

Scienze “omiche” e biologia dei sistemi complessi: applicazioni in neurologia pediatrica

Martino Ruggieri¹, Vincenzo Salpietro², Valentina La Cognata³, Giovanna Morello³, Giulia Gentile³, Daniela Concolino⁴, Agata Polizzi^{5,6}, Sebastiano Cavallaro^{3,6}

¹ Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Catania

² Dipartimento di Scienze Pediatriche, Unità di Genetica e Immunologia Pediatrica, Università di Messina

³ Unità di Genomica Funzionale, Istituto di Scienze Neurologiche, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Catania

⁴ Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi “Magna Grecia”, Catanzaro

⁵ Centro Nazionale delle Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

⁶ Istituto di Scienze Neurologiche, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Catania/Catanzaro/Cosenza

Riassunto

Le scienze “omiche” si occupano dello studio di *pool* di molecole biologiche (es., ioni, acidi nucleici, proteine, enzimi) in determinati campioni biologici (per esempio, siero, urine, liquor, saliva, tessuti). Esse analizzano, nel loro insieme: (a) i geni del DNA (genomica) e le loro funzioni (genomica funzionale); (b) i trascritti del DNA, cioè l'RNA (trascrittomica); (c) le proteine (proteomica); (d) i metaboliti all'interno di un organismo (metabolomica). Studiano anche le interazioni tra queste molecole (interattomica) e tra queste molecole e i microrganismi della flora intestinale (microbiomica) o dell'ambiente (infettivoma/infettivomica), i cibi/nutrienti (nutribioma/nutribiomatica) e l'ambiente in generale (ambientoma/ambientomica) nonché le modificazioni prodotte da tali interazioni sul DNA (epigenomica). Lo scopo di tale approccio olistico è quello di poter comprendere operando con approcci integrativi, principi operativi di livello più elevato, che nel complesso definiscono la biologia dei sistemi. Ciò al fine di potere rispondere a domande biologiche gerarchicamente più complicate (per esempio, patogenesi, storia naturale o successo terapeutico e prognosi di una malattia). Si avvalgono dell'impiego di tecniche di analisi genetica comparativa (array-CGH) o di variazioni del numero di copie del DNA (CNV) o di sequenziamento del DNA o computazionali che analizzano dati di decine, centinaia o migliaia di molecole/campioni. Tali metodiche sono oggi disponibili in svariati laboratori internazionali e nazionali. L'articolo analizza tali aspetti generali e di laboratorio e le applicazioni di ricerca e pratiche in neurologia pediatrica: per esempio, marcatori biologici nelle distrofie muscolari, nelle malattie immuno-mediate del sistema nervoso centrale, nelle encefalopatie epilettiche e ipossico-ischemiche, nei traumi cranici ed in neuroncologia; nuovi metaboliti in malattie neurodegenerative rare; analisi di sistemi e di reti neuronali/neurali in neurobiologia dello sviluppo.

Summary

The “omics” focus on the study of pools of biological molecules (e.g., ions, nucleic acids, proteins, enzymes) in biological samples (e.g., serum, urines, cerebrospinal fluid, saliva, tissues). They analyse, as a whole: (a) DNA genes (genomics) and their functions (functional genomics); (b) DNA transcripts or RNA (transcriptomics); (c) proteins (proteomics); (d) metabolites (metabolomics). Omics also study reciprocal interactions occurring between such molecules (interactomics) and those between these molecules and the intestinal bacterial flora (microbiomics), the environmental bacterial flora (bacteriomics), food and nutrients (foodomics) and the environment (enviromics) or the environmental modifications affecting the structure of DNA (epigenomics). The aim of such holistic approach is to understand, operating via integrative approaches, higher and more complex hierarchical principles [e.g., (complex) systems biology] aimed in turn to reply to higher-level biological queries (e.g., pathogenesis, natural history or successful prognostic/therapeutic accomplishments). From a practical viewpoint omics use methodologies and techniques based on comparative array genome analysis (array-CGH), copy number variation (CNV), whole-genome sequencing or computed-based assays, which analyse dozens, hundreds or thousands of molecules/samples. These methodologies are currently available in a number of international and national laboratories. The present review article focuses on these general and laboratory aspects and on the practical laboratory/bench-side applications in the field of paediatric neurology: e.g., biomarkers in muscular dystrophies, in immune-mediated diseases of central nervous system, in epileptic and hypoxic-ischaemic encephalopathies, in brain traumas and in neuroncology; new metabolites in neurodegenerative diseases; analysis of neuronal/neural networks and systems in developmental neurobiology.

Metodologia della ricerca bibliografica

La ricerca degli articoli rilevanti su scienze omiche [omics] e biologia dei sistemi [systems biology] in neurologia pediatrica è stata realizzata utilizzando le seguenti banche dati: (a) Pubmed; e (b) Embase. Le parole chiave utilizzate sono state: “genomics”; “transcriptomics”; “proteomics”; “metabolomics”; “systems biology”; “neurology”; “neurobiology”; “brain”; “nervous system”; “children”; “childhood”; “pediatrics”. È stato utilizzato inoltre il seguente filtro: “years 0-18”. È stata attribuita maggiore importanza ai lavori pubblicati negli ultimi 3-5 anni.

Definizioni

Le scienze omiche studiano pools di molecole biologiche (es., ioni, acidi nucleici, proteine, enzimi), con svariate funzioni all'interno degli organismi viventi. Tali funzioni sono legate alle capacità, intrinseche a tali molecole, di potere trasformare (processo di traslazione) le loro strutture e i loro legami chimici e/o elettrostatici in processi energetici/biochimici volti alla creazione di altre strutture o all'interazione con altre strutture, allo scopo ultimo di modificare/creare strutture o funzioni diverse da quelle originali. Esempio: il DNA, costituito da coppie di acidi nucleici legati da le-

gami chimici/elettrostatici, può alterare tali legami, modificando temporaneamente o permanentemente la propria struttura, creando (tra le altre funzioni) un'altra struttura speculare (l'RNA), che attraverso molteplici passaggi di modificazione della propria struttura, d'interazione con altre strutture e di analisi/interpretazione ("lettura") della propria sequenza strutturale, creerà strutture diverse dalle precedenti (le proteine) con funzioni, legami e interazioni differenti da quelle originali (Mortazavi et al., 2008; Cookson et al., 2009).

Le scienze omiche hanno quindi l'obiettivo primario di analizzare nel loro insieme:

(a) i geni contenuti nel DNA (genomica) e le loro molteplici funzioni (genomica funzionale);

(b) il prodotto della trascrizione del DNA: l'RNA (trascrittomica);

(c) le proteine codificate dal DNA attraverso l'RNA (proteomica);

(d) le molecole che interagiscono all'interno di un organismo (metaboliti: metabolomica).

Tale analisi, negli organismi viventi, avviene in un determinato campione biologico: es., siero, plasma, urine, liquor, condensato del respiro, saliva, secrezioni mucose, cellule e/o tessuti specifici.

Tra gli altri obiettivi delle scienze omiche vi è anche quello di studiare le connessioni e le interazioni reciproche tra i *pool* di molecole biologiche (interattomica) e tra queste molecole e i microrganismi della flora intestinale (microbiomica), o quelli estranei a quest'ambiente (infettivomica), i cibi e/o i nutrienti (nutriomica) e l'ambiente in generale (ambientomica).

Origine del termine "omiche"

L'*Oxford English Dictionary* [OED] riconosce diversi significati del suffisso -omiche (-omics). Uno tra questi è: "... in biologia cellulare e molecolare... il suffisso -omiche è utilizzato per formare nomi con significato di... indicare tutti i costituenti analizzati collettivamente" (*all constituents analysed collectively*).

Le origini del suffisso -oma, si fanno risalire agli ultimi decenni del XIX secolo con la creazione di termini biologici/botanici quali "scleroma" o "rizoma". Tali termini deriverebbero dall'utilizzo del suffisso greco (la sequenza) "ομα", composta da due parti: -ο- μα- derivanti dalla scomposizione di -ο- (intesa nel senso di radice verbale) e -μα- (il vero suffisso greco utilizzato per formare nomi astratti). L'impiego di questa terminologia in campo biomedico risalirebbe agli inizi del XX secolo (1916-1920) con l'utilizzo del termine "bioma" e "genoma" (di origine tedesca), utilizzato per definire la "integrità", la "completezza" di una cosa o di un campo di studi (come accadeva per la parola *genoma* che voleva significare "tutta la costituzione genetica di un organismo"). Furono poi i bioinformatici e i biologi molecolari ad applicare tale suffisso in maniera più ampia ai loro studi e alle loro branche di studio: probabilmente a Hinxton (Cambridge), in Inghilterra, dove sorgevano la maggior parte dei primi e più importanti laboratori di bioinformatica.

Approcci olistici per domande complesse

Le scienze omiche sono sistemi di studio scientifico e tecniche che permettono di analizzare insieme di fattori complessi in maniera olistica: cioè, in biomedicina, *pool* di molecole biologiche, parti di una cellula o sistemi enzimatici, cellulari o tissutali, microrganismi o vie metaboliche, operanti all'interno degli organismi viventi in maniera complessa. Lo scopo di tale approccio olistico è quello di poter comprendere operando con approcci integrativi, principi operativi biologici di livello più elevato (complesso), applicabili a tutti gli organismi

viventi (Geshwind e Konokpa, 2009; Kell et al., 2007; Villoslada et al., 2009).

Nelle scienze biologiche e mediche, non tutte le domande sono formulabili (e quindi risolvibili) direttamente attraverso la singola sperimentazione clinica e/o di laboratorio, essendo fenomeni spesso strutturati in una scala *gerarchica* di eventi, nella quale i livelli sono a loro volta determinati dall'ampiezza/complessità delle risposte che la ricerca si attende. In pratica, una singola domanda o alcuni tipi di domande possono essere risolte attraverso singole conferme sperimentali cliniche e/o di laboratorio che studiano una (sola) parte dell'insieme (modello della "dimostrazione sperimentale di un'ipotesi"). All'estremo opposto di questa gerarchia troviamo però domande più generali, più astratte o più complesse che non possiamo risolvere solo attraverso la dimostrazione di singoli esperimenti clinici e di base. La risposta a tali quesiti complessi può essere ottenuta solo attraverso la creazione, costruzione e/o l'integrazione di modelli induttivi più complessi, per i quali è necessario un grado maggiore di astrazione e di visione d'insieme. L'astrazione, in questo caso, consiste nel sostituire la singola parte del sistema che si sta considerando con un modello simile, ma di struttura più semplice (Villoslada et al., 2009). Spesso i risultati di questo tipo di analisi forniscono risposte inattese o generano nuove domande che richiedono successivi approcci.

Biologia dei sistemi complessi

L'integrazione di tutte le scienze e tecnologie omiche (principalmente: genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica), è definita biologia dei sistemi complessi (Geshwind e Konokpa, 2009; Villoslada et al., 2009; Westerhoff et al., 2004) (Fig. 1).

La novità principale offerta da tale approccio (sistemistico) è il miglioramento della comprensione di un sistema (che è un gruppo di entità, interconnesse, che formano un insieme integrato) considerato come l'insieme di molecole biologiche che lo compongono (e cioè geni, trascritti, proteine, metaboliti) (Fig. 1A). La biologia dei sistemi complessi e le varie tecnologie omiche a essa correlate hanno rivoluzionato negli ultimi anni l'approccio alle patologie umane innovando il metodo scientifico in ambito biomedico. Gli esperimenti di ricerca condotti attraverso l'utilizzo delle sempre crescenti tecnologie di tipo omico non si basano, come accennato sopra, solitamente su ipotesi pre-esistenti (da dimostrare sperimentalmente) ma più spesso generano, attraverso i risultati della ricerca stessa, nuove informazioni e nuove ipotesi che andranno poi analizzate e confermate da successivi studi (Emilsson et al., 2008; Kell et al., 2004).

Metodo riduzionistico vs. approccio sistemistico

Il procedimento di studio delle scienze omiche (e della biologia dei sistemi complessi), ripercorre in senso inverso, le tappe della ricerca biomedica: abbiamo categorizzato i sistemi degli organismi viventi in maniera riduzionistica, per caratteristiche anatomiche, funzioni biologiche o di sistemi/*network*, composizioni cellulari/tissutali, meccanismi di base molecolari/cellulari. Ciò ha contribuito a notevoli successi in campo biomedico: con questo tipo di procedimento, la dimostrazione di una semplice correlazione tra un parametro biologico e il verificarsi di malattia è stato considerato un successo, anche quando i meccanismi patogenetici della malattia rimanevano, per la maggior parte, sconosciuti. Il procedimento di studio di tipo omico e dei sistemi complessi, intende invece trasferire (traslare) le singole conoscenze, le singole dimostrazioni in sistemi assai più

complessi e di livello gerarchicamente più elevato, studiando non solo i componenti di un singolo sistema, ma anche le interazioni tra essi e le interazioni con il resto dell'ambiente (questo di tipo di procedimento è conosciuto come "pensiero sistemistico") (Fig. 1). Ciò al fine di potere rispondere a esigenze e domande più elevate. Guardando al sistema nervoso, ad esempio, bisognerà pensare in termini di sistemi complessi di memoria, apprendimento, comportamento (come sistemi integrati, in senso trasversale) analizzando i diversi fenotipi neurologici e sindromici e cercando di unirli in grandi categorie e gruppi.

Teoria del complesso e della complessità (proprietà emergenti)

L'analisi dei sistemi biologici offre la possibilità di studiare proprietà collettive, cioè proprietà che non possono essere predette dallo studio del comportamento di un singolo componente ma solo dallo studio dell'insieme di quei componenti. Nella biologia dei sistemi, così come nella scienza della complessità, queste proprietà collettive (intrinseche) sono conosciute come emergenti perché sono generate (emergono) da numerose cause e non sono esclusivamente rappresentate dalla sommatoria di tali cause (Geshwind e Konokpa, 2009; Kell et al., 2007; Villoslada et al., 2009). Le proprietà (capacità) emergenti sono comuni a tutti i sistemi fisiologici e sono caratterizzate, ad esempio, dalla capacità di mantenere il volume ematico, la pressione sanguigna, il pH tissutale o la temperatura corporea. Le proprietà emergenti del sistema nervoso (e più specificamente del cervello) includono, ad esempio, i processi di apprendimento, memoria ed emozioni che non possono essere spiegati solo dalla comprensione, anche molto dettagliata e completa, dei meccanismi di funzionamento dei singoli neuroni, perché, in realtà, sono il risultato d'inte-

razioni non-casuali tra cellule altamente specializzate organizzate in reti assai complesse: quindi, la comprensione di tali funzioni/proprietà potrà essere attuata solo evitando di separare tali cellule/reti che andranno studiate nella loro interezza (teoria del complesso e delle complessità).

Cosa ci insegnano i sistemi complessi sociali: popolazioni, internet, reti aeroportuali

Un'applicazione, relativamente recente, della biologia dei sistemi è lo studio di tali sistemi/proprietà attraverso i modelli induttivi e le conoscenze derivate e traslate dall'osservazione delle interazioni tra altri grandi sistemi complessi conosciuti e studiati da più tempo: per esempio, interazioni tra popolazioni o tra gruppi sociali all'interno di popolazioni, sistemi computazionali e internet, sistemi aeroportuali. Per esempio, se all'interno di un sistema (una rete) aeroportuale complesso(a) internazionale (quindi una rete che può connettere diverse città all'interno di una nazione, ma principalmente connette diverse nazioni tra diversi continenti) all'improvviso, o progressivamente, si altera il normale funzionamento (per neve, vento o ghiaccio) di un nodo aeroportuale importante (l'aeroporto JFK di New York), questo mancato funzionamento genererà ripercussioni immediate sul traffico aereo locale del New Jersey (come, ritardi, mancate partenze), ed a poco a poco, anche su quello della costa orientale statunitense ed infine, a breve o medio termine, anche sul traffico aereo dei principali nodi aeroportuali europei, asiatici e così via. Quindi, il mancato funzionamento di un singolo nodo di una rete si ripercuote su altri nodi della rete e poi sull'insieme dei nodi di tutta la rete anche in aree distanti da quella del primo nodo non funzionante. La gravità del danno finale è legata all'impor-

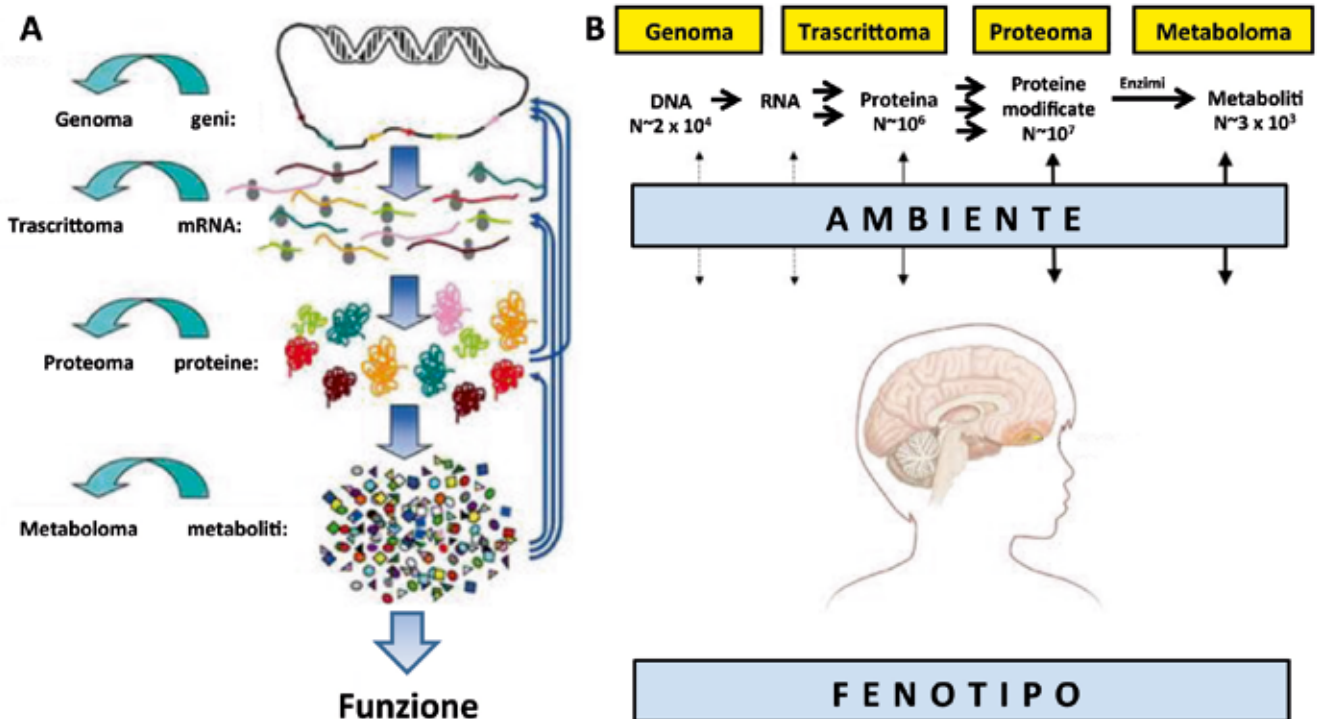


Figura 1. (A) Network di geni, trascritti di m-RNA, proteine e metaboliti formano nel loro insieme il genoma, il trascrittoma, il proteoma ed il metaboloma e la loro interazione con l'ambiente (B) determina il fenotipo finale.

tanza strategica del nodo colpito. Tale modello di funzionamento è stato (e viene) applicato al funzionamento dei nodi delle reti di geni e/o dei nodi e dei circuiti neuronali complessi del cervello e i modelli induttivi. Esempi sono gli studi di genomica funzionale e studi con risonanza magnetica trattografica (cioè analisi di determinati circuiti neuronali attraverso ricostruzioni con *software* dei metaboliti/trasmittitori che li attraversano) traslati alle malattie sistemiche o neurologiche complesse. Ciò, per meglio comprendere come un danno in un determinato gene o in una determinata area cerebrale, possa ripercuotersi su altri geni o su altre regioni cerebrali viciniori o distanti.

Scienze omiche e dei sistemi complessi (applicazioni pratiche): marcatori biologici

Le tecnologie omiche hanno un potenziale di applicazione molto vasto che va dall'aumento della comprensione di svariati processi fisiologici e fisiopatologici, al loro impiego nello *screening*, nella diagnosi e nella valutazione della storia naturale, della risposta alla terapia e/o della prognosi di diverse patologie sia del bambino così come dell'adulto (Muntoni e Cross, 2015). La tendenza naturale delle strategie di ricerca omiche è quella di studiare contemporaneamente diverse molecole con l'obiettivo di identificare (singoli e gruppi di) marcatori biologici che intervengono in vari stadi di una patologia. Le caratteristiche ideali di un marcatore biologico sono la non invasività, il basso costo economico, la sensibilità e la specificità: infine, è di fondamentale importanza che i risultati ottenuti siano facilmente replicabili da altri studi. Sotto quest'aspetto, le scienze omiche operano identificando continuamente nuove molecole e/o ruoli diversi inattesi di molecole già conosciute in precedenza (vedi sotto: sezione malattie neuromuscolari).

Le tecnologie omiche stanno rivestendo crescente importanza ad esempio per l'identificazione di nuovi farmaci e per la valutazione della loro tossicità ed efficacia. Il settore della farmacogenomica è il risultato dell'interazione della genomica con la farmacologia e studia il ruolo dell'ereditarietà nella variazione interindividuale della risposta a determinate terapie, con la prospettiva dell'individualizzazione delle terapie stesse e dell'ottimizzazione della loro efficacia (Evans e Relling, 2004).

L'incontro tra scienze omiche (per esempio, genomica funzionale) e studio del sistema nervoso (per esempio, neuroscienze) ha permesso, ad esempio, sino a oggi, l'identificazione delle basi molecolari della diversità neuronale, della sinaptogenesi, di marcatori biologici di malattia, di meccanismi di malattia e di numerosi segnali all'interno delle vie metaboliche, e la creazione di piattaforme libere di scambio d'informazioni su scala genomica (Colantuoni et al., 2000; Caceres et al., 2003, Diaz 2009) (Fig. 2).

Omiche e sistemi complessi

Genoma e genomica

La genomica è lo studio sistematico del genoma, che rappresenta la quantità totale di DNA di una cellula o un organismo. Il genoma umano contiene oltre 3 miliardi di paia di basi ed almeno 25.000 geni codificanti. Le tecniche di DNA *microarray* consentono di misurare le differenze di espressione delle sequenze di DNA tra diversi individui, permettendo l'analisi dell'espressione di migliaia di geni simultaneamente. Queste tecniche consentono di rilevare la presenza di anomalie come le inserzioni e/o le delezioni cromosomiche at-

traverso l'esame del *CGH* (*Comparative genome hybridisation*) array (Emilsson et al., 2008). Le più comuni varianti inter-individuali nelle sequenze del DNA sono i polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), nei quali un nucleotide si sostituisce a un altro; questi polimorfismi possono avere un significato funzionale soltanto se il cambiamento determina la formazione di un codone che contiene un diverso amminoacido. I polimorfismi a singolo nucleotide possono avere un ruolo anche nella farmacogenomica, cioè nel prevedere le risposte individuali di alcuni pazienti ad alcuni farmaci.

Trascrittoma e trascrittomica

L'espressione dei geni è la parte fondamentale del processo attraverso il quale il genotipo di un individuo può determinare un caratteristico fenotipo (Enard et al., 2002; Faulkner et al., 2009; Watters et al., 2003) (Fig. 1). Le informazioni contenute nei geni vengono utilizzate per creare prodotti funzionali attraverso:

- la generazione di copie di RNA pre-messaggero attraverso il processo di trascrizione, cioè quel processo di assemblaggio di (pre)m-RNA a partire dalla copiatura di una catena di DNA;
- le modificazioni post-trascrizionali che producono diverse forme di RNA messaggero (m-RNA) codificante attraverso fenomeni di *splicing* (dall'inglese "montaggio": fenomeno, che avviene assieme o subito dopo la trascrizione del DNA, attraverso il quale il nascente pre/m-RNA viene modificato attraverso l'eliminazione degli introni e l'unione degli esoni), *capping* (dall'inglese "incapucciare": fenomeno attraverso il quale viene apposta una molecola di 7-metil-guanosina all'estremità 5' terminale del pre-m-RNA che servirà per l'attacco del m-RNA al ribosoma) e poliadenilazione [aggiunta di una sequenza poliadenilica all'estremità 3'OH del nascente catena di pre-m-RNA con funzioni importanti per la successiva lettura ribosomiale e traduzione];
- la sintesi di proteine attraverso il processo di traduzione (assemblaggio del ribosoma dalle due unità maggiore e minore attraverso l'unione di proteine ribosomiche e RNA ribosomiale, che fornirà i meccanismi per decodificare l'm-RNA e successiva lettura del m-RNA con aggiunta sequenziale di aminoacidi [trasportati dall'RNA di trasporto] alla nascente catena peptidica);
- le modificazioni post-traslazionali delle proteine (de la Grange et al., 2010).

Ciascuna di queste fasi è influenzata da una complessa interazione di eventi che sono regolati a più livelli. La prima di queste fasi, la trascrizione, esprime la capacità della cellula di produrre un gruppo di molecole di RNA (o trascritti) che comprendono m-RNA codificante ma anche RNA di trasporto (t-RNA), RNA ribosomiale (r-RNA) e RNA non codificante (nc-RNA), quest'ultimo composto anche da piccoli frammenti di RNA (small-RNA o s-RNA) conosciuti anche come microRNA (miRNA) ed implicati nei processi di attivazione e repressione dell'RNA trascritto, cioè nelle modificazioni post-trascrizionali dell'RNA. Ciascuno di questi tipi di trascritto è presente nelle cellule, regolandone la vita e le funzioni biologiche. Il trascrittoma rappresenta l'insieme di questi tipi di trascritto presenti in una cellula, in un tessuto o in un organismo (Dermitzakis, 2008).

Il trascrittoma può essere considerato quindi una struttura molto complessa e dinamica che è sensibile alle varie fasi dello sviluppo degli organismi, così come all'ambiente dei vari tipi di cellule e tessuti nei quali viene espresso ed agli effetti di fattori esterni che possono influenzare sia i processi trascrizionali che quelli post-trascrizionali. La trascrittomica è quella branca delle scienze omiche che studia questo insieme (il trascrittoma), misurando l'espressione dei geni con indagini molecolari complicate che spaziano dalla tecnologia *microarray* al sequenziamento diretto dell'RNA.

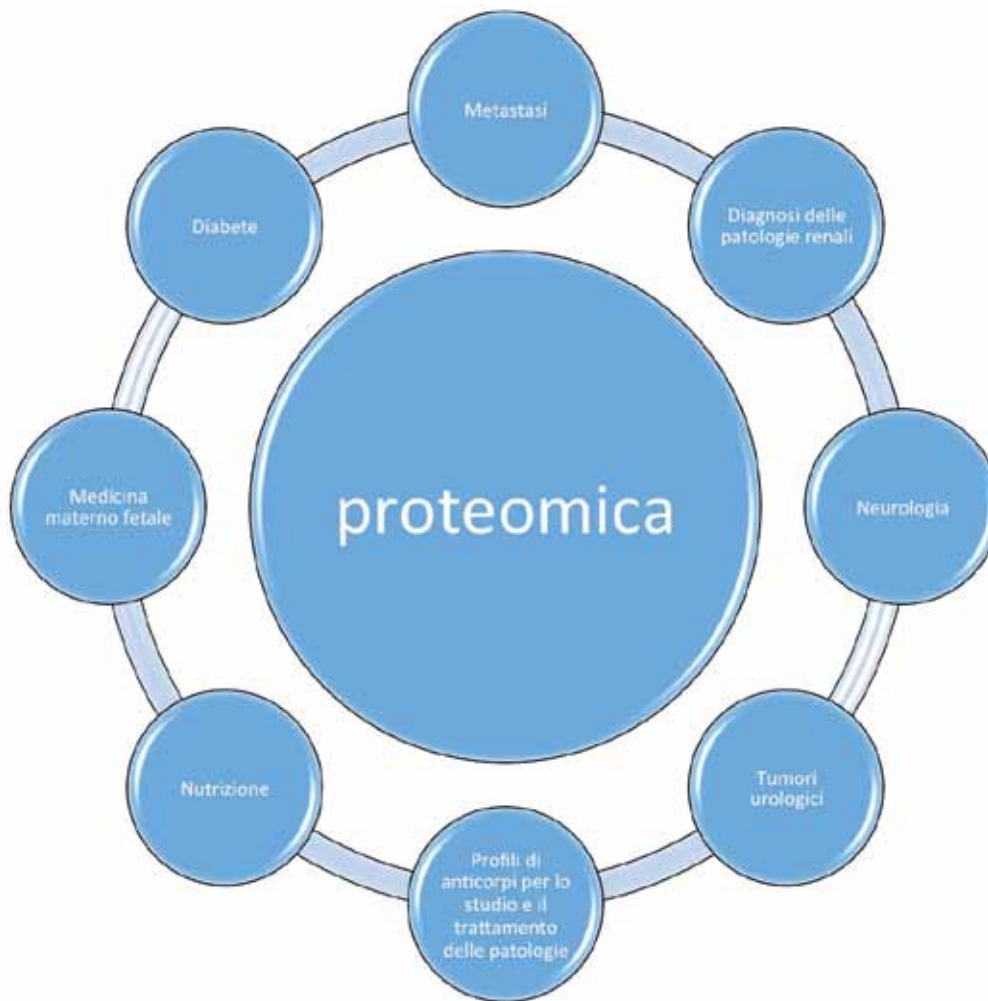


Figura 2.
Applicazioni della proteomica in medicina.

L'obiettivo principale della trascrittomica è di misurare i trascritti e la loro espressione in relazione al tipo di cellule e/o tessuti, così come all'età dell'organismo in cui vengono misurati. Il profilo trascrittomico fornisce informazioni sulle molteplici differenze di espressione di un determinato gruppo di geni sotto l'influenza di vari fattori (Dermitzakis, 2008; Geshwind e Konopka, 2009).

Un singolo gene può esprimersi in molti modi, in relazione allo stadio di sviluppo della cellula e ad eventi esterni ed interni alla cellula. Diversi cambiamenti dell'espressione genica sono stati identificati come causa di patologie genetiche, multifattoriali e di disordini dello sviluppo (Cotton e Scriver 1998; Dermitzakis et al., 2008; Emilsson, et al., 2008; Buechel et al., 2011; Gregg, et al., 2008; Lahiry et al., 2010; Mudge, et al., 2008; Muers 2010). Anche la posizione, l'ingombro sterico e le differenze dell'architettura territoriale tra i singoli cromosomi e più in generale del materiale genetico all'interno del nucleo gioca un ruolo importante per i processi di trascrizione ed espressione genica (Cremer et al., 2006). Ruoli importanti vengono infine assunti anche da fenomeni epigenetici causati dall'ambiente, alimentazione, dieta e calore nella modulazione del materiale genetico trasmesso, ad esempio, per via paterna (es., sperma, liquido seminale) (Rando 2012).

Proteoma e proteomica

Il proteoma è definito come l'insieme di tutte le proteine espresse in un sistema biologico (una cellula, un tessuto, o l'intero organismo)

(Theodorescu et al., 2007). Scopo della proteomica è di caratterizzare le reti di proteine (*networks*) interconnesse che operano scambiando informazioni all'interno delle cellule e/o dell'organismo, con l'obiettivo di comprenderne le funzioni e le interazioni con agenti esterni (Petricoin et al. 2002).

Il proteoma rappresenta quindi l'espressione dinamica sia dei geni che dei fattori ambientali ed il suo studio è altamente promettente per l'identificazione di nuovi marcatori biologici in varie patologie (Vlahou et al., 2005) (Fig. 2). L'impiego della proteomica ha già prodotto risultati importanti, identificando proteine che rappresentano marcatori biologici altamente sensibili (quali, l'alfa-fetoproteina sierica nelle malformazioni congenite del tubo neurale o nella sindrome di Down; gli antigeni carcino-embionari in alcune patologie neoplastiche) (Rifai et al., 2006).

Metabolomica

La metabolomica è la scienza omica che si basa sull'analisi e l'interpretazione delle funzioni dei metaboliti (molecole di basso peso molecolare) di un determinato sistema biologico (cellula, tessuto, sistema, organismo) sotto l'influenza di una serie di condizioni (Kell et al., 2006; Wikoff et al., 2007). Tra tutte le tecnologie omiche la metabolomica è la più recente ed è considerata quella che si avvicina di più all'espressione definitiva del fenotipo, inteso come risultato dell'interazione tra geni ed ambiente. Le tecnologie metabolomiche hanno infatti la caratteristica di studiare non soltanto le correlazioni genotipo/fenotipo, ma

anche quelle tra genotipo e ambiente (ambientoma in inglese *enviromics*) cioè l'insieme dei fattori ambientali che agiscono dall'esterno influenzando il fenotipo finale (Fig. 3) (Emilsson et al., 2008).

L'espressione del profilo metabolico (metaboloma) di uno specifico sistema biologico è infatti il risultato finale delle informazioni contenute nel codice genetico, dopo la sovrapposizione di altri fattori non relativi al genoma, come ad esempio l'interazione con i microorganismi commensali (microbioma), i fattori nutrizionali (nutrioma), gli agenti infettivi (infettivoma), l'esposizione a farmaci e/o sostanze tossiche (farmaco/tossico-genoma) (Urbanczyk-Wochniak et al., 2003). Poiché il metaboloma rappresenta il prodotto finale della trascrizione dei geni dopo l'impatto con i possibili fattori ambientali, tutti i cambiamenti del trascrittoma e del proteoma si rifletteranno sul profilo metabolico finale (cioè sul metaboloma). Per tale motivo la metabolomica può essere considerata la tecnologia più promettente nello studio del fenotipo complesso di un organismo (Dessi et al., 2014).

I metodi impiegati per le analisi metabolomiche sono generalmente basati su indagini spettrometriche (spettrometria di massa, spettrometria basata sulla risonanza magnetica nucleare o entrambe) (Fig. 4) (Fanos et al., 2013).

Epigenomica

Infine, tutti quei cambiamenti che alterano la funzione e l'espressione dei geni senza alterare la struttura del DNA, quali, metilazione del DNA e rimodellamento/compattamento della cromatica (modificazioni degli istoni), modificazione dei trascritti dell'RNA (da parte dei micro-RNA) e della codificazione delle proteine, modificazione degli stessi micro-RNA e modificazioni da prioni, e che possono essere o non essere ereditati, sono oggetto dello studio dell'epigenetica. Lo studio di tutti questi fenomeni considerati nel loro insieme è conosciuto come epigenomica (de la Grange et al., 2010).

Malattie genetiche "monogeniche" vs. "monotrascrittomiche" vs. "monoproteiche"

In base alle conoscenze attuali e a quanto prima esposto, le malattie genetiche non dovrebbero essere più chiamate monogeniche, ma

(anche) monotrascrittomiche o monoproteomiche e probabilmente non esistono malattie monogeniche, ma malattie da (errata o alterata) interazione tra più geni, più trascritti o più proteine e quindi in ultima analisi, probabilmente, non esistono più malattie monogeniche in senso stretto, ma tutte le malattie sono causate (prevalentemente) da un singolo gene con associate alterazioni di altri geni o di diversi trascritti o diverse proteine o errate interazioni tra geni con trascritti e proteine o tra diversi trascritti e così via. Ci stiamo quindi muovendo e ci muoveremo sempre più tra breve verso un nuovo concetto di malattie genetiche, dove le mutazioni di singoli geni specifici non giustificano la complessità dei fenotipi (Samocha et al., 2014).

Il laboratorio delle scienze omiche

La preparazione di esperimenti che utilizzano le tecnologie omiche devono essere eseguiti secondo procedure standardizzate e riproducibili (Brenner et al., 2000; Heinrich et al., 2007; MacArthur et al., 2014; Molyneux et al., 2007; Pan et al., 2008; Samocha et al., 2014; Wang et al., 2008, 2009).

In genomica, le tecniche di *microarray* possono essere applicate con varie finalità, tra queste la principale è sicuramente l'analisi dell'espressione genica. Il principio alla base del *microarray* è il legame selettivo delle molecole di m-RNA, attraverso l'appaiamento delle basi, a una sequenza di DNA complementare. Il DNA complementare viene prima amplificato da una reazione di polimerasi a catena (PCR) e successivamente immobilizzato su una griglia che funge da supporto solido per l'appaiamento con il DNA complementare (cDNA) che viene estratto (attraverso un processo di trascrizione inversa) dalle molecole di m-RNA che devono essere analizzate (Ramskold et al., 2009; MacArthur et al., 2014).

I procedimenti iniziali di un esperimento di proteomica si basano sulla purificazione e il frazionamento (attraverso tecniche cromatografiche) dei campioni, in modo da ridurre la complessità del proteoma da analizzare e interpretare. Questi procedimenti sono strettamente dipendenti dal tipo di campione biologico che si utilizza (es.,

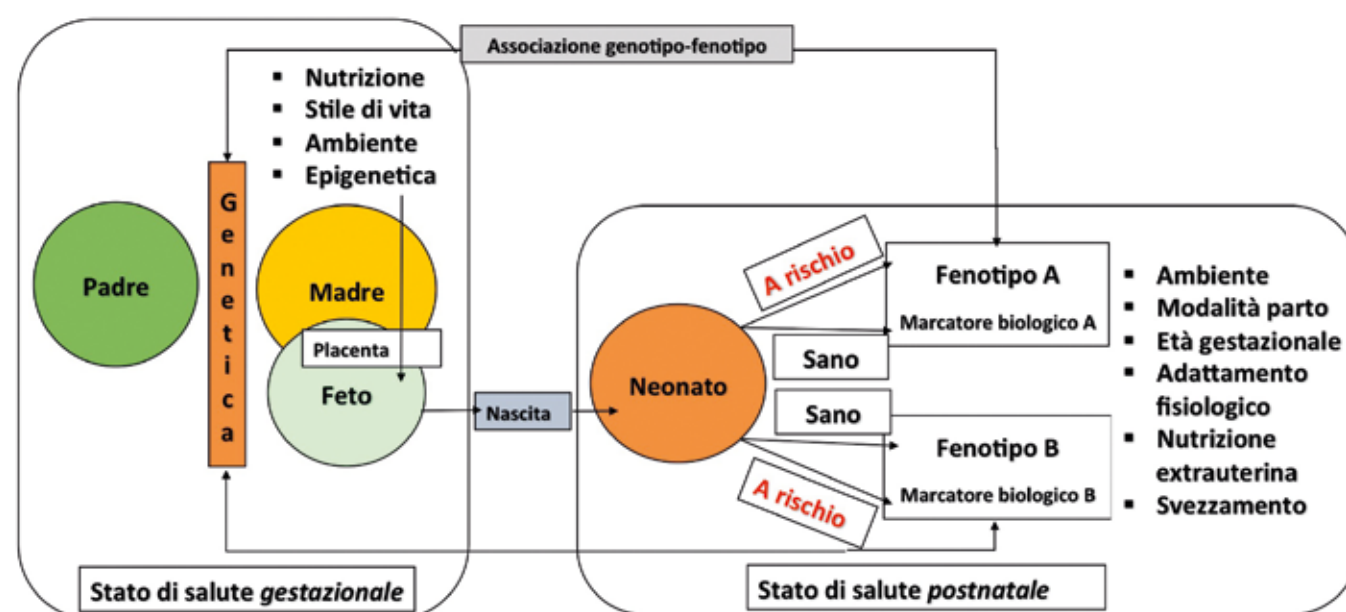


Figura 3.

Influenza dell'"ambientoma" materno (es., stile di vita e nutrizione della madre) sul feto e influenza dei fattori ambientali perinatali (es., modalità del parto, età gestazionale, adattamenti fisiologici) sul neonato e interazioni/influenze del patrimonio genetico (paterno/materno).

plasma, siero, urine, liquor cefalo-rachidiano, ecc.). Nel caso delle urine, ad esempio, saranno necessarie varie tecniche aggiuntive di preparazione del campione che vanno dall'ultrafiltrazione alla precipitazione, procedimenti necessari a rimuovere gli elettroliti e concentrare le proteine presenti (Muers, 2010).

Anche negli studi eseguiti con tecniche metabolomiche la preparazione degli esperimenti è correlata al tipo di campione da analizzare. I campioni prima di essere analizzati devono infatti essere pretrattati con tecniche di frazionamento (cromatografia o elettroforesi) che permettono la separazione delle varie componenti (proteine, metaboliti) sfruttandone le diverse proprietà chimico-fisiche (Fanos et al., 2013).

La spettrometria di massa è la tecnica maggiormente utilizzata per identificare ed analizzare il proteoma e il metaboloma dei campioni biologici (Fig. 4). La spettrometria con risonanza magnetica nucleare presenta il limite di poter identificare i metaboliti solo se presenti in concentrazioni molto elevate (Ramskold et al., 2009).

Gli studi che si basano su tecnologie omiche hanno la caratteristica di generare un enorme quantità di dati, per cui successivamente agli esperimenti in laboratorio sarà necessario utilizzare *software* di bioinformatica e statistica per eliminare i falsi positivi e per elaborare le informazioni al fine di creare modelli multidimensionali che spieghino le interazioni all'interno del sistema e tra i vari sistemi (Amaral et al., 2011; Gerhold et al., 2002; Human Genome Sequencing Consortium 2004; Irizarry et al., 2005; Kawasaki 2006; Landgraf et al.,

2007; Marioni et al., 2008; Pedotti et al., 2008; Hoen et al., 2008; Velculescu et al., 1995) (Fig. 5).

Scienze omiche e biologia dei sistemi complessi in neurologia pediatrica

Biologia dei sistemi complessi e neurobiologia dello sviluppo

La biologia dei sistemi complessi sta rivestendo un ruolo sempre maggiore in neurologia e nello studio del cervello umano (Arhondakis et al., 2011; Asmann et al., 2009; Barton et al., 1993; Catts et al., 2005; Chodroff et al., 2010; de Magalhaes et al., 2005; Fung et al., 2011; Kuss e Chen, 2008; Lockhart et al., 2011; Mexal et al., 2006; Myers et al., 2007; Nadler et al., 2006; Schonrock et al., 2010; St. Laurent et al., 2009; Strand et al., 2006; van der Brug et al., 2010; Zu et al., 2010).

Un settore di ricerca strategico e a sé stante è quello rappresentato dall'applicazione delle tecnologie omiche nello studio delle malattie neurologiche del bambino e dei disturbi neurologici e psichiatrici nell'età dello sviluppo (Chodroff et al., 2010; Erray-Benchekroun et al., 2005; Fung et al., 2011; Ponjavic et al., 2009; Roth et al., 2006; Ziatts et al., 2011).

L'approccio omico nell'ambito delle neuroscienze pediatriche offre infatti una interessante finestra di opportunità per la comprensione

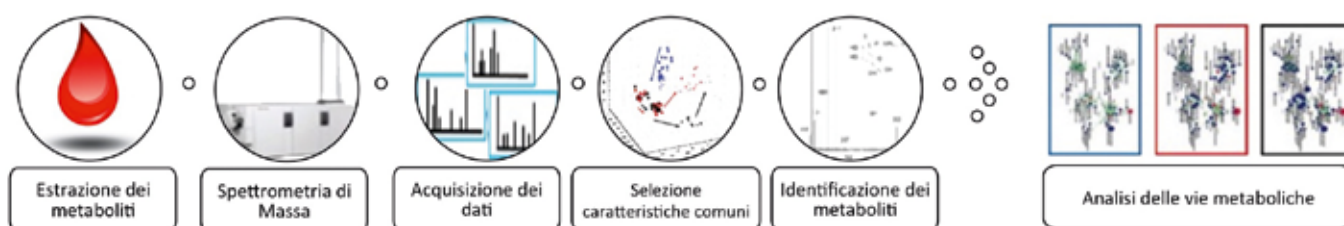


Figura 4.

Sequenza di indagini metabolomiche: dall'estrazione dei metaboliti, alla spettrometria di massa, acquisizione dei dati, selezione di caratteristiche comuni ai vari metaboliti, identificazione dei metaboliti, sino a giungere alla loro analisi e ricostruzione attraverso tecniche di bioinformatica per costruire vie (cascate) metaboliche comuni.

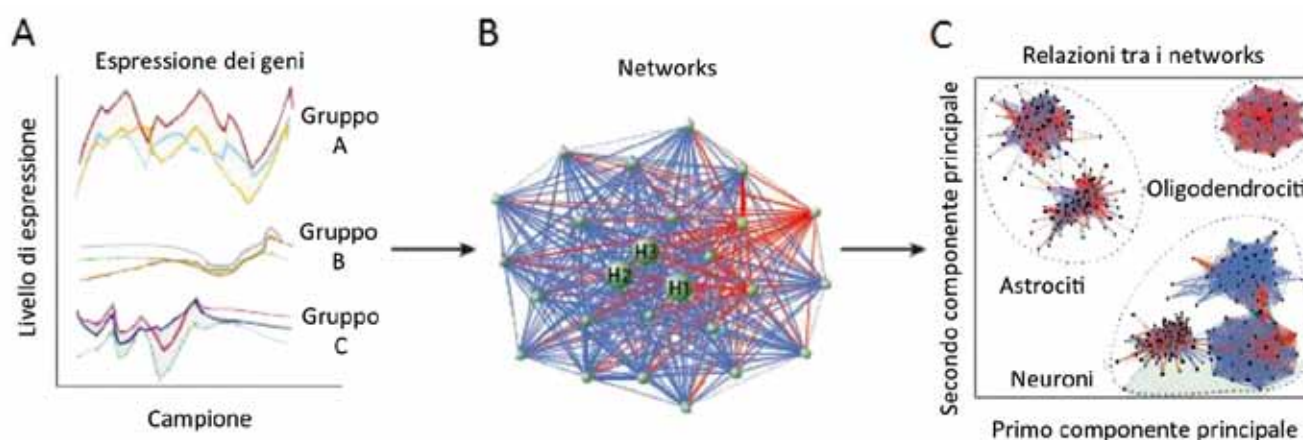


Figura 5.

La misurazione dell'espressione di alcuni geni (espressi) nel sistema nervoso (A) permette di creare modelli di interconnessione tra tali geni volti a formare reti complesse (*network*) (B); l'analisi di queste reti complesse permette infine di rappresentare in maniera multidimensionale (C) le singole reti distinguendole e separandole in gruppi funzionali che comprendono differenti cellule del sistema nervoso (centrale) (adattata e modificata da Geschwind e Konopka, 2009).

della complessa variabilità biologica dell'espressione dei geni, dei trascritti, delle proteine e dei metaboliti durante lo sviluppo delle strutture del sistema nervoso (dalla vita prenatale all'età evolutiva, sino a quella adulta) (Nadeau 2001).

Com'è noto dall'embriologia, la maggior parte delle cellule cerebrali sono formate già prima della nascita, ma il peso dell'encefalo di un bambino alla nascita costituisce il 25% di quello che raggiungerà durante l'età adulta. Per qualche anno dopo la nascita, il sistema nervoso centrale continua ad accrescersi per raggiungere, entro l'età di 2 anni, circa l'80% del peso di quello dell'adulto (Dekaban et al., 1978).

I neuroni e le cellule del sistema nervoso centrale possono sviluppare molte connessioni dopo la nascita, ma la maggior parte di queste si realizzano nel corso della prima infanzia, in risposta a nuove esperienze e stimoli di apprendimento. All'età di circa 20 anni il sistema nervoso centrale avrà raggiunto una completa maturazione, anche se alcuni processi di sviluppo, come la mielinizzazione degli assoni, proseguiranno sino alla età adulta (Sowell et al., 2004). Durante l'età adulta (dopo i 50 anni) si verificano diversi cambiamenti correlati all'età caratterizzati dalla riduzione del peso e del volume dell'encefalo con diminuzione del numero dei neuroni (Masliah et al., 1993); una riduzione del numero delle sinapsi (Peters, 2008) ed una riduzione della sintesi dei neurotrasmettitori e della densità dei loro recettori (Wong et al., 1984; Amenta et al., 1991; Ota et al., 2006). Come risultato di questi cambiamenti, legati all'avanzare degli anni, il sistema nervoso centrale perde la sua plasticità e si osserva un certo grado di declino delle funzioni cognitive ed un aumento percentuale delle malattie neurologiche correlate all'età (Burke et al., 2006; Salthouse et al., 2009).

Questi cambiamenti sono dovuti a variazioni dinamiche a livello molecolare, che coinvolgono l'espressione genica (Hof et al., 2004; Hong et al., 2008; Lu et al., 2004; Masliah et al., 1993; Somel et al., 2006, 2009, 2010). Il trascrittoma del sistema nervoso centrale, così come quello degli altri tessuti, è infatti un sistema dinamico che cambia continuamente durante l'arco della vita, attraverso lo sviluppo dell'encefalo (Naumova et al., 2013). Alcuni studi hanno documentato un'associazione tra la trascrizione e lo sviluppo del sistema nervoso centrale ed hanno dimostrato il ruolo fondamentale dell'espressione dei geni nella formazione delle sinapsi e in vari altri aspetti legati alle funzioni mentali superiori (Diaz et al., 2002, 2009; Flavell et al., 2008).

Nel sistema nervoso centrale si verificano numerosi cambiamenti anatomici, durante la vita prenatale e l'età pediatrica, sempre accompagnati da variazioni dinamiche nell'espressione genica a livello del tessuto cerebrale (Courchesne et al., 2000). Diversi studi di analisi dell'espressione genomica nel SNC durante l'età dello sviluppo hanno documentato che l'organizzazione spaziale e temporale del trascrittoma nel SNC del feto durante la vita prenatale è più complessa di quella nelle fasi dello sviluppo successive alla nascita (Colantuoni et al., 2011; Johnson et al., 2009; Kang et al., 2011; Lambert et al., 2011; Somel et al., 2010).

È stato documentato che il numero di geni espressi in specifiche regioni della neocorteccia gradualmente decresce attraverso i vari stadi dell'età evolutiva: dal 57,7% dei geni temporaneamente espressi durante la vita fetale al 9,1% espressi durante lo sviluppo post-natale (dalla nascita all'adolescenza), fino allo 0,7% espressi nella vita adulta (dai 20 ai 60 anni) (Kang et al., 2011).

Alcuni geni coinvolti nello sviluppo del linguaggio e delle abilità linguistiche (FOXP2, CNTNAP2, CNTNAP5), ad esempio, sono altamente espressi nella vita fetale e nella prima infanzia, per poi essere progressivamente meno espressi durante lo sviluppo del bambino (Abrahams et al., 2007; Johnson et al., 2009).

Un esempio della dinamica temporale dell'espressione del trascrittoma nel SNC fetale è una riduzione delle differenze interemisferiche dell'espressione genica durante gli stadi prenatali dello sviluppo. Durante la vita intrauterina, già a partire dalla 14[°] settimana di gravidanza, è riconoscibile una significativa asimmetria dell'espressione genica tra l'emisfero destro e quello sinistro (Sun et al., 2005): tale asimmetria si riduce progressivamente dopo la nascita, sino a scomparire completamente con l'inizio della vita adulta (Khaitovich et al., 2004).

Gli studi di genomica funzionale hanno dimostrato che i geni coinvolti nella differenziazione neuronale, nella proliferazione cellulare e nella migrazione dei neuroni hanno la loro massima espressione nella corteccia del feto tra la 10[°] e la 13[°] settimana di gravidanza, e la loro espressione si riduce sensibilmente e gradualmente dopo la 17[°] settimana. I geni associati con lo sviluppo dei dendriti e delle sinapsi (compresi i geni che codificano per i canali ionici) hanno invece un notevole aumento della loro espressione nelle ultime fasi della vita fetale (dopo la 20[°] settimana) fino all'adolescenza (Kang et al., 2011). Nonostante l'espressione di geni a livello del sistema nervoso centrale sia maggiore durante la vita fetale che in qualsiasi altro stadio dello sviluppo, questa espressione rimane relativamente alta nel corso di tutta l'età pediatrica (specialmente nella prima infanzia) se comparata all'età adulta (Colantuoni et al., 2011). Gli studi di neurobiologia dello sviluppo hanno quindi fornito negli ultimi anni importanti informazioni sulla estrema variabilità dell'espressione genica del sistema nervoso centrale durante l'età evolutiva.

L'applicazione di tali conoscenze rappresenta un'importante prospettiva di ricerca nell'ambito della neurologia pediatrica. Fasi precise della vita pre-natale costituiscono infatti il momento di insorgenza di determinate patologie genetiche e neurologiche di alcuni bambini, aprendo scenari sull'applicazione delle tecnologie omiche anche nella diagnosi pre-natale. Infine, tali conoscenze divengono/diverranno cruciali nella comprensione di determinate malattie proprie delle fasce d'età più piccole, che in fasi successive dello sviluppo, modificano le proprie caratteristiche fenotipiche evolvendo in forme sindromiche differenti o scomparendo del tutto. Le stesse conoscenze sono importanti per comprendere perché i fenotipi pediatrici neurologici sono talora totalmente differenti dalle rispettive controparti dell'età adulta. Alcune patologie infine presentano storie naturali diverse in età infantile precoce, in età pre-scolare vs. pre-puberale e nell'adolescenza.

Scienze omiche e malattie immuno-mediate del sistema nervoso centrale: sclerosi multipla

Un approccio di tipo omico è stato utilizzato negli ultimi anni in alcuni studi per analizzare il profilo proteomico e metabolomico della *sclerosi multipla* (SM) a esordio in età pediatrica: ciò anche al fine di potere identificare eventuali marcatori biologici (precoci) per la diagnosi. Nello studio della SM a esordio nell'età adulta una delle maggiori limitazioni è rappresentata dal fatto che si assume che le alterazioni fisiopatologiche iniziali si siano verificate (da un punto di vista biologico) anche diversi anni prima dell'inizio delle manifestazioni cliniche. L'età pediatrica ben rappresenta invece una finestra temporale di opportunità importante per la comprensione fisiopatologica dei disordini demielinizzanti acquisiti e in particolare della SM, poiché consente di studiare più precocemente i fenomeni che si verificano in questo gruppo di patologie, sia a livello molecolare che clinico.

In uno studio che ha analizzato il profilo proteomico di un gruppo di 9 pazienti pediatrici con diagnosi di SM ad esordio infantile vs. 9 bambini sani (selezionati come controllo per sesso ed età) (Rithidech

et al., 2009) sono state estratte le proteine dal plasma utilizzando tecniche di elettroforesi bidimensionale su gel e il proteoma totale è stato poi analizzato con metodiche di spettrometria di massa: è stato evidenziato un aumento dell'espressione di 12 proteine (alfa-1-glicoproteina acida 1, alfa-1-B-glicoproteina, transtiretina, apolipoproteina-C III, componente serico dell'amiloide P, fattore-I del complemento, clusterina, gelsolina, emopessina, chininogeno-1, hCG1993037 e proteina legante la vitamina D) ed è stato quindi ipotizzato il coinvolgimento di tali proteine nella patogenesi della SM infantile e la loro potenziale applicazione come marcatori biologici diagnostici e/o prognostici della malattia.

In un altro studio più recente (Dhaunchak et al., 2012) (Fig. 6), 19 bambini sono stati arruolati prospetticamente al momento dell'esordio di patologia demielinizante del sistema nervoso centrale. Il proteoma è stato estratto dal liquido cefalo-rachidiano, separato e analizzato con tecniche di spettrometria di massa. L'analisi proteomica ha evidenziato un aumento significativo del profilo di proteine strutturali dell'apparato gliale, tra cui la neurofucsina e la contactina: non sono stati evidenziati invece aumenti delle più importanti proteine compatte di membrana della mielina (es., proteina di membrana degli oligodendrociti, MOG) abitualmente implicate nella patogenesi della SM in età adulta (vs. altre glicoproteine degli oligodendrociti: vedi sotto). Anche in questo caso sono state formulate nuove ipotesi

sul coinvolgimento iniziale della glia, antecedente il danno mielinico, nella patogenesi degli eventi demielinizanti della SM. Com'è noto da diversi studi epidemiologici e clinici, solo una piccola percentuale dei bambini che presentano un episodio isolato di demielinizzazione del sistema nervoso centrale, svilupperà in seguito SM, e in questi bambini l'intervallo tra il primo e il secondo episodio è solitamente inferiore ai 2 anni. Nello studio di Dhaunchak e collaboratori (2012), dei 19 bambini arruolati prospetticamente, 8/19 hanno sviluppato ulteriori episodi di demielinizzazione ed in questi è stata posta diagnosi di SM sulla base dei criteri clinici e neuroradiologici; 11/19 hanno invece presentato esclusivamente un unico episodio di demielinizzazione (definita in questo caso monofasica). L'analisi del profilo proteico del liquor all'esordio (primo attacco) ha identificato nel gruppo che ha sviluppato in seguito la SM (8/19 bambini), un aumento significativo della concentrazione di alcune proteine come la glicoproteina della mielina degli oligodendrociti (OMGP) e la gliomedina, entrambe molto importanti nell'assemblaggio dei nodi di Ranvier e degli assoni e della membrana esterna dell'apparato asso-gliale. L'espressione di tali proteine era invece assente o significativamente ridotta nel gruppo di bambini con demielinizzazione monofasica (n = 11/19). Questi risultati hanno suggerito l'importante ruolo dei nodi di Ranvier e delle membrane dell'apparato asso-gliale nell'evento fisiopatologico iniziale della SM ed hanno aperto la

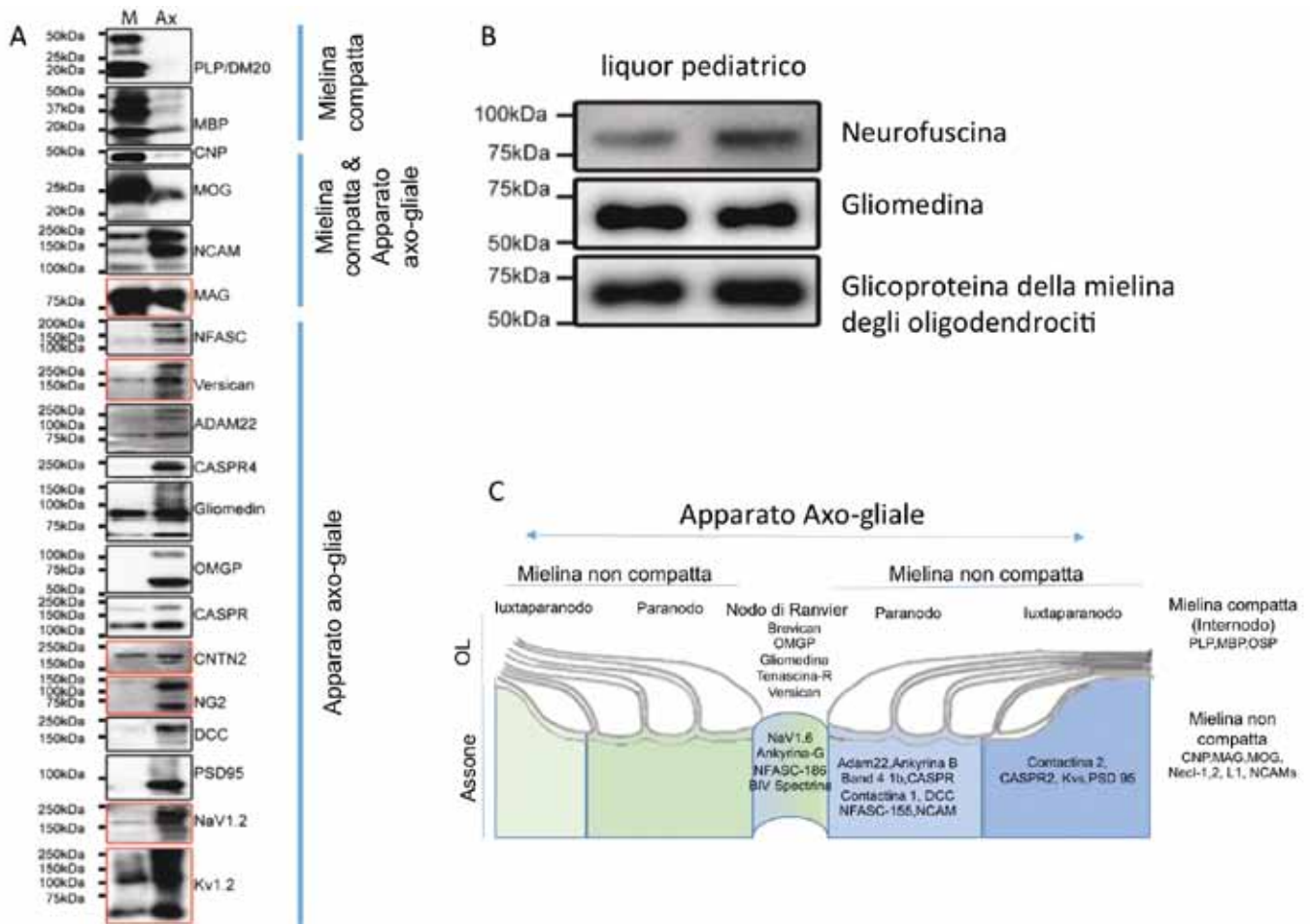


Figura 6. (A) Espressione delle proteine dell'apparato gliale in uno studio proteomico su liquor in bambini affetti da patologia demielinizante del sistema nervoso centrale; (B) proteine maggiormente espresse nel liquor nel gruppo di studio (neurofucsina, gliomedina e glicoproteina della mielina degli oligodendrociti); (C) caratterizzazione della struttura dell'apparato gliale e dell'insieme di proteine che lo costituiscono (adattata e modificata da Dhaunchak et al., 2012).

strada a un potenziale impiego di tecnologie proteomiche sul liquor, a scopo predittivo e prognostico, per l'identificazione dei pazienti pediatrici esposti a maggiore rischio di sviluppare la SM dopo un singolo episodio di demielinizzazione del sistema nervoso centrale.

Scienze omiche e neuro-oncologia

La possibilità di poter identificare delle proteine che servano da marcatori biologici per la diagnosi precoce, la classificazione (molecolare), la prognosi/stratificazione del rischio e la risposta alla terapia delle neoplasie del sistema nervoso centrale in età pediatrica, rappresenta un'area di ricerca emergente nel settore della neuro-oncologia (Samuel et al., 2014).

In modelli animali è stato dimostrato che l'analisi del profilo proteico sul liquor cefalorachidiano può rilevare la presenza di una neoplasia che interessa il sistema nervoso centrale, prima ancora che questa divenga sintomatica o identificabile con metodiche tradizionali (Within et al., 2012).

Elevati livelli di alfa-fetoproteina e di beta-gonadotropina corionica umana nel siero e nel liquor sono considerati ottimi marcatori biologici diagnostici dei tumori cerebrali a cellule germinali e una loro riduzione durante la radioterapia è considerata alla stregua di una significativa risposta al trattamento (Legault et al., 2013).

Altri marcatori biologici utilizzati recentemente, individuati grazie a studi di proteomica/metabolomica (in campioni biologici quali siero, urine, liquor e tessuti tumorali) e utilizzati in ambito neuro-oncologico pediatrico sono la fosfatasi alcalina placentare per il germinoma, la L-selectina per la leucemia linfoblastica acuta con coinvolgimento del sistema nervoso centrale, l'osteopontina per i tumori teratoidi e rabdoidi, la ciclofillina A per i gliomi pontini intrinseci diffusi, la proteina legante il fattore di crescita insulino-simile per l'ependimoma e il medulloblastoma infantili (Saratsis et al., 2012; Samuel et al., 2014).

Uno studio multicentrico di analisi proteomica sul liquor di bambini con diagnosi di medulloblastoma ha inoltre indicato i bassi livelli di prostaglandina D2 sintetasi come un affidabile e significativo marcatore diagnostico di medulloblastoma infantile (Rajagopal et al., 2011).

Uno studio volto ad analizzare il contenuto totale proteico e l'espressione di micro-RNA negli astrocitomi ad esordio in età pediatrica (Ruiz Esparza-Garrido et al., 2013), attraverso tecniche bidimensionali SDS-PAGE, spettrometria di massa (MALDI-TOF) ed analisi PCR mediata RT(2) dei miRNA, ha evidenziato 49 proteine con alterati profili di espressione. Lo studio interattomico ha quindi dimostrato, per la prima volta, che alcune di queste 49 proteine isolate, la vimentina, la calreticulina e la proteina 14-3-3 epsilon, si comportano da proteine di tipo *hub* (di progressione tumorale) per gli astrocitomi in questa fascia d'età, individuando degli utili marcatori biologici di progressione che possono essere impiegati come fattori prognostici e terapeutici.

Un altro studio (De Antonellis et al., 2014) ha impiegato tecniche di proteomica per analizzare gli effetti della sovra-espressione del *miR-34a* (una proteina diretta contro geni che codificano per proteine coinvolte nella proliferazione, invasività cellulare e apoptosi tumorale) nel neuroblastoma, impiegando un sistema d'induzione delle tetracicline in due linee cellulari tumorali di neuroblastoma (SHEP e SH-SY5Y) con marcatori post-metabolici. Delle 2.082 proteine identificate 186 subivano una regolazione (112/186 *down*-regolate e 74 *up*-regolate) e di queste 32 presentavano trascritti con sequenze miR-34a. Combinando i dati di proteomica con curve di espressione genica sono stati identificati 7 prodotti proteici codificati da altrettanti geni (ALG13, TIMM13, TGM2, ABCF2, CTCF, Ki67, e LYAR) correlati con un decorso tumorale sfavorevole. Combinando infine questi dati con i dati con-

tenuti nei *database* delle vie metaboliche cellulari è stato riscontrato che queste 7 proteine regolano il ciclo, la proliferazione e l'adesione cellulare focale ed altre funzioni connesse all'aggressione e invasività tumorale (includendo alcune vie metaboliche conosciute come la GF- β , WNT, MAPK, e la FAK). La conclusione di questo elegante studio è l'identificazione di proteine bersaglio (precoce) del miR-34a che giocano ruoli importanti nella tumorigenesi del neuroblastoma e che potranno essere impiegate (assieme al miR-34a) in future strategie terapeutiche del neuroblastoma.

L'identificazione di questi profili proteomici alterati presenta un potenziale importante nell'avanzamento della nostra comprensione dei meccanismi fisiopatologici alla base di diverse neoplasie cerebrali dell'infanzia, oltre a rivestire una grande utilità in ambito diagnostico e prognostico e nel follow-up dopo la terapia.

Gli svantaggi dell'applicazione delle tecniche proteomiche nei pazienti pediatrici con neoplasie del sistema nervoso centrale rimangono ancora oggi il rischio di risultati falsamente positivi, la bassa specificità di alcuni di questi marcatori biologici e la loro limitata utilità per quelle neoplasie che non si sviluppano in prossimità del sistema ventricolare e del liquor cefalo-rachidiano (rischio di falsi negativi) (Samuel et al., 2014).

Scienze omiche, errori congeniti del metabolismo e malattie neurodegenerative

La metabolomica è stata utilizzata come tecnica per studiare diversi errori congeniti del metabolismo, variabilmente caratterizzati da coinvolgimento neurologico e aspetti neurodegenerativi a carico del sistema nervoso centrale.

Uno studio con spettrometria di massa ha documentato alterazioni metabolomiche specifiche per patologia nel plasma di un gruppo di bambini ($n = 34$) affetti da diversi errori congeniti del metabolismo (Janečková et al., 2012), inclusi difetti del metabolismo degli amminoacidi (fenilchetonuria, leucinosi, tirosinemia, argininemia, omocistinuria) deficit di carbamil fosfato sintetasi, deficit di ornitina transcarbamilasi, acidemie organiche (acidemia metilmalonica, acidemia propionica, acidemia glutarica, acidemia isovalerica), e difetti mitocondriali (deficit di Acil CoA deidrogenasi a catena media, deficit di carnitina palmitoiltrasferasi II).

In uno studio recente (Pastore A et al., 2013) con tecniche metabolomiche associate a tecniche di spettrofotometria è stato identificato un deficit di glutazione ridotto (ed un aumento delle forme di glutazione ossidato) in un gruppo di bambini con encefalomiopatia mitocondriale da sindrome di Leigh geneticamente confermata. L'aumento del glutazione ridotto osservato nel corso della risposta alla terapia con para-benzochinonici (EPI-743) ha inoltre aperto futuri possibili scenari sull'utilizzo di questo *marker* come indicatore dell'efficacia della terapia.

Scienze omiche e patologie neuro-muscolari: distrofie/atrofie muscolari e neuropatie

La diagnosi delle più frequenti tra le patologie muscolari del bambino, la distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e la Distrofia muscolare di Becker (DMB), è tradizionalmente basata su metodiche invasive (biopsia muscolare) che tipicamente sono eseguite alla luce di segni clinici specifici e indici di laboratorio alterati (es., incremento sierico degli enzimi muscolari) e successivamente confermate da studi di genetica molecolare (le indagini genetiche possono precedere le metodiche più invasive). Negli ultimi anni alcuni studi basati su

tecnologie omiche, hanno cercato di identificare marcatori biologici diagnostici alternativi nell'ambito delle distrofie muscolari infantili, che servono anche da indicatori di storia naturale e progressione (utili anche ai fini terapeutici).

Studi su modelli animali e su campioni tissutali sierici (Cacchiarelli et al., 2011a, 2011b) hanno dimostrato che, in seguito al danno muscolare, nel sangue di pazienti con DMD e DMB, oltre ai comuni enzimi muscolari (come CK), si osservano anche notevoli quantità di micro-RNA, ed in particolare che i miR-1, miR-133- e miR-206 rappresentano oggi dei validi marcatori biologici di danno muscolare e possono quindi essere impiegati nella diagnostica delle distrofie muscolari. Inoltre, correlano in maniera significativa con la storia naturale della malattia, riflettendo bene i parametri di gravità e di miglioramento/peggioramento terapeutico.

Uno studio recente di proteomica che ha analizzato campioni raccolti da pazienti affetti da varie forme di distrofia muscolare (DMD, DMB) o portatori asintomatici, attraverso un consorzio (BIO-NMD) costituito in quattro aree geografiche diverse (inglesi e italiane) (Ayoglu et al., 2014) ha identificato un *panel* di 11 proteine con profili alterati: (a) in 4/11 erano presenti in livelli elevati nel sangue dei pazienti affetti: anidrasi carbonica III (CA3 Ab#1), catena leggera della miosina (MYL3), malato deidrogenasi mitocondriale 2 (MDH2) e flavoproteina trasportatrice di elettroni A (ETF A); (b) tutte le 11 proteine identificate, comprese anche le proteine CA3 Ab#2, TNNT3, CK, ETFB, beta-enolase-3 (ENO3), LCP1, PPM1F e COL6A1, avevano valori differenti a seconda della forma clinica (DMD vs. BMD), dello stato del paziente (deambulante vs. non deambulante) o delle capacità respiratorie. Lo studio dimostra come altre proteine, oltre alla classica proteina CK, possono avere concentrazioni elevate nel sangue e sono quindi coinvolte nella funzione muscolare e nei processi energetici del muscolo.

Uno studio ha analizzato il profilo proteomico nelle urine di 53 pazienti pediatrici affetti da DMD, confrontandolo con un gruppo di controlli sani (n = 51) ed ha identificato diversi possibili marcatori diagnostici. Il dato più significativo emerso da questo studio è stato l'elevato livello di frazioni proteiche della *titina*, una proteina fisiologicamente coinvolta nei meccanismi di elasticità della muscolatura scheletrica (Rouillon et al., 2014). Mutazioni del gene della titina erano state in precedenza associate a diverse forme di miopatie ereditarie (cardiomiopatia familiare, distrofia muscolare della tibia); questo studio proteomico ha quindi confermato il coinvolgimento di questa proteina nella fisiopatologia del danno muscolare nella DMD. Un'alterata escrezione urinaria della titina è stata riscontrata nello stesso studio anche in un gruppo di soggetti affetti da distrofia muscolare di Becker (DMB) e da distrofia scapolo-omerale (SHD). Un aumento significativo della concentrazione dei frammenti di titina è stato infine confermato nel modello animale con deficit di distrofina, soprattutto durante le prove da sforzo (Rouillon et al., 2014).

La titina può quindi essere considerata come il primo marcatore biologico che offre la possibilità di uno *screening* semplice, non invasivo e non sofisticato (come l'indagine genetica) nelle distrofie muscolari, potenzialmente utile anche nel *follow-up* dei pazienti per valutare la risposta alla terapia. La limitazione consiste (attualmente) nella sua scarsa specificità, poiché tutte le patologie muscolari con danno del tessuto muscolare potrebbero potenzialmente associarsi ad una maggiore escrezione urinaria di titina.

Uno studio pilota (Finkel et al., 2012) realizzato con un approccio trascrittomico, proteomico e metabolomico ha analizzato possibili marcatori biologici nel plasma e nelle urine di un'ampia coorte di bambini (n = 108) affetti da atrofia muscolare spinale (SMA tipo 1, 2 e 3), confermata con test genetico. Oltre ad essere state identificate numerose (n = 97) proteine plasmatiche come potenziali marcatori

biologici, è stata riscontrata una maggiore concentrazione di alcune proteine (CILP2, COMP, TNXB, THBS4, SPP1, COL2A1). Essendo molte di queste proteine implicate nella meccanica e nella fisiologia del tessuto connettivo, gli autori hanno ipotizzato che il loro aumento nel plasma possa essere il risultato del danno secondario del tessuto connettivo che si verifica nella storia naturale della SMA.

Un altro studio (Mussche et al., 2012) ha analizzato comparativamente i profili proteici di 4 soggetti con neuropatia assonale gigante (GAN: una forma genetica di neuropatia con crescita esagerata degli assoni nei nervi periferici) e 4 controlli sani selezionati per sesso ed età, attraverso metodica iTRAQ. Sono stati evidenziati profili alterati in diverse proteine del citoscheletro (proteina ribosomiale L29 ed L37, galectina-1, nessina derivata dalla glia, aminopeptidasi-N e proteine nucleari legate alle proteine legate alla formina) con conservazione del numero (n = 76) e dei profili delle proteine strutturali del citoscheletro (cioè malgrado il ruolo patogenetico conosciuto della gigassonina sia quello di degradazione delle proteine strutturali del citoscheletro). L'incrocio di tali informazioni con l'analisi dei dati contenuti nei database delle vie metaboliche cellulari ha evidenziato che tali proteine rivestono ruoli importanti nella regolazione/riorganizzazione del citoscheletro e sono determinanti per la formazione patologica di filamenti di tipo intermedio nella GAN. Quindi, in questo caso, lo studio proteomico non ha confermato il supposto meccanismo patogenetico della malattia, scoprendo allo stesso tempo meccanismi patogenetici differenti.

Scienze omiche ed encefalopatie epilettiche precoci: sindrome degli spasmi infantili

Studi metabolomici hanno evidenziato in varie forme di epilessia delle variazioni della concentrazione di alcuni aminoacidi plasmatici, tra cui la riduzione plasmatica della treonina e del triptofano o l'aumento della glicina; alterazioni dei profili metabolomici dell'L-glutamato e dell'acido gamma-aminobutirrico sono state inoltre riscontrate nel plasma di pazienti con epilessia da difetti del metabolismo di questi neurotrasmettitori (Wei et al., 2012).

Uno studio di proteomica su modelli animali affetti dalla sindrome degli spasmi infantili ha identificato, attraverso tecniche di elettroforesi bidimensionale e spettrometria di massa, l'aumento di alcune proteine (CFL1, PKM2, PRPS2, DLAT, CKB, DPYSL3 e SNAP25) su campioni di tessuto cerebrale (Wang et al., 2014). Nello stesso studio, in un altro gruppo di animali da esperimento con sindrome degli spasmi infantili e storia di stress perinatale, sono state evidenziate alterazioni del profilo proteomico con aumento dell'espressione di altre proteine (MDH1 e YWHAZ) a livello di campioni di tessuto cerebrale (Wang et al., 2014). Tali proteine sono coinvolte in molti meccanismi di regolazione energetica, rimodellamento neuronale e sviluppo del sistema nervoso centrale, e questi risultati hanno consentito di aggiungere nuove informazioni sulla patogenesi molecolare degli spasmi epilettici.

Sulla base di queste ricerche sperimentali, ulteriori studi con tecniche metabolomiche saranno necessari in futuro per analizzare il profilo metabolomico nel plasma e nel liquor di bambini affetti da sindrome degli spasmi infantili.

Scienze omiche ed encefalopatia ipossico-ischemica

L'encefalopatia ipossico-ischemica (EII) è caratterizzata da una patogenesi multifattoriale che vede coinvolti diversi meccanismi tra

cui l'accumulo intracellulare di calcio, il rilascio di aminoacidi eccitatori e la produzione di specie reattive dell'ossigeno. Tutti questi eventi patologici culminano nell'alterazione della permeabilità della membrana mitocondriale e nella morte cellulare.

L'ipotermia rappresenta a tutt'oggi il *gold standard* terapeutico della EII, ma secondo protocollo deve essere praticata entro le prime 6 ore di vita, dopo un'accurata valutazione clinica e neurologica del neonato (Scala di Sarnat). Quest'arco di tempo molto ristretto rende difficile il riconoscimento ed il trattamento tempestivo dei neonati con EII e per tale motivo, accanto alla valutazione clinica, diversi studi basati su tecniche proteomiche hanno proposto l'individuazione di possibili marcatori biologici diagnostici e prognostici, rivelandosi le indagini strumentali (es., risonanza magnetica/RM) spesso poco specifiche nella valutazione della gravità e nella prognosi a lungo termine (Nagdyman et al., 2003; Tekgul et al., 2004).

Negli ultimi anni la metabolomica ha assunto un ruolo promettente in questo campo, data la complessa multifattorialità degli eventi patologici che conducono alla EII. Lo studio dei metaboliti a basso peso molecolare può infatti fornire un quadro più informativo (se comparato allo studio di un numero limitato di proteine con la proteomica) di tutte le vie metaboliche molecolari coinvolte nel danno ipossico-ischemico del sistema nervoso centrale. La metabolomica potrebbe consentire in futuro lo studio accurato del fenotipo biochimico, quindi dell'insieme di fattori endogeni (geni, trascritti, proteine, metaboliti) ed esogeni (danno legato all'asfissia perinatale), che intervengono nella fisiopatologia dell'EII.

In un importante studio (Walsh et al., 2012), sono stati messi a confronto i profili metabolomici di pazienti appartenenti a 3 gruppi diversi: (a) 31 neonati con EII diagnostica clinicamente (scala di Sarnat); (b) 40 neonati con asfissia perinatale ma senza segni di encefalopatia; e (c) 71 neonati sani. Dalle analisi dei metaboliti su siero estratto da sangue del cordone ombelicale è stato identificato un significativo aumento di 3 classi distinte di metaboliti (amminoacidi, acil-carnitine e fosfatidil-coline) nei neonati con asfissia ed EII (gruppi a e b) rispetto ai controlli sani (gruppo c). Di questi metaboliti, le fosfatidil-coline sono risultate significativamente maggiori nel gruppo con asfissia senza encefalopatia (b) vs. i controlli (c); gli aminoacidi maggiori invece nel gruppo con EII (a) vs. i controlli (c). Infine le acil-carnitine, anche se aumentate in tutti i neonati con asfissia (n = 71) rispetto a quelli sani (n = 71) sono risultate notevolmente più elevate nel gruppo con EII (a) rispetto al gruppo con asfissia perinatale senza EII (b).

Questi risultati incoraggiano la potenziale applicazione diagnostica di alcune classi di metaboliti e forniscono nuovi spunti di riflessione sulla fisiopatologia e le prospettive terapeutiche del danno ipossico-ischemico nel neonato, confermando alcune ricerche precedenti. Com'è noto infatti, in seguito all'asfissia perinatale si verifica una riduzione delle reazioni di β -ossidazione con un ridotto utilizzo metabolico degli acidi grassi e conseguentemente avviene la mobilitazione degli aminoacidi plasmatici che vengono utilizzati come substrati energetici (Whitmer et al., 1978; Van Cappellen van Walsum et al., 2001). Queste variazioni biochimiche della EII assumono quindi oggi maggiore importanza alla luce dei risultati degli studi metabolomici, e rappresentano pertanto *target* di potenziali futuri trattamenti.

Scienze omiche e traumi cranici

L'individuazione di marcatori biologici di danno cerebrale traumatico è stata oggetto negli ultimi anni di intensa attività di ricerca in

campo neurologico negli ultimi anni. La possibilità di identificare un marcatore, complementare alle metodiche di *imaging* cerebrale, più sensibile e specifico di queste ultime e poco costoso, rappresenterebbe un ausilio di grande utilità nell'approccio al paziente neurologico con trauma cranico. Negli ultimi anni è stata largamente studiata, la S100 β sierica, una proteina che lega il calcio e che aumenta sensibilmente dopo il trauma cranico grave. La sua scarsa specificità (aumenta in conseguenza di tutti i processi che portano a danno cerebrale) ne ha limitato però l'effettiva efficacia diagnostica.

In uno studio realizzato con approccio proteomico su un gruppo di bambini con trauma cranico grave (Glasgow Coma Score < 8), confermato dalle indagini di tomografia computerizzata (TC), è stata valutata l'espressione dei profili proteici su sangue (prelevato entro le prime 8 ore dall'evento traumatico) attraverso metodiche di spettroscopia di massa. Dopo l'analisi dei dati proteomici, sono state identificate delle proteine (leucil-aminopeptidasi e la proteina precursore della β -amiloidi) che correlavano significativamente con la gravità del trauma cranico (Glasgow come Score).

Ulteriori studi realizzati con tecniche omiche si renderanno necessari in futuro per identificare marcatori biologici sensibili e specifici che permettano di valutare la gravità e la prognosi del trauma cranico nel paziente pediatrico.

Scienze omiche e malattie neurocutanee/amartomatosi

Alcuni studi, effettuati con l'ausilio di tecniche proteomiche, hanno fornito negli ultimi anni informazioni preziose sul fenotipo di alcune malattie neurocutanee.

Uno studio sperimentale (Hirayama et al., 2013) condotto su linee cellulari con ridotta espressione di neurofibromina (la proteina codificata dal gene NF1, della neurofibromatosi tipo 1, NF1) ha portato, attraverso tecniche di analisi proteomica, all'identificazione di una nuova possibile via metabolica molecolare intracellulare (dineina-IC2-GR-COX-1) potenzialmente determinante nel fenotipo della NF1. La dineina è una proteina abbondantemente espressa nel sistema nervoso centrale e la sua interazione con altre proteine è fondamentale nel trasporto di vari metaboliti e neurotrasmettitori. Questa via è risultata particolarmente attiva nelle linee cellulari con deficit di neurofibromina e i risultati preliminari indicano un suo potenziale coinvolgimento nella patogenesi del danno neuronale e nel fenotipo neurocutaneo completo della NF1, aprendo scenari su future prospettive terapeutiche mirate ad un'azione su questa via molecolare.

Un altro studio (Mejia et al., 2013) su linee cellulari neuronali, realizzato con tecniche omiche, ha individuato recentemente una stretta interazione tra la proteina *Hap-1* e la proteina amartina (codificata da uno dei due geni responsabili della sclerosi tuberosa, il gene TSC1). L'analisi proteomica ha dimostrato che un deficit di espressione della proteina *Hap-1* si correla con una riduzione dell'attività dell'amartina e conseguenti alterazioni della morfologia neuronale, specialmente a livello dell'ippocampo e del sistema limbico. Ciò ha permesso una nuova interpretazione della fisiopatologia dei disturbi pervasivi dello sviluppo e dello spettro autistico che si riscontrano frequentemente nei bambini affetti da sclerosi tuberosa.

Ulteriori studi con approccio proteomico e metabolomico potrebbero in futuro fornire informazioni importanti sulla storia naturale e la prognosi di molte sindromi neurocutanee in età pediatrica.

Conclusioni

L'avvento delle tecnologie omiche ha avuto un impatto enorme nel settore delle neuroscienze, facilitando la comprensione della funzione di geni, proteine, metaboliti e delle loro interazioni con l'ambiente nel determinare fenotipi neurologici complessi. Le scienze omiche nel loro

insieme potrebbero presto riuscire a identificare numerosi meccanismi fisiologici e fisiopatologici che stanno alla base di molte patologie neurologiche del bambino. Esse rappresentano una nuova maniera di pensare in biomedicina. La futura applicazione di queste tecniche ha enormi potenzialità nell'avanzamento della pratica clinica per quanto riguarda la diagnosi, la prognosi e il *follow-up* del "bambino neurologico".

Box di orientamento

Cosa sapevamo prima

La ricerca (biomedica) pediatrica generale e neurologica tradizionale hanno proceduto sinora prevalentemente categorizzando i sistemi degli organismi viventi in maniera riduzionistica, cioè per caratteristiche anatomiche, funzioni biologiche o di sistemi/network, composizioni cellulari/tissutali, meccanismi di base molecolari/cellulari. Ciò ha contribuito a notevoli successi in campo biomedico: con questo tipo di procedimento, la dimostrazione di una semplice correlazione tra un parametro biologico (es., l'alterazione di un gene, una proteina, un enzima, un'area cerebrale) e il verificarsi di una malattia è stato considerato un successo, anche quando i meccanismi patogenetici della malattia rimanevano, per la maggior parte, sconosciuti.

Cosa sappiamo adesso

Il procedimento di studio di tipo omico e dei sistemi biologici complessi, intende invece trasferire (traslare) le singole conoscenze e le singole dimostrazioni sperimentali scientifiche in sistemi assai più complessi e di livello gerarchicamente più elevato, studiando non solo i componenti di un singolo sistema ma anche le interazioni tra essi (es., il trascritto di un gene, cioè l'RNA, e il suo prodotto finale, cioè le proteine) e le interazioni con il resto dell'ambiente inteso in termini di insieme (pensiero sistemistico). Ciò al fine di potere rispondere a esigenze e domande più elevate in maniera olistica (meccanismi patogenetici e sistemi complessi: es., memoria, comportamento, apprendimento e relative patologie). In termini pratici le omiche studiano pool di molecole biologiche, parti di una cellula o complessi sistemi enzimatici, cellulari o tissutali, microrganismi, vie metaboliche o reti e sistemi variamente interconnessi tra loro. Ulteriori e preziose informazioni provengono dallo studio dei sistemi complessi sociali: es., interazioni tra popolazioni nel mondo, internet, nodi aeroportuali. Lo studio di tali sistemi applicato alla biologia dei sistemi, permette approcci diversi da quelli tradizionali allo studio delle reti e dei sistemi biologici (es., reti neurali, sistemi fisiologici).

Quali ricadute sulla pratica clinica

I primi risultati provenienti dal "laboratorio delle omiche" in neurologia pediatrica, hanno permesso l'identificazione delle basi molecolari della diversità neuronale, della sinaptogenesi e dello sviluppo del sistema nervoso nel bambino. Più di recente sono stati individuati nuovi marcatori biologici di malattia (es., nuove molecole nelle distrofie muscolari, malattie immuno-mediate del sistema nervoso ed encefalopatie epilettiche), che correlano meglio dei classici marcatori (es., enzimi muscolari, proteine della mielina, micro-RNA) con la storia naturale della malattia, la prognosi e l'efficacia terapeutica; nuovi (e inattesi) meccanismi di malattia e di segnali all'interno delle vie metaboliche. Si stanno creando, attraverso consorzi nazionali/internazionali piattaforme web per lo scambio d'informazioni su dati genetici, trascrittomici, proteomici e metabolomici. Inoltre, i costi delle piattaforme di laboratorio si stanno abbassando, rendendo disponibili tecnologie prima non affrontabili dai comuni laboratori e su più vasta scala.

Bibliografia

- Abrahams BS, Tentler D, Perederiy JV, et al. *Genome-wide analyses of human perisylvian cerebral cortical patterning*. Proc Natl Acad Sci 2007;104:17849-54.
- Amaral PP, Clark MB, Gascoigne DK, et al. *IncRNAdb: a reference database for long noncoding RNAs*. Nucleic Acids Res 2011;39:D146-D151.
- Amenta F, Zaccheo D, Collier WL. *Neurotransmitters, neuroreceptors and aging*. Mech Ageing Dev 1991;61:249-73.
- Ansorge WJ. *Next-generation DNA sequencing techniques*. N Biotechnol 2009;25:195-203.
- Arhondakis S, Kossida S. *Compositional perspectives on human brain aging*. Bio Systems 2011;104:94-8.
- Asmann YW, Klee EW, Thompson EA, et al. *3' tag digital gene expression profiling of human brain and universal reference RNA using Illumina Genome Analyzer*. BMC Genomics 2009;10:531.
- Ayoglu B, Chaouch A, Lochmüller H, et al. *Affinity proteomics within rare diseases: a BIO-NMD study for blood biomarkers of muscular dystrophies*. EMBO Mol Med 2014;6:918-36.
- Barton AJL, Pearson RCA, Najlerahim A, et al. *Pre- and post-mortem influences on brain RNA*. J Neurochem 1993;61:1-11.
- Brenner S, Johnson M, Bridgman J, et al. *Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays*. Nat Biotechnol 2000;18:630-4.
- Buechel HM, Popovic J, Searcy JL, et al. *Deep sleep and parietal cortex gene expression changes are related to cognitive deficits with age*. PLoS One 2011;6:e18387.
- Burke SN, Barnes CA. *Neural plasticity in the ageing brain*. Nat Reviews Neurosci 2006;7:30-40.
- Caceres M, Lachuer J, Zapala MA, et al. *Elevated gene expression lev-*

- els distinguish human from non-human primate brains*. Proc Natl Acad Sci 2003;100:13030-5.
- Cacchiarelli D, Incitti T, Martone J, et al. *miR-31 modulates dystrophin expression: new implications for Duchenne muscular dystrophy therapy*. EMBO Rep 2011;12:136-41.
- Cacchiarelli D, Legnini I, Martone J, et al. *miRNAs as serum biomarkers for Duchenne muscular dystrophy*. EMBO Mol Med 2011;3:258-65.
- Catts VS, Catts SV, Fernandez HR, et al. *A microarray study of post-mortem mRNA degradation in mouse brain tissue*. Brain Res Mol Brain Res 2005;138:164-77.
- Chodroff RA, Goodstadt L, Sirey TM, et al. *Long noncoding RNA genes: conservation of sequence and brain expression among diverse amniotes*. Genome Biol 2010;11:R8.
- Colantuoni C, Lipska BK, Ye T, et al. *Temporal dynamics and genetic control of transcription in the human prefrontal cortex*. Nature 2011;478:519-24.
- Colantuoni C, Purcell AE, Bouton CML, et al. *High throughput analysis of gene expression in the human brain*. J Neurosci Res 2000;59:1-10.
- Cookson W, Liang L, Abecasis G, et al. *Mapping complex disease traits with global gene expression*. Nat Reviews Genet 2009; 10:184-94.
- Cotton RG, Scriver CR. *Proof of "disease causing" mutation*. Hum Mutat 1998;12:1-3.
- Courchesne E, Chisum HJ, Townsend J, et al. *Normal brain development and aging: Quantitative analysis at in vivo MR imaging in healthy volunteers*. Radiology 2000;216:672-82.
- Cremer T1, Cremer M, Dietzel S, et al. *Chromosome territories - a functional nuclear landscape*. Curr Opin Cell Biol 2006;18:307-16.
- * Articolo importante ed elegante che descrive anche iconograficamente la "geografia" dei cromosomi all'interno del nucleo spiegando le cause delle cromosomopatie in chiave di ingombro volumetrico e sterico.

- De Antonellis P, Carotenuto M, Vandenbussche J, et al. *Early targets of miR-34a in neuroblastoma*. Mol Cell Proteomics 2014;13:2114-31.
- de la Grange P, Grataadou L, Delord M, et al. *Splicing factor and exon profiling across human tissues*. Nucleic Acids Res 2010;38:2825-38.
- de Magalhaes JP, Church GM. *Genomes optimize reproduction: Aging as a consequence of the developmental program*. Physiology 2005;20:252-9.
- Dekaban AS, Sadowsky D. *Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights*. Ann Neurol 1978;4:345-56.
- Dermitzakis ET. *From gene expression to disease risk*. Nat Genet 2008;40:492-3.
- Dessi A, Cesare Marincola F, Masili A, et al. *Clinical metabolomics and nutrition: the new frontier in neonatology and pediatrics*. Biomed Res Int 2014;2014:981219.
- Dhaunchak AS, Becker C, Schulman H, et al. *Implication of perturbed axoglial apparatus in early pediatric multiple sclerosis*. Ann Neurol 2012;71:601-13.
- Diaz E. *From microarrays to mechanisms of brain development and function*. Biochem Biophys Res Commun 2009;385:129-31.
- Diaz E, Ge Y, Yang YH, et al. *Molecular analysis of gene expression in the developing pontocerebellar projection system*. Neuron 2002;36:417-34.
- Emilsson V, Thorleifsson G, Zhang B, et al. *Genetics of gene expression and its effect on disease*. Nature 2008;452:423-8.
- Enard W, Khaitovich P, Klose J, et al. *Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns*. Science 2002; 296:340-3.
- Erraji-Benchekroun L, Underwood MD, Arango V, et al. *Molecular aging in human prefrontal cortex is selective and continuous throughout adult life*. Biological Psychiatry 2005;57:549.
- Evans WE, Relling MV. *Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics*. Nature 2004;429:464-8.
- Fanos V, Antonucci R, Atzori L. *Metabolomics in the developing infant*. Curr Opin Pediatr 2013 Aug 29. [Epub ahead of print]
- Faulkner GJ, Kimura Y, Daub CO, et al. *The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells*. Nat Genet 2009;41:563-71.
- Finkel RS, Crawford TO, Swoboda KJ, et al. *Pilot Study of Biomarkers for Spinal Muscular Atrophy Trial Group. Candidate proteins, metabolites and transcripts in the Biomarkers for Spinal Muscular Atrophy (BforSMA) clinical study*. PLoS One 2012;7:e35462.
- Flavell SW, Greenberg ME. *Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system*. Annu Rev Neurosci 2008;31:563-90.
- Fung SJ, Webster MJ, Shannon, et al. *Expression of VGLUT1 and VGAT mRNAs in human dorsolateral prefrontal cortex during development and in schizophrenia*. Brain Research 2011;1388:22-31.
- Gerhold DL, Jensen RV, Gullans SR. *Better therapeutics through microarrays*. Nat Genet 2002;32(Suppl):547-51.
- Geshwind DH, Konopka G. *Neuroscience in the era of functional genomics and systems biology*. Nature 2009;461:908-15.
- ** Articolo molto importante per la disamina dettagliata delle varie omiche e delle metodologie impiegate in omica e nella biologia dei sistemi.
- Gregg JP, Lit L, Baron CA, et al. *Gene expression changes in children with autism*. Genomics 2008;91:22-9.
- Heinrich M, Matt K, Lutz-Bonengel S, et al. *Successful RNA extraction from various human postmortem tissues*. Int J Legal Med 2007;121:136-42.
- Hirayama M, Kobayashi D, Mizuguchi S, et al. *Integrated proteomics identified novel activation of dynein IC2-GR-COX-1 signaling in neurofibromatosis type 1 (NF1) disease model cells*. Mol Cell Proteomics 2013;12:1377-94.
- Hof PR, Morrison JH. *The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits*. Trends Neurosci 2004;27:607-13.
- Hong M-G, Myers AJ, Magnusson PKE, et al. *Transcriptome-wide assessment of human brain and lymphocyte senescence*. PLoS One 2008;3:e3024.
- Human Genome Sequencing Consortium. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature 2004;431:931-45.
- Irizarry RA, Warren D, Spencer F, et al. *Multiple-laboratory comparison of microarray platforms*. Nat Methods 2005;2:345-50.
- Janečková H, Hron K, Wojtowitz P, et al. *Targeted metabolomic analysis of plasma samples for the diagnosis of inherited metabolic disorders*. J Chromatogr A 2012;1226:11-7.
- Johnson MB, Kawasawa YI, Mason CE, et al. *Functional and evolutionary insights into human brain development through global transcriptome analysis*. Neuron 2009;62:494-509.
- Kang HJ, Kawasawa YI, Cheng F, et al. *Spatio-temporal transcriptome of the human brain*. Nature 2011;478:483-9.
- Kawasaki ES. *The end of the microarray Tower of Babel: will universal standards lead the way?* J Biomol Tech 2006;17:200-6.
- Kell DB. *Systems biology, metabolic modelling and metabolomics in drug discovery and development*. Drug Discov Today 2006;11:1085-92.
- Kell DB. *The virtual human: towards a global systems biology of multiscale, distributed biochemical network models*. Iubmb Life 2007;59:689-95.
- ** Articolo che descrive in maniera completa ed elegante la biologia dei sistemi come visione globale e metodo procedurale d'indagine scientifica.
- Kell DB, Oliver SG. *Here is the evidence, now what is the hypothesis? The complementary roles of inductive and hypothesis-driven science in the post-genomic era*. Bioessays 2004;26:99-105.
- Khaitovich P, Muetzel B, She X, et al. *Regional patterns of gene expression in human and chimpanzee brains*. Genome Res 2004;14:1462-73.
- Kuss AW, Chen W. *MicroRNAs in brain function and disease*. Curr Neurol Neurosci Rep 2008;8:190-7.
- Lambert N, Lambot MA, Bilheu A, et al. *Genes expressed in specific areas of the human fetal cerebral cortex display distinct patterns of evolution*. PLoS One 2011;6:e17753.
- Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing*. Cell 2007;129:1401-14.
- Lahiry P, Torkamani A, Schork NJ, et al. *Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships*. Nat Rev Genet 2010;11:60-74.
- Legault G, Allen JC. *Potential role of ventricular tumor markers in CNS germ cell tumors*. Pediatr Blood Cancer 2013;60:1647-50.
- Lockhart, DJ, Barlow C. *DNA arrays and gene expression analysis in the brain*. In: Chin HR, Moldin SO (eds). *Methods in genomic neuroscience*. New York/NY: CRC Press LLC 2001; pp. 109-40.
- Lu T, Pan Y, Kao S-Y, et al. *Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain*. Nature 2004;429:883-91.
- MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock PD, et al. *Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease*. Nature 2014;508:469-76.
- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, et al. *RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays*. Genome Res 2008;18:1509-17.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, et al. *Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging*. Neurology 1993;43:192-7.
- Mejia LA, Litterman N, Ikeuchi Y, et al. *A novel Hap1-Tsc1 interaction regulates neuronal mTORC1 signaling and morphogenesis in the brain*. J Neurosci 2013;33:18015-21.
- Mexal S, Berger R, Adams CE, et al. *Brain pH has a significant impact on human postmortem hippocampal gene expression profiles*. Brain Res 2006;1106:1-11.
- Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, et al. *Neuronal subtype specification in the cerebral cortex*. Nat Reviews Neurosci 2007;8:427-37.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, et al. *Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq*. Nat Methods 2008;5:621-8.
- Mudge J, Miller NA, Khrebtukova I, et al. *Genomic convergence analysis of schizophrenia: mRNA sequencing reveals altered synaptic vesicular transport in postmortem cerebellum*. PLoS One 2008;3:e3625.
- Muers M. *Human diseases: edge, notes and networks*. Nat Rev Genet 2010;11:4-5.
- Muntoni F, Cross JH. *Paediatric neurology: from molecular mechanisms to targeted treatments*. Lancet Neurol 2015;14:16-8.
- Mussche S, De Paepe B, Smet J, et al. *Proteomic analysis in giant axonal neuropathy: new insights into disease mechanisms*. Muscle Nerve 2012;46:246-56.
- Myers AJ, Gibbs JR, Webster JA, et al. *A survey of genetic human cortical gene expression*. Nat Genet 2007;39:1494-9.
- Nadeau JH. *Modifier genes in mice and humans*. Nat Rev Genet 2001;2:165-74.
- Nadler JJ, Zou F, Huang H, et al. *Large-scale gene expression differences across brain regions and inbred strains correlate with a behavioral phenotype*. Genetics 2006;174:1229-336.
- Nagyman N, Grimmer I, Scholz T, et al. *Predictive value of brain-specific proteins in serum for neurodevelopmental outcome after birth asphyxia*. Pediatr Res 2003;54:270-5.
- Naumova OY, Lee M, Rychkov SY, et al. *Gene expression in the human brain: the current state of the study of specificity and spatiotemporal dynamics*. Child Dev 2013;84:76-88.
- Ota M, Yasuno F, Ito H, et al. *Age-related decline of dopamine synthesis in the living human brain measured by positron emission tomography with L-[β-11 C] DOPA*. Life Sci 2006;79:730-6.

- Pan Q, Shai O, Lee LJ, et al. *Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing*. Nat Genet 2008;40:1413-15.
- Pastore A, Petrillo S, Tozzi G, et al. *Glutathione: a redox signature in monitoring EPI-743 therapy in children with mitochondrial encephalomyopathies*. Mol Genet Metab 2013;109:208-14.
- Pedotti P, t Hoen PA, Vreugdenhil E, et al. *Can subtle changes in gene expression be consistently detected with different microarray platforms?* BMC Genomics 2008;9:124.
- Peters A, Sethares C, Luebke JI. *Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex*. Neuroscience 2008;152:970-81.
- Petricoin E, Zoon K, Kohn E, et al. *Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality*. Nat Rev 2002;1:683-95.
- Ponjavic J, Oliver PL, Lunter G, et al. *Genomic and transcriptional co-localization of protein coding and long non-coding RNA pairs in the developing brain*. PLoS Genetics 2009;5:e1000617.
- Rajagopal MU, Hathout Y, MacDonald TJ, et al. *Proteomic profiling of cerebrospinal fluid identifies prostaglandin D2 synthase as a putative biomarker for pediatric medulloblastoma: A pediatric brain tumor consortium study*. Proteomics 2011;11:935-43.
- Ramskold D, Wang ET, Burge CB, et al. *An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data*. PLoS Comput Biol 2009;5:e1000598.
- Rando OJ. *Daddy issues: paternal effects on phenotypes*. Cell 2012;151:702-8.
- Rifai N, Gillette MA, Carr SA. *Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility*. Nat Biotechnol 2006;24:971-83.
- Rithidech KN, Honikel L, Milazzo M, et al. *Protein expression profiles in pediatric multiple sclerosis: potential biomarkers*. Mult Scler 2009;15:455-64.
- Roth RB, Hevezi P, Lee J, et al. *Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS*. Neurogenetics 2006;7:67-80.
- Rouillon J, Zocovic A, Leger T, et al. *Proteomics profiling of urine reveals specific titin fragments as biomarkers of Duchenne muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord 2014;24:563-73.
- Ruiz Esparza-Garrido R, Velázquez-Flores MÁ, Diegopérez-Ramírez J, et al. *A proteomic approach of pediatric astrocytomas: MiRNAs and network insight*. J Proteomics 2013; 94:162-75.
- Salthouse TA. *When does age-related cognitive decline begin?* Neurobiol Aging 2009;30:507-14.
- Samocha KE, Robinson EB, Sanders SJ, et al. *A framework for the interpretation of de novo mutation in human disease*. Nat Genet 2014;46:944-50.
- Samuel N, Remke M, Rutka JT, et al. *Proteomic analyses of CSF aimed at biomarker development for pediatric brain tumors*. J Neurooncol 2014;118:225-38.
- Saratsis AM, Yadavilli S, Magge S, et al. *Insights into pediatric diffuse intrinsic pontine glioma through protomi analysis of cerebrospinal fluid*. Neuro Oncol 2012;14:547-60.
- Schonrock N, Ke YD, Humphreys D, et al. *Neuronal microRNA deregulation in response to Alzheimer's disease amyloid-beta*. PLoS One 2010;5:e11070.
- Somel M, Franz H, Yan Z, et al. *Transcriptional neoteny in the human brain*. Proc Natl Acad Sci 2009;106:5743-57.
- Somel M, Guo S, Fu N, et al. *MicroRNA, mRNA, and protein expression link development and aging in human and macaque brain*. Genome Res 2010;20:1207-18.
- Somel M, Khaitovich P, Bahn S, et al. *Gene expression becomes heterogeneous with age*. Curr Biol 2006;16:R359-R360.
- Sowell ER, Thompson PM, Toga AW. *Mapping changes in the human cortex throughout the span of life*. Neuroscientist 2004;10:372-92.
- St Laurent G, Faghihi MA, Wahlestedt C. *Non-coding RNA transcripts: sensors of neuronal stress, modulators of synaptic plasticity, and agents of change in the onset of Alzheimer's disease*. Neurosci Lett 2009;466:81-8.
- Strand AD, Aragaki AK, Baquet ZC, et al. *Conservation of regional gene expression in mouse and human brain*. PLoS Genet 2007;3:e59.
- Sun T, Patoine C, Abu-Khalil A, et al. *Early asymmetry of gene transcription in embryonic human left and right cerebral cortex*. Science 2005;308:1794-8.
- Tekgul H, Yazal M, Kutukculer N, et al. *Value of biochemical markers for outcome in term infants with asphyxia*. Pediatr Neurol 2004;31:326-32.
- t Hoen PA, Ariyurek Y, Thygesen HH, et al. *Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms*. Nucleic Acids Res. 2008;36:e141.
- Theodorescu D, Mischak H. *Mass spectrometry based proteomics in urine biomarker discovery*. World J Urol 2007;25:435-43.
- Urbanczyk-Wochniak E, Luedemann A, Kopka J, et al. *Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology*. EMBO Rep 2003;4:989-93.
- Van der Brug M, Nalls MA, Cookson MR. *Deep sequencing of coding and non-coding RNA in the CNS*. Brain Res 2010;1338:146-54.
- Van Cappellen van Walsum AM, Jongsma HW, Wevers RA, et al. *Hypoxia in fetal lambs: a study with (1)H-MNR spectroscopy of cerebrospinal fluid*. Pediatr Res 2001;49:698-704.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, et al. *Serial analysis of gene expression*. Science 1995; 270:484-7.
- Villoslada P, Steinman L, Baranzini SE. *Systems Biology and Its Application to the Understanding of Neurological Diseases*. Ann Neurol 2009;65:124-39
- ** Articolo di revisione critica sulla biologia dei sistemi applicata alle neuroscienze: molto interessante per la descrizione dettagliata ed erudita dei principi generali e della terminologia impiegata nelle scienze omiche, e nello studio delle reti e dei sistemi complessi.
- Vlahou A, Fountoulakis M. *Proteomic approaches in the search for disease biomarkers*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2005;814:11-9.
- Walsh BH, Broadhurst DI, Mandal R, et al. *The metabolomic profile of umbilical cord blood in neonatal hypoxic ischaemic encephalopathy*. PLoS One 2012;7:e50520.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. *Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes*. Nature 2008;456:470-6.
- Wang J, Wang J, Zhang Y, et al. *Proteomic analysis on infantile spasm and prenatal stress*. Epilepsy Res 2014;108:1174-83.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nat Review Genet 2009;10:57-63.
- Watters JW, McLeod HL. *Cancer pharmacogenomics: current and future applications*. Biochim Biophys Acta 2003;1603:99-111.
- Wei C, Li Y, Yao H, et al. *A metabolomics study of epilepsy in patients using gas chromatography coupled with mass spectrometry*. Mol Biosyst 2012;8:2197-204.
- Westerhoff HV, Palsson BO. *The evolution of molecular biology into systems biology*. Nat Biotechnol 2004;22:1249-52.
- Whitin JC, Jang T, Merchant M, et al. *Alterations in cerebrospinal fluid proteins in a presymptomatic primary glioma model*. PLoS One 2012;7:e49724.
- Whitmer JT, Idell-Wenger JA, Rovetto MJ, et al. *Control of fatty acid metabolism in ischemic and hypoxic hearts*. J Biol Chem 1978;253:4305-9.
- Wikoff W, Gangoiti J, Barshop B, et al. *Metabolomics identifies perturbations in human disorders of propionate metabolism*. Clin Chem 2007;53:2169-76.
- Wong DF, Wagner HN Jr, Dannals RF, et al. *Effects of age on dopamine and serotonin receptors measured by positron tomography in the living human brain*. Science 1984;226:1393-6.
- Xu AG, He L, Li Z, et al. *Intergenic and repeat transcription in human, chimpanzee and macaque brains measured by RNA-Seq*. PLoS Comp Biol 2010;6:e1000843.
- Ziats MN, Rennert OM. *Expression profiling of autism candidate genes during Human brain development implicates central immune signaling pathways*. PLoS One 2011;6:e24691.

Corrispondenza

Martino Ruggieri, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Pediatria, A.O.U. "Policlinico - Vittorio Emanuele", Presidio "G. Rodolico", via S. Sofia 78, 95124 Catania - E-mail: m.ruggieri@unict.it