
<i>INS</i>	3,49	7,41	1,72	-1,24	-1,11	-1,05	11,49	597,38	3,86
<i>GAST</i>	5,07	2,09	12,78	1,33	1,24	-1,05	-1,19	754,83	1,62
<i>PPY</i>	-1,11	2,08	1,37	1,91	-1,11	-1,05	-1,19	34,78	-1,97
<i>CHGA</i>	3,60	1,37	1,48	8,37	11,08	<u>-2,01</u>	-1,19	3,56	-1,31
<i>SYP</i>	2,70	2,09	13,99	1,33	-1,11	-1,05	-1,19	12,21	5,48
<i>VGF</i>	15,05	2,09	1,38	4,58	<u>-5,82</u>	-1,05	10,41	48,17	16,17
<i>SSTR1</i>	21,24	1,18	762,05	36,38	2,10	-1,05	20,79	5,12	17,42
<i>SSTR2</i>	1,46	1,15	1,87	<u>-2,21</u>	<u>-2,68</u>	3,14	-1,59	-1,62	3,72
<i>SSTR3</i>	-1,41	1,63	1,08	7,24	-1,11	-1,05	-1,19	17,75	25,90
<i>SSTR5</i>	-1,10	2,09	1,38	1,33	-1,11	-1,05	-1,19	-1,13	-1,97
<i>GRPR</i>	-1,77	4,00	-1,17	5,84	<u>-2,55</u>	4,63	<u>-2,79</u>	-1,23	-1,14
<i>MTOR</i>	1,13	2,09	10,75	11,59	-1,11	-1,05	-1,19	-1,13	1,76
<i>MGMT</i>	9,31	1,25	9,41	17,09	<u>-6,87</u>	-1,05	-1,53	2,04	-1,24
<i>TYMS</i>	7,23	-1,64	4,05	1,33	<u>-2,99</u>	-1,05	16,80	28,84	4,71
<i>MKI67</i>	<u>-2,10</u>	1,10	-1,38	1,33	<u>-6,02</u>	-1,05	-1,29	-1,23	<u>-2,13</u>
<i>CCND1</i>	-1,32	1,75	1,16	1,33	-1,11	-1,05	-1,20	-1,15	-1,99
<i>CDH13</i>	<u>-5,00</u>	<u>-2,17</u>	<u>-3,29</u>	1,33	-1,11	3,14	1,38	-1,13	-1,97
<i>SLIT2</i>	1,32	1,79	1,18	1,33	-1,11	-1,79	-1,80	-1,72	<u>-2,98</u>

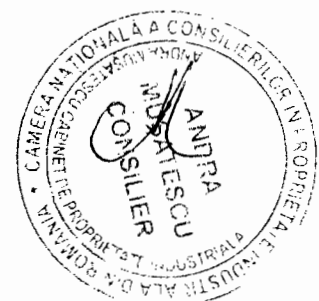
De exemplu, o valoare a *fold regulation* de 762,05 a unei gene, în speță *SSTR1*, se traduce prin exprimarea de 762,05 ori mai mult a genei respective în țesutul tumoral pulmonar analizat comparativ cu țesutul normal, ceea ce indică faptul că tumora respectivă prezintă un nivel crescut de 762,05 ori al receptorului pentru somatostatina 1, comparativ cu țesutul pulmonar normal. După cum o valoare a *fold regulation* de (-6,87) a unei gene, în speță



MGMT, se traduce prin exprimarea de 6,87 ori mai puțin a genei respective în țesutul tumoral intestinal analizat comparativ cu țesutul normal, ceea ce indică faptul că nivelul proteinei O-6-metilguanin-ADN metiltransferaza este de 6,87 ori mai redus în țesutul tumoral analizat comparativ cu țesutul normal.

În concluzie, prezenta invenție oferă o nouă posibilitate pentru fiecare caz unic de tumori endocrine, furnizând date cu privire la:

- diferențiere (informații esențiale pentru înțelegerea originii, simptomelor clinice, posibilitățile de urmărire post-diagnostic a pacienților prin determinări ale nivelurilor de hormoni din sânge);
- sensibilitate la terapie (pe baza detectării receptorilor pentru diferiți hormoni și, în mod special pentru somatostatina și a activității de proliferare pentru estimarea reacției la medicamente citotoxice);
- prognostic (evoluția tumorii, pe baza activității proliferative și de angiogenază).



Revendicări

1. Dispozitiv pentru investigarea tumorilor neuroendocrine prin stabilirea nivelului de exprimare a unor gene dintr-un material genetic reprezentat de țesut tumoral cu ajutorul reacției în lanț a polimerazei precedată de revers transcriere (RT-qPCR), cuprinzând o placă de reacție PCR cu godeuri dispuse matriceal, **caracterizat prin aceea că**, în fiecare godeu al plăcii, pe coloană, se află câte două secvențe specifice (*primeri*) pentru fiecare din genele de interes identificate, semnificative pentru definirea gradului de diferențiere și a răspunsului terapeutic în tumorile neuroendocrine, gene care codifică hormoni, receptori pentru hormoni, markeri de angiogeneză și de proliferare, precum și pentru gene de referință, care se exprimă cvasiconstant în toate țesuturile și gene de control al reacției PCR.
2. Dispozitiv conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că**, genele de interes sunt în număr de optsprezece având simbolurile conform codului din nomenclatorul HGNC: *INS, GAST, PPY, CHGA, SYP, VGF, SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR5, GRPR, MTOR, MGMT, TYMS, MKI67, CCND1, CDH13, SLIT2*, iar secvențele specifice pentru acestea sunt dispuse pe placa PCR pe coloană, în această ordine, urmate de două genele de referință și patru genele de control.
3. Dispozitiv conform revendicărilor 1 și 2 **caracterizat prin aceea că**, cele două gene de referință și cele patru gene de control au simbolurile conform codului din nomenclatorul HGNC: *ACTB, GAPDH*, respectiv *HGDC*, pentru controlul de contaminarea cu ADN genomic uman, *RTC* pentru controlul reacției de revers-transcriere și *PPC* pentru controlul reacției.
4. **Dispozitiv** conform revendicărilor 1 și 3 **caracterizat prin aceea că**, pentru testare în paralel a patru pacienți, placa de PCR este prevăzută cu 96 de godeuri dispuse matriceal 8x12 fiecărui pacient fiindu-i repartizate 3 coloane.



	Pacientul 1			Pacientul 2			Pacientul 3			Pacientul 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	INS	SSIR3	CDHI3	INS	SSIR3	CDHI	INS	SSIR	CDHI	INS	SSIR3	CDHI
B	GAST	SSIR5	SLIT2	GAST	SSIR5	SLIT2	GAST	SSIR5	SLIT2	GAST	SSIR5	SLIT2
C	PPY	GRPR	ACTB	PPY	GRPR	ACTB	PPY	GRPR	ACTB	PPY	GRPR	ACTB
D	CHGA	MTOR	GAPDH	CHGA	MTOR	GAPDH	CHGA	MTOR	GAPDH	CHGA	MTOR	GAPDH
E	SYP	MGMT	HGDC	SYP	MGMT	HGDC	SYP	MGMT	HGDC	SYP	MGMT	HGDC
F	VGF	TYMS	RTC	VGF	TYMS	RTC	VGF	TYMS	RTC	VGF	TYMS	RTC
G	SSIR1	MKI67	RTC	SSIR1	MKI67	RTC	SSIR1	MKI67	RTC	SSIR1	MKI67	RTC
H	SSIR2	CCND1	PPC	SSIR2	CCND1	PPC	SSIR2	CCND1	PPC	SSIR2	CCND1	PPC

Fig. 1

