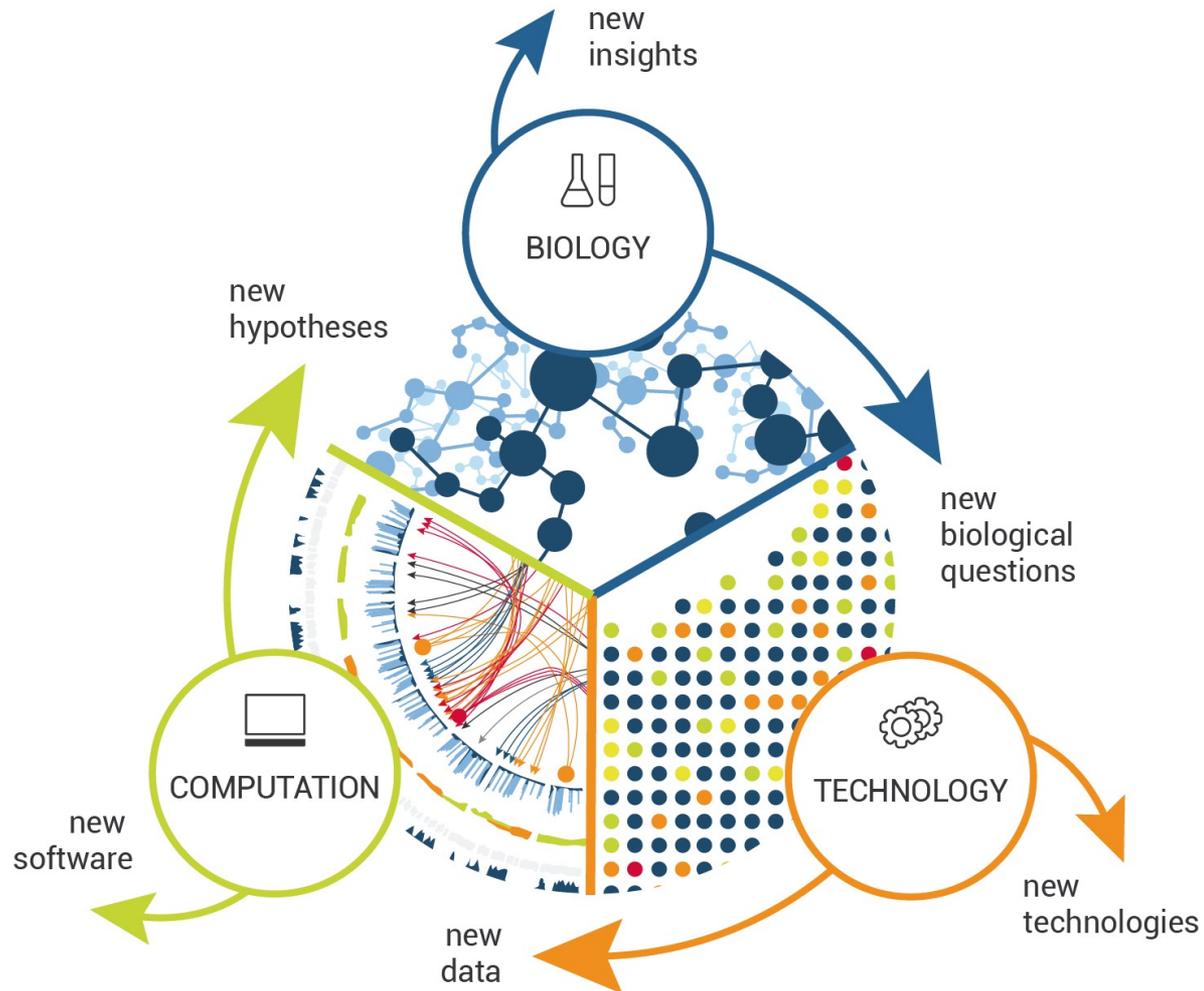


# La Biologia dei Sistemi

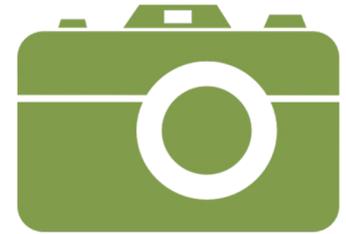


# *La biologia dei sistemi* obiettivi

1) Descrivere contemporaneamente tutte le componenti costituenti il sistema in un dato istante



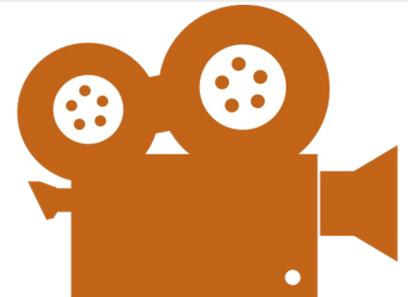
Immagine statica



2) Descrivere i cambiamenti nel tempo del sistema (ad es. risposta a stimoli esterni)



Immagine dinamica



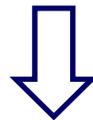
# Lo studio dei sistemi biologici

## Approccio riduzionistico (bottom-up):

Studio delle singole componenti costituenti il sistema biologico: gene – mRNA – proteina – metabolita

## Approccio sistemico (top-down):

Contemporanea caratterizzazione di tutte le componenti costituenti il sistema: geni (genoma) – mRNA (trascrittoma) – proteine (proteoma) – metaboliti (metaboloma)



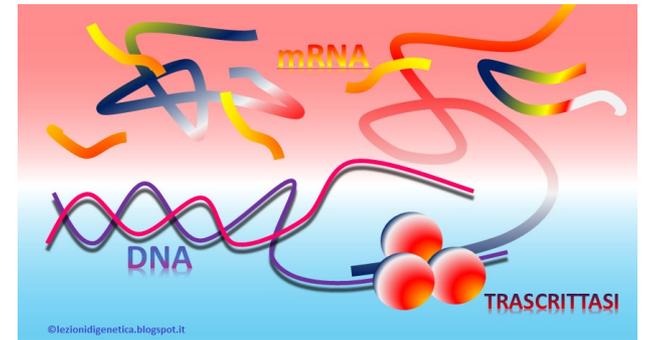
## Esplosione delle OMICHE:

**genomica** – **trascrittomica** – **proteomica** – **metabolomica**

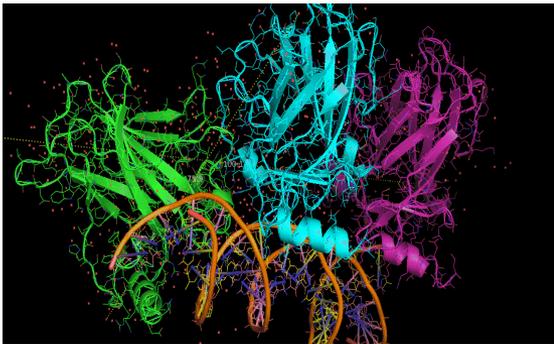
# Scienze omiche



**Genomica**



**Trascrittomica**



**Proteomica**



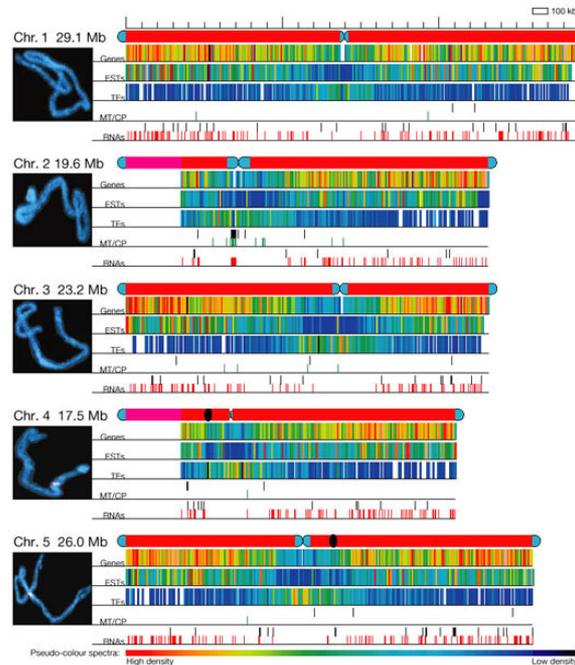
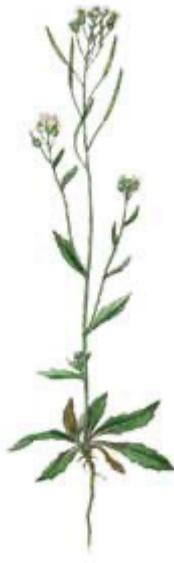
**Metabolomica**

# Tra le scienze omiche, la genomica è quella che ha avuto un maggior sviluppo

Obiettivo

Caratterizzazione di tutti i geni presenti in un organismo vivente

Sequenza dell'intero genoma



# GENOMICA



## strutturale

Determinare la sequenza nucleotidica di un genoma (architettura, organizzazione e complessità)

## funzionale

Assegnare ai geni una funzione biologica

### Perché assemblare il genoma delle piante è laborioso?

1. Dimensioni e complessità del genoma: eventi di duplicazione genica, ploidia
2. Elementi trasponibili e sequenze ripetute
3. Eterozigosità: molti loci presentano alleli diversi sui cromosomi omologhi corrispondenti
4. Poliploidia: la presenza di più di due copie di cromosomi nel nucleo
5. Contenuto genico e famiglie geniche
6. Contaminazioni del DNA per la presenza del contributo degli organelli
7. Errori di sequenziamento

# Lo studio dell'espressione genica



Il gene si esprime?

Identificazione mRNA



Quanto si esprime?

Quantificazione mRNA

Quando/dove si esprime?

Analisi dell'espressione differenziale

# L'avvento della trascrittomica

Negli ultimi 15 anni sono stati sviluppati diversi approcci per l'analisi dei profili di espressione:

Analisi focalizzate su uno o pochi geni

Analisi condotte in parallelo su decine di migliaia di geni

Trascrittomica

Studio del trascrittoma

Insieme dei trascritti (mRNA)

Fornire una **visione globale** (non individuale!) della espressione genica, quindi dell'attività dei geni

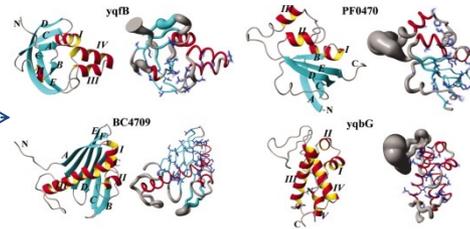
# Proteoma = Proteine codificate dal genoma

Set completo di proteine presenti in un sistema biologico in un dato momento e in determinate condizioni

rappresentazione funzionale del genoma



Trascrizione  
Traduzione



Il proteoma è **dinamico**: modificazioni nello spazio (cellule, tessuti, organi) e nel tempo (crescita, sviluppo, risposte a stimoli esterni)

La dimensione del proteoma è maggiore rispetto a quella del genoma

**Splicing alternativo**

Diversi mRNA maturi da ciascun gene

**Modificazioni post-traduzionali**

Diverse proteine mature da ogni proteina neosintetizzata

# Obiettivo della proteomica

Analizzare l'intero proteoma di un sistema biologico

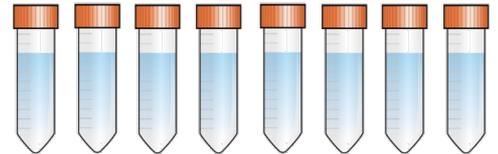
Problemi

Non esistono protocolli per l'estrazione del proteoma



le proteine sono molto eterogenee (diversa acidità, solubilità, massa molecolare, etc.)

Non esistono metodi per l'amplificazione del proteoma



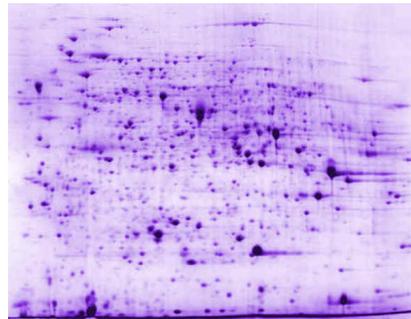
le proteine presenti a concentrazioni inferiori alla soglia di sensibilità degli strumenti analitici, non possono essere rilevate.

# Principali fasi dell'analisi proteomica

Estrazione

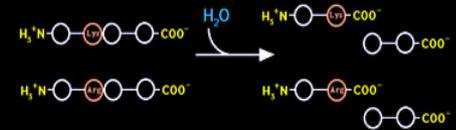


Separazione

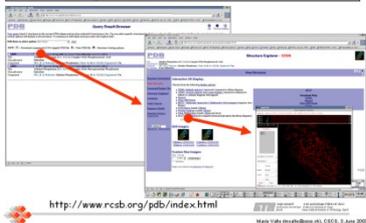


Digestione

*Trypsine*



Example: Protein Data Bank



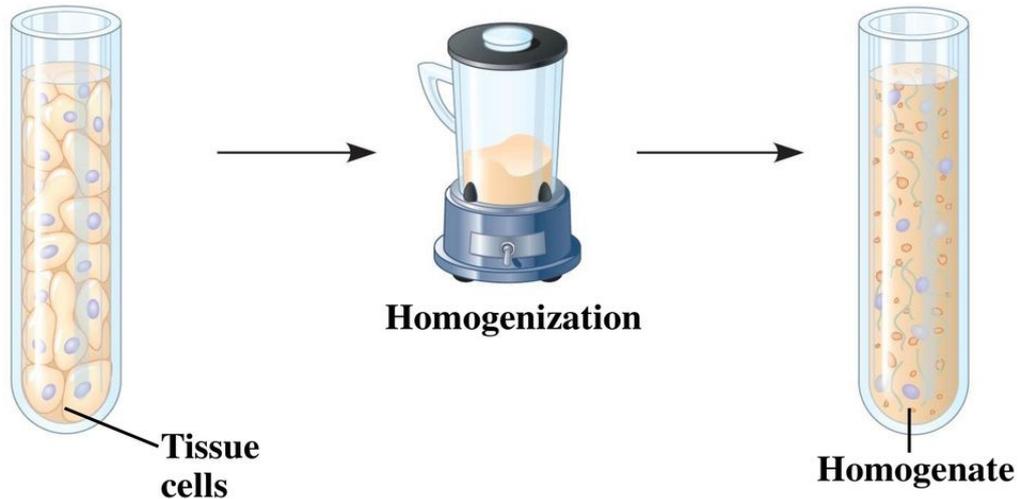
Identificazione  
proteina

Analisi peptidi  
MALDI-TOF MS

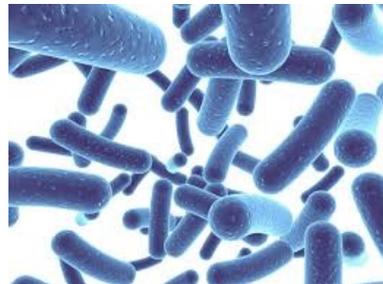
# 1. Estrazione delle proteine

La fase di omogenizzazione delle proteine implica necessariamente la **distruzione cellulare** che può essere **meccanica**, **chimica** ed **enzimatica**.

La scelta del metodo dipende dalla natura della parete/membrana cellulare.



Mammalian cells



Bacterial cells



Yeast cells



Plant cells

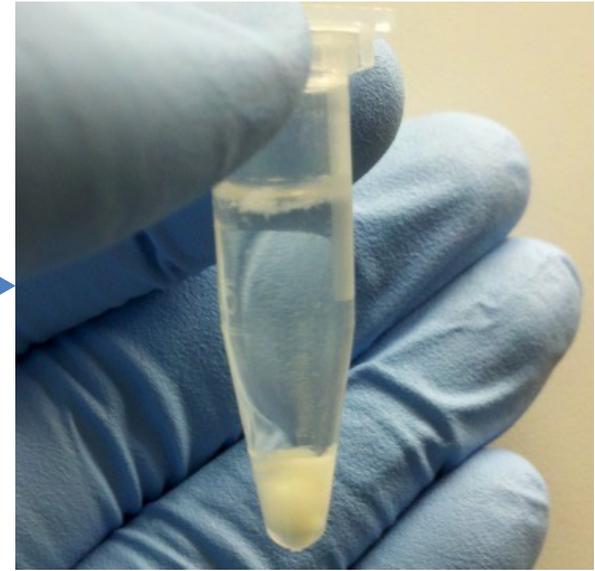
# 1. Estrazione delle proteine

## Tamponi di lisi

Quali sono i componenti del buffer di lisi ideale?

- **Caotropo:** urea e tiourea (rottura dei legami idrofobici e idrogeno senza alterare la carica della proteina)
- **Riducente:** ditiotreitolo (DTT) (denatura le proteine mediante la rottura dei legami disolfuro)
- **Detergente:** CHAPS, triton x-100 (solubilizzano i lipidi)
- **Anfoliti** (migliora la solubilità delle proteine, facilita la precipitazione degli acidi nucleici)
- **Inibitori delle proteasi**

# 1. Estrazione delle proteine



Diversi metodi di estrazione



Diverse frazioni proteiche

Basso rapporto biomassa/proteine



Bassa resa

Sostanze interferenti



Fenoli, tannini, zuccheri...

# 1. Estrazione delle proteine

## Metodi meccanici

- **Omogenizzatori** Waring-Blender o Polytron



- **Mortaio** con pestello di ceramica



- **French Press**: sfrutta differenze di pressione



- **Dounce e Potter-Elvehjem**: distruggono le cellule forzandone il passaggio attraverso il ristretto spazio tra pestello e parete.



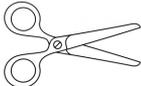
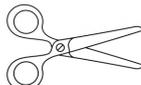
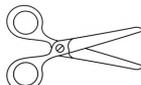
- **Sonicatori**: bagni o sonde ad immersione che generano ultrasuoni



# 1. Estrazione delle proteine

## Metodi enzimatici e chimico-fisici

**Metodi enzimatici.** Le pareti cellulari possono essere degradate utilizzando enzimi specifici:

- lisozima  peptidoglicano →→→ batteri
- zimoliasi e liticasi  beta-glucani →→→ lieviti
- chitinasi  chitina →→→ funghi filamentosi

**Shock osmotico.** L'utilizzo di una soluzione ipotonica determina la rottura delle membrane cellulari a causa della penetrazione del solvente nelle cellule. Il metodo può essere impiegato per le cellule non dotate di parete.

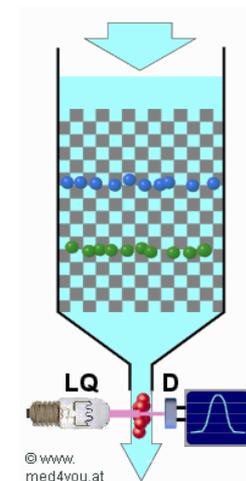
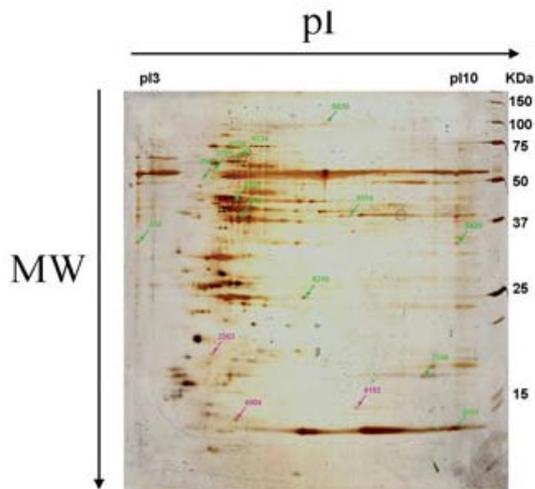
## 2. Separazione delle proteine

Basati su GEL

Elettroforesi bidimensionale  
(2DE)

Non basati su GEL

Cromatografia liquida  
(LC)



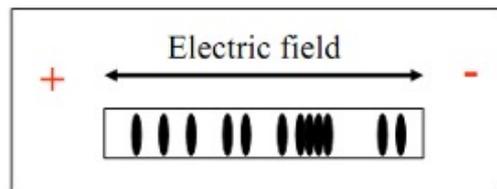
## 2. Separazione delle proteine: elettroforesi bidimensionale (2DE)

È la tecnica più utilizzata per separare le proteine solubili e di membrana

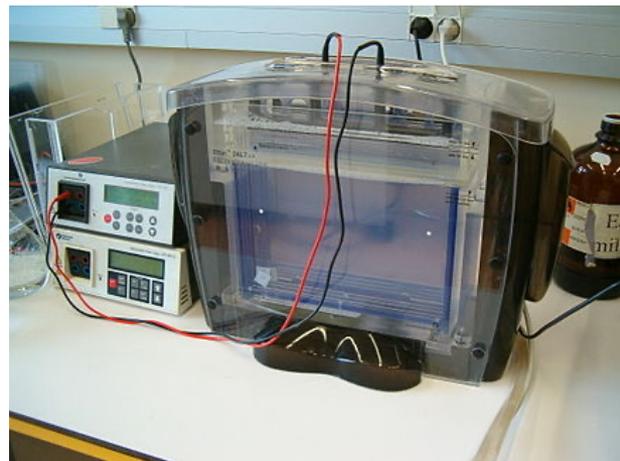
**1D: *isoelectric focusing***  
Separazione per CARICA

Condizioni  
denaturanti

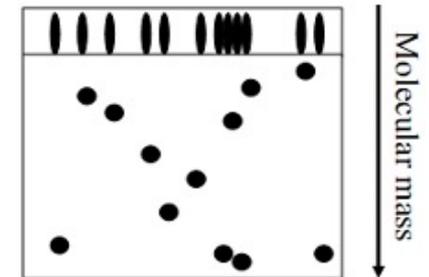
**2D: *SDS page***  
Separazione per MASSA



1st dimension



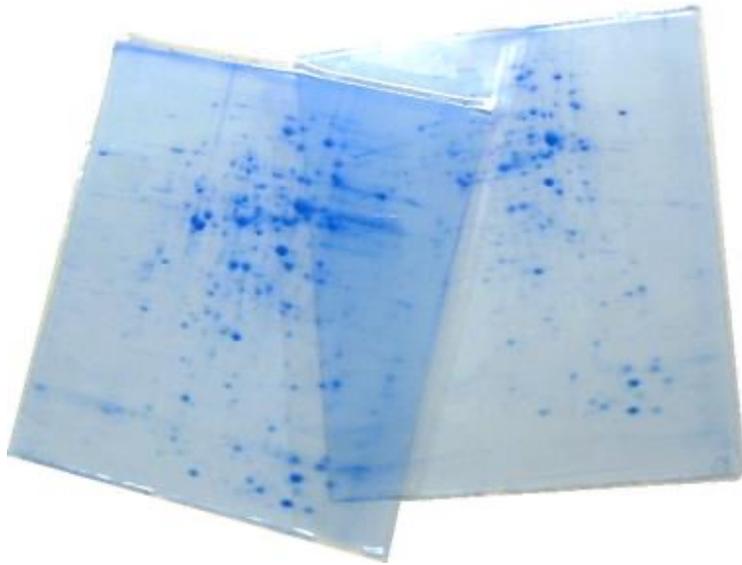
SDS (sodio dodecilfosfato)



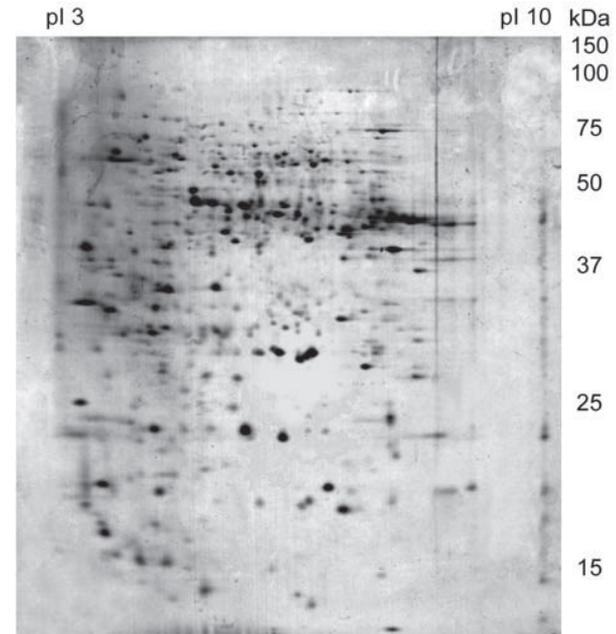
2nd dimension

## 2. Separazione delle proteine: elettroforesi bidimensionale (2DE)

**Colorazione** → visualizzazione degli spot



Blu di Comassie



Nitrato di argento

**Purificazione** → escisione spot - estrazione

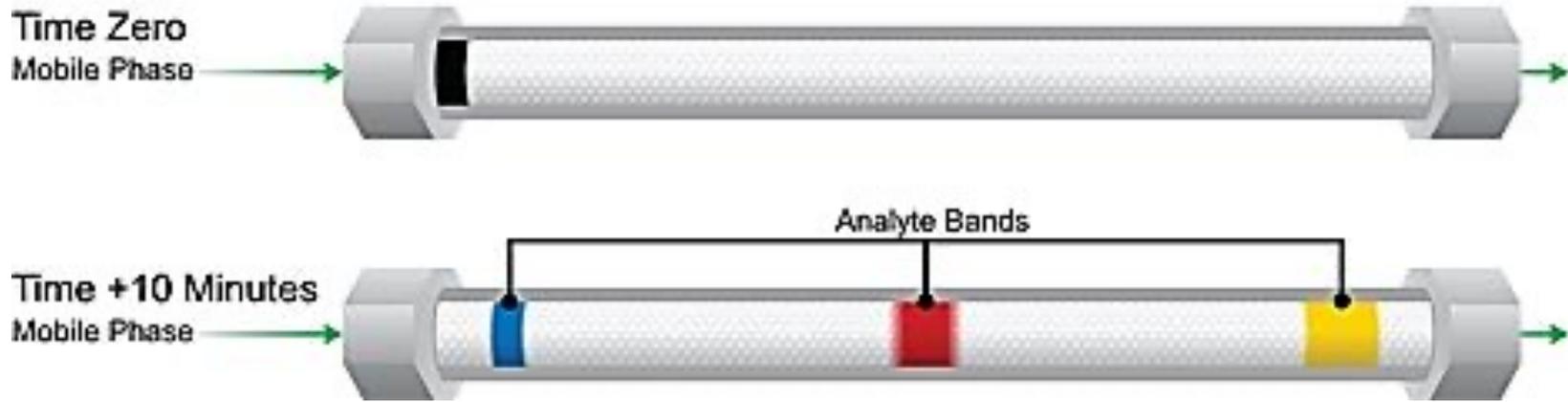
## 2. Separazione delle proteine:

### Limiti della 2DE

- La tecnica non può essere automatizzata e il controllo delle variabili tecniche dipende dalle capacità del ricercatore
- Dimensione delle proteine e estremi pI
- Difficoltà nell'analisi di proteine estremamente basiche (idrolisi dell'acrilamide a pH >10)
- Proteine di alto peso molecolare possono difficilmente essere trasferite dalla prima alla seconda dimensione

## 2. Separazione delle proteine:

### Cromatografia liquida ad alta prestazione



**Fase mobile:** eluente che attraversa la colonna, in cui è disciolto l'analita

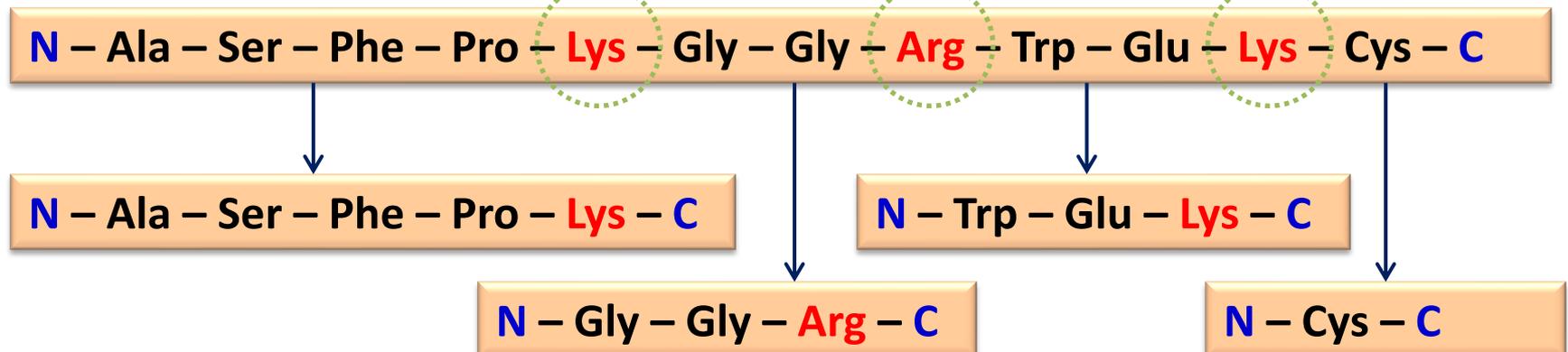
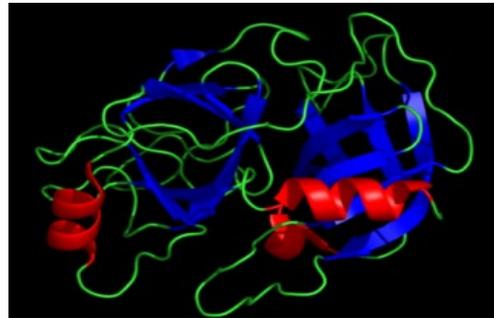
**Fase stazionaria:** materiale solido poroso all'interno della colonna

**Separazione:** in base all'affinità dell'analita per la fase stazionaria e per la fase mobile

# 3. Frammentazione delle proteine:

## Digestione con proteasi

La più utilizzata è la TRIPSINA

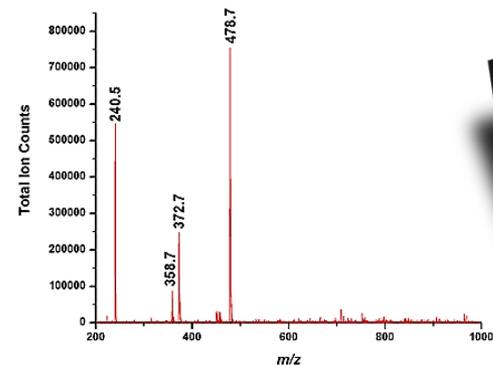
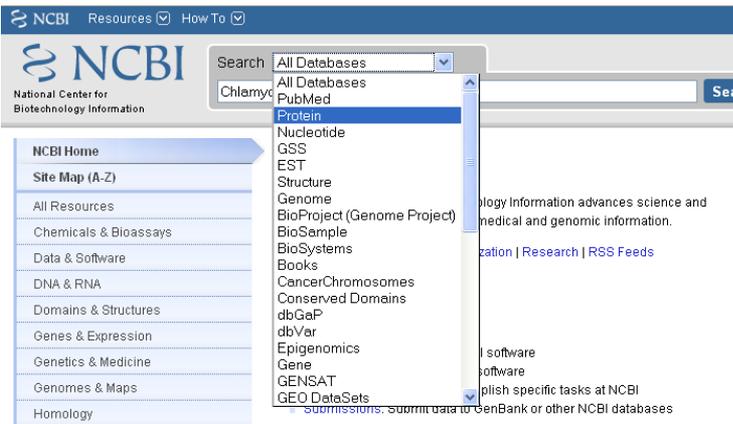
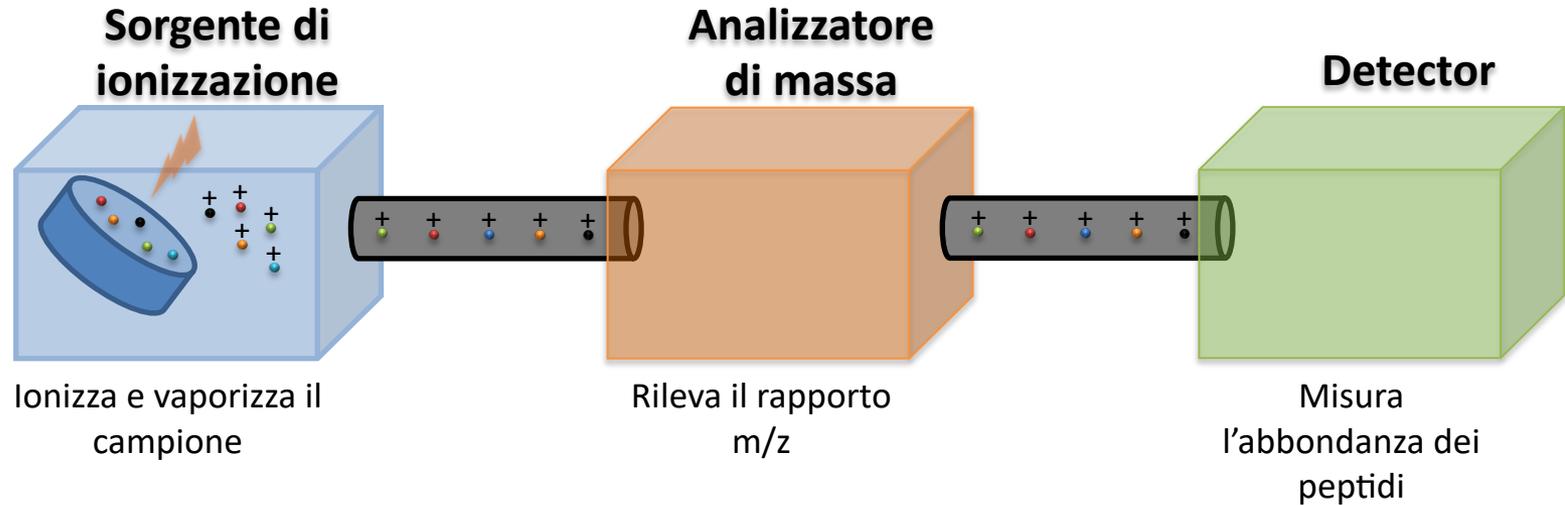


## 4. Analisi delle proteine:

# Spettrometro di massa

- Uno spettrometro di massa è uno strumento utilizzato per misurare la massa di una molecola dopo che essa è stata ionizzata, ossia alla quale è stata impartita una carica elettrica.
- Uno spettrometro di massa non misura direttamente la massa molecolare, ma il rapporto massa/carica degli ioni che si formano dalla molecola in esame.

# 4. Analisi delle proteine: Spettrometro di massa



# Spettrometro di massa

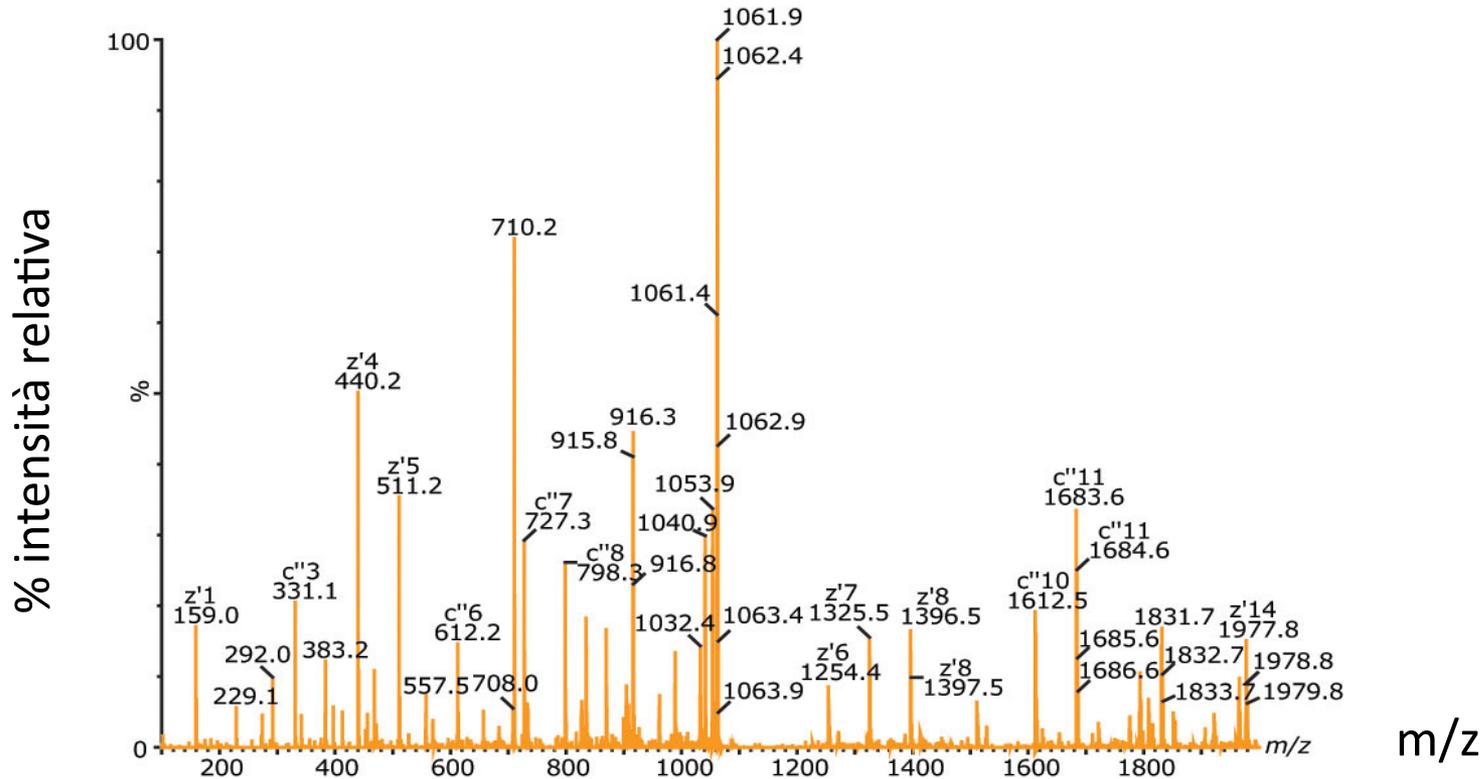
Un tipico spettrometro contiene:

- una **fonte di ionizzazione o sorgente**: viene applicata un'energia di ionizzazione (fascio di elettroni a energia nota) che vaporizza il campione e trasforma le molecole neutre in ioni, positivi o negativi. Ogni molecola in fase gassosa viene ionizzata e diventa uno ione, positivo o negativo.
- un **analizzatore di massa** che misura il rapporto  $m/z$  degli ioni.
- un **detector** che registra il numero di ioni per ciascun valore di  $m/z$ . Il detector trasmette il segnale elettrico (proporzionale al numero di ioni presenti) al **sistema di elaborazione dati** che registra i segnali elettrici in funzione del  $m/z$ .
- Il sistema di elaborazione dati converte i segnali registrati in un diagramma che riporta l'abbondanza di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica, il cosiddetto **spettro di massa**, tipico di ogni composto in quanto direttamente correlato alla sua struttura chimica ed alle condizioni di ionizzazione cui è stato sottoposto.

# 4. Analisi delle proteine:

## Spettro di massa

Gli ioni e la loro intensità relativa permettono di stabilire il peso molecolare e la struttura del composto in esame.



Dato che il processo di ionizzazione provoca la frammentazione della molecola originale, sullo spettro compaiono anche ioni aventi rapporto m/z diverso da quello corrispondente al peso molecolare del campione

## 4. Analisi delle proteine:

In proteomica possono essere utilizzati diversi analizzatori di massa che differiscono nella sensibilità, risoluzione, accuratezza nella determinazione della massa

Per l'identificazione dei metaboliti si impiega principalmente la **CROMATOGRAFIA LIQUIDA (LC)** accoppiata alla **SPETTROMETRIA DI MASSA (MS)**

**MALDI-TOF**

*Matrix-Assisted Laser  
Desorption/ionization*

**ESI-MS**

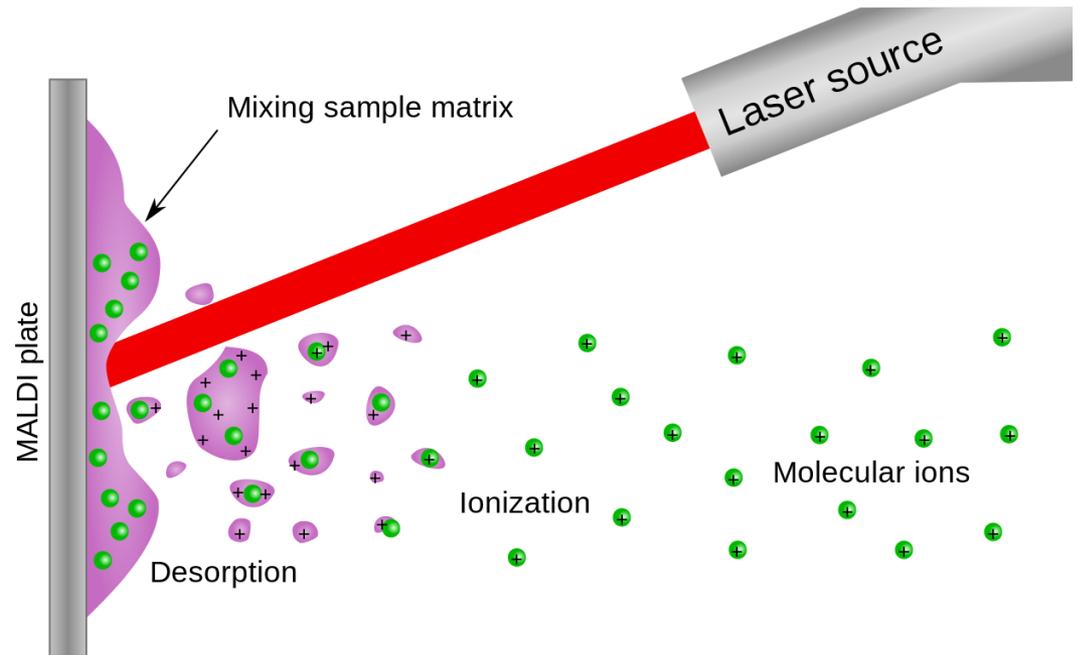
*Electrospray Ionization*

## MALDI

### *Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization*



## MALDI

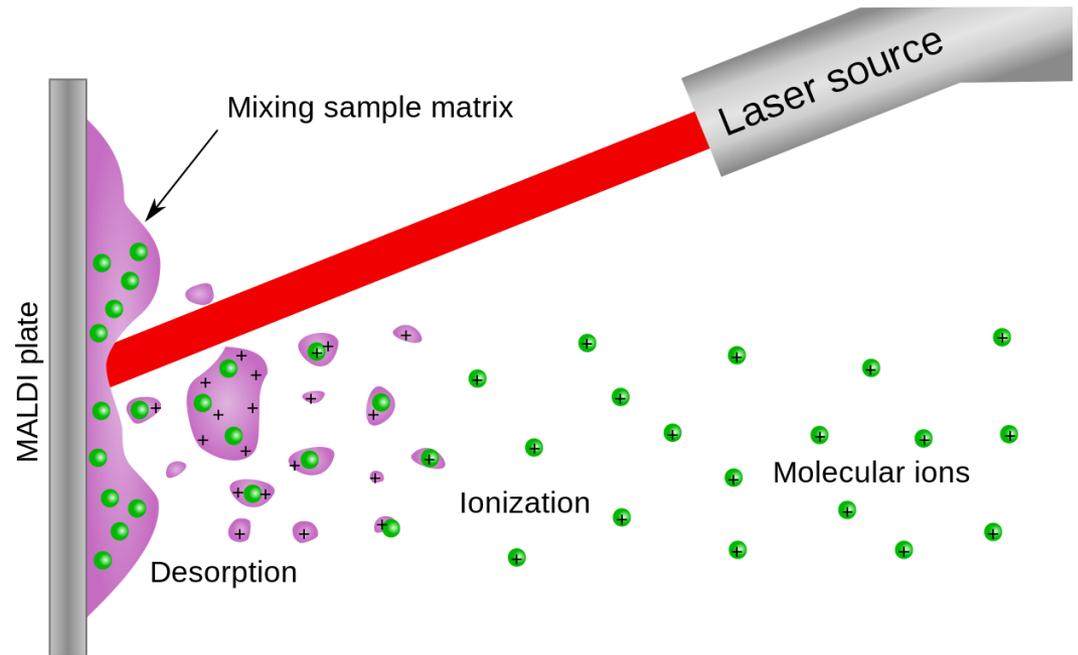


- La miscela di peptidi viene disciolta in una matrice costituita da solventi organici (glicerolo, acido caffeico, acido succinico).
- Una goccia di campione viene posta su un supporto rigido inserito nella sorgente di ionizzazione in cui viene generato il vuoto.
- Il campione viene bombardato da un laser (ad azoto).
- **DESORBIMENTO:** il campione viene rilasciato in forma «clusterizzata», cioè complessato con la matrice.

# MALDI

## MALDI

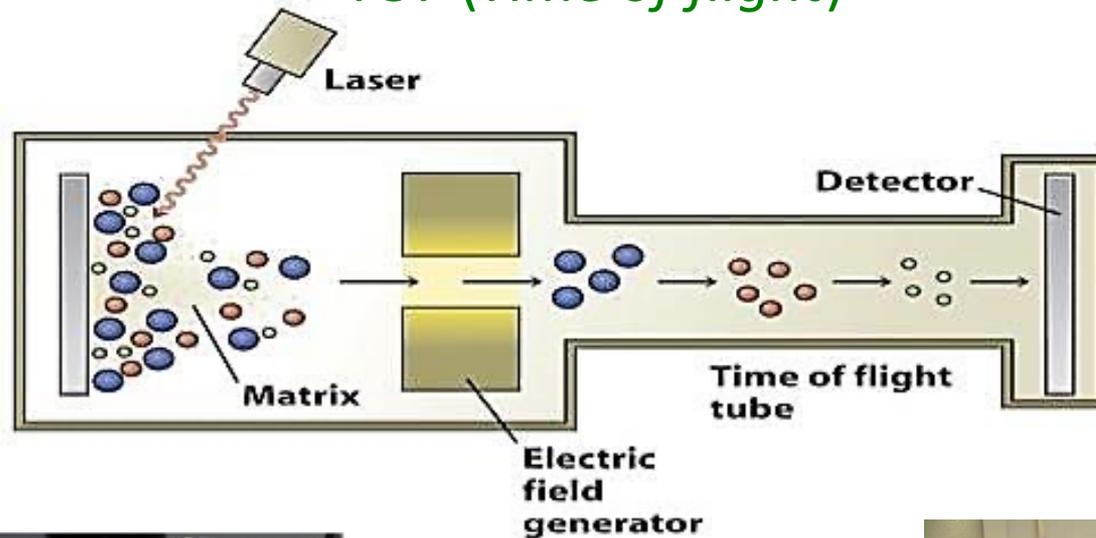
*Matrix-Assisted Laser  
Desorption/ionization*



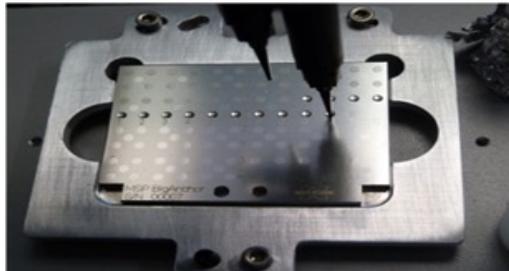
- La matrice attenua gli effetti del fascio laser proteggendo gli analiti che vengono quindi ionizzati e vaporizzati.
- Evaporando, le molecole della matrice si 'portano dietro' anche i peptidi, a cui trasferiscono parte della loro carica elettrica.

# MALDI-TOF

MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*)  
TOF (*Time of flight*)



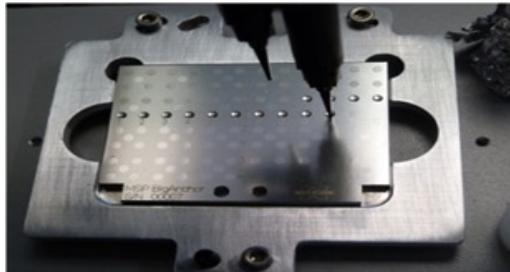
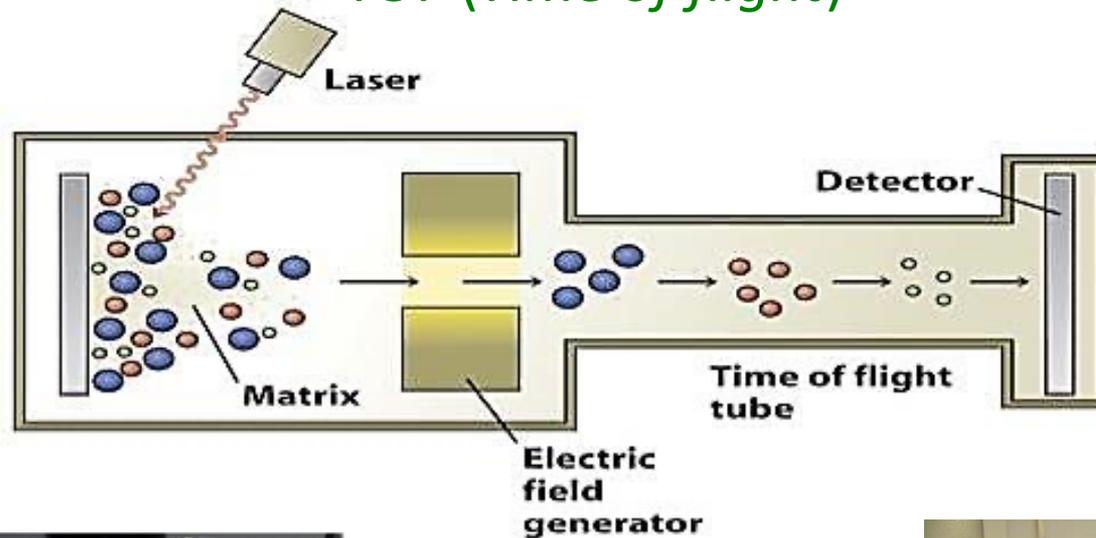
$$E_c = mv^2/2$$



Dopo essere stati vaporizzati/ionizzati, gli ioni sono accelerati all'interno di un tubo cavo da un'energia cinetica costante emessa da un generatore (TOF)

# MALDI-TOF

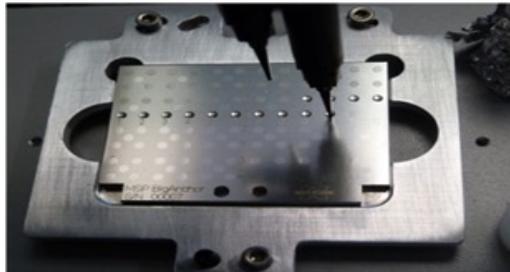
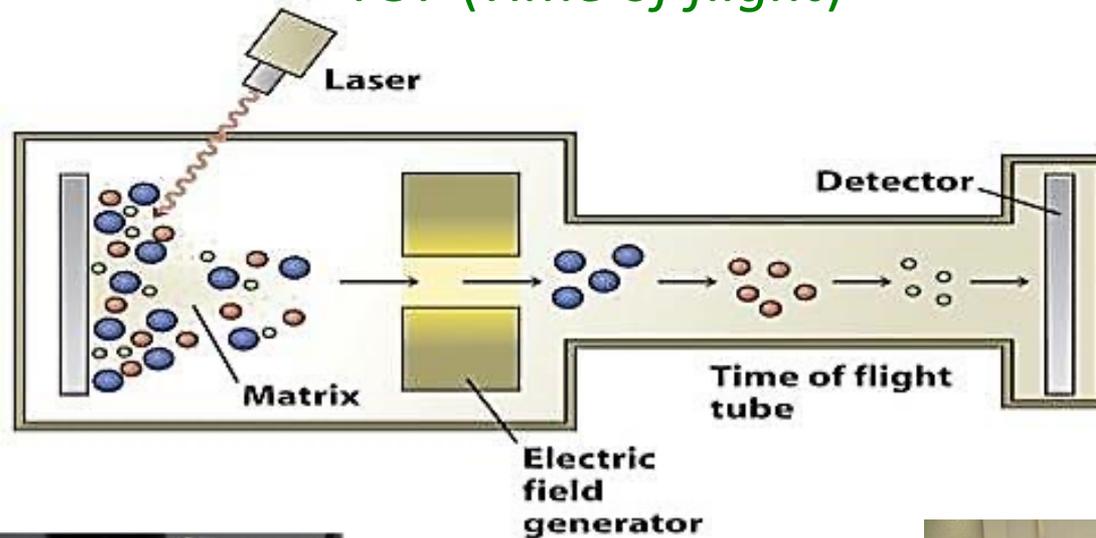
MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*)  
TOF (*Time of flight*)



L'analizzatore TOF distingue gli ioni sulla base del tempo che impiegano a percorrere il tubo e a raggiungere il detector. Dato che  $E_c = mv^2/2$  dove  $m$  è la massa dello ione e  $v$  la sua velocità, minore sarà la massa dello ione, maggiore sarà la sua velocità.

# MALDI-TOF

MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*)  
TOF (*Time of flight*)



Il tempo impiegato per percorrere il tubo di volo viene misurato in microsecondi, e questo tempo viene trasformato nel valore di massa dello ione sulla base della relazione appena descritta.

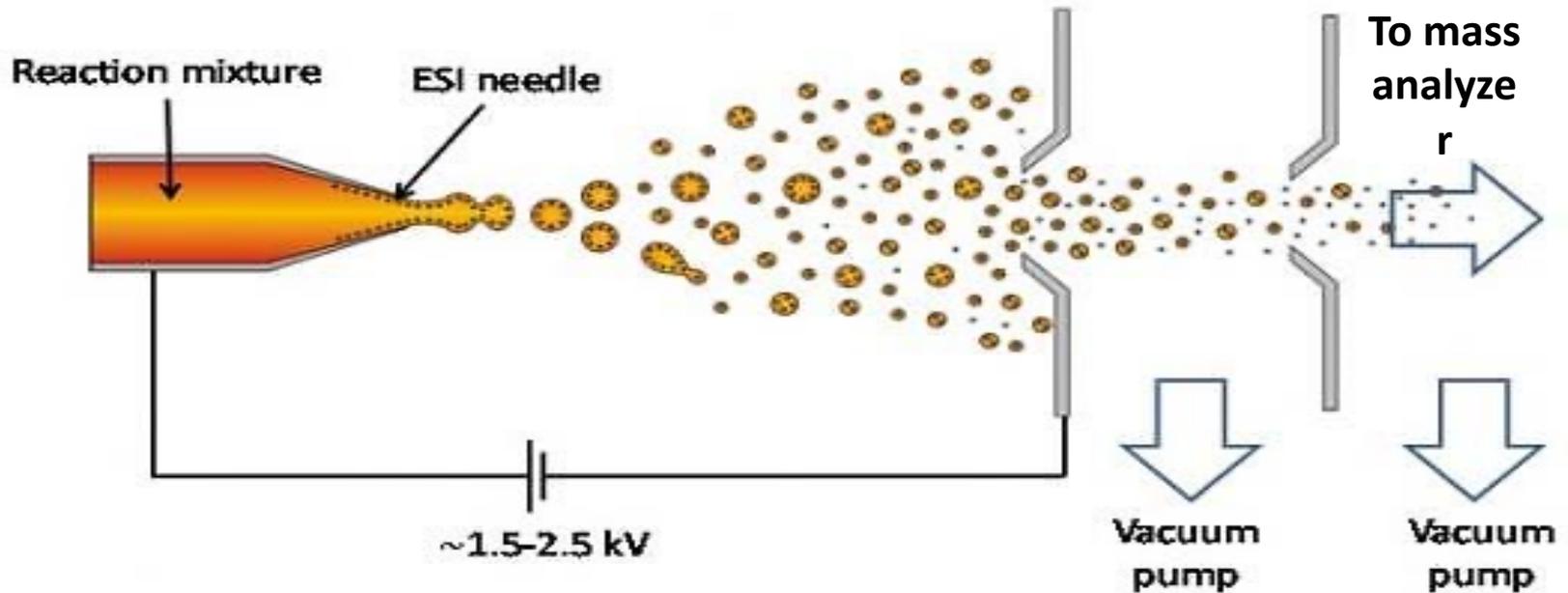
# MALDI-TOF

## Vantaggi

- Pretrattamento del campione molto ridotto o assente
- Possibilità di analizzare numerosi campioni (un target MALDI-TOF può ospitare contemporaneamente sino a 96 campioni)
- Elevata rapidità nell'esecuzione dell'analisi
- Elevata sensibilità (nell'ordine delle picomoli o femtomoli ossia  $10^{-12}$  o  $10^{-15}$  moli).
- La spettrometria di massa MALDI-TOF è in grado di fornire un **fingerprint** per ogni campione analizzato, ossia un profilo di peptidi e proteine/metaboliti del campione, ciascuno identificato da un valore di massa/carica. Il profilo ottenuto è caratteristico del campione e può essere utilizzato alla stregua di un'impronta digitale.

# ESI

*(Electron Spray Ionization)*

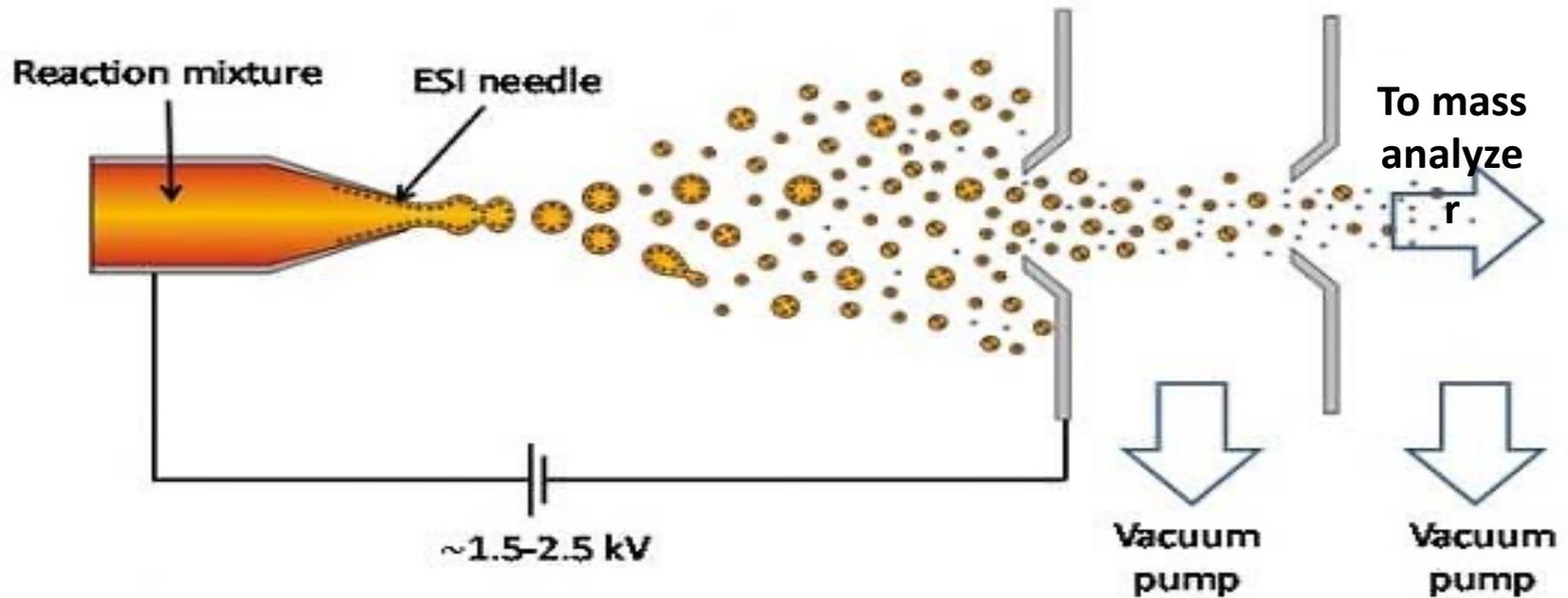


ESI: una sorgente di ionizzazione che utilizza azoto per provocare un processo di nebulizzazione.

Il campione sciolto in un solvente passa in un tubo capillare sottoposto ad un campo elettrico, ottenuto applicando una differenza di potenziale. Il campione è nebulizzato e ionizzato.

# ESI

*(Electron Spray Ionization)*



Gocce contenenti ioni con cariche + e – si staccano dal capillare. Il solvente evapora, le gocce si riducono in dimensione, fino a che la repulsione elettrica, che aumenta a causa della forte densità, supera la tensione superficiale della goccia. A questo punto la goccia scoppia generando una corrente di ioni indirizzati verso l'analizzatore.

# ESI

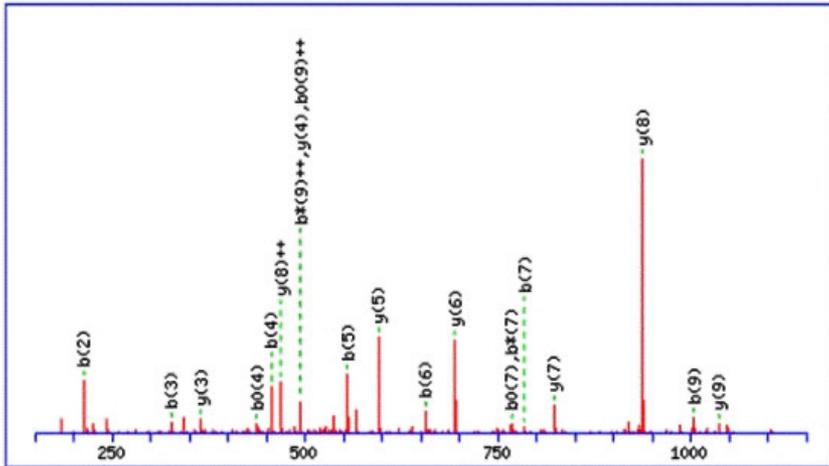
## Vantaggio

- Possibilità di formare ioni multicarica: analizzare biomolecole di grandi dimensioni, fino ad oltre 1.000.000 di Da.

# 5. Identificazione delle proteine:

Confronto tra i dati di massa e banche dati pubbliche

Consente la rapida identificazione di proteine solo se le sequenze *matching* del genoma sono disponibili.



e

# 5. Identificazione delle proteine:

## Banche dati proteiche più utilizzate



Database di Protein **Fingerprints**, cioè pattern caratteristici di certe famiglie proteiche



Database di **domini proteici** generato in modo automatico da Swiss-Prot e TrEMBL



Database di **architetture proteiche** annotate per organismo e per famiglia



Database di **strutture tridimensionali**

# Applicazioni della proteomica

Identificazione delle proteine e studio dell'espressione differenziale: **PROTEOMICA COMPARATIVA**

Identificazione delle interazioni proteina-proteina e dei complessi costituiti da multi-subunità

Analisi delle modificazioni post-traduzionali (fosforilazione, modificazione lipidica, glicosilazione, processamento e proteolisi)

Determinazione della struttura di complessi proteici

# Proteomica quantitativa

Quantificare le proteine → Proteomica funzionale  
Come cambia la concentrazione relativa delle proteine?

**Marcare le proteine prima del trattamento**

**1. Marcatura post-estrazione**

**2. Marcatura *in vivo***

**3. Nessuna marcatura**

# 1. Marcatura post-estrazione

## ICAT

*(Isotope Coded Affinity Tags)*

Vengono marcati i  
residui Cys

## ICPL

*(Isotope Coded Protein Label)*

Vengono marcati  
residui più frequenti

## iTRAQ

*(Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification)*

Vengono marcate le  
estremità N-terminali  
dopo la proteolisi

## <sup>18</sup>O

*(Oxygen Isotope Labelling)*

Vengono marcate le  
estremità C-terminali  
dopo la proteolisi

## 2. Marcatura *in vivo*

### SILAC

*(Stable Isotope Labelling)*

Incorporazione di aminoacidi contenenti isotopi (deuterio,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) in colture cellulari

### SILIP

*(Stable Isotope Labelling in planta)*

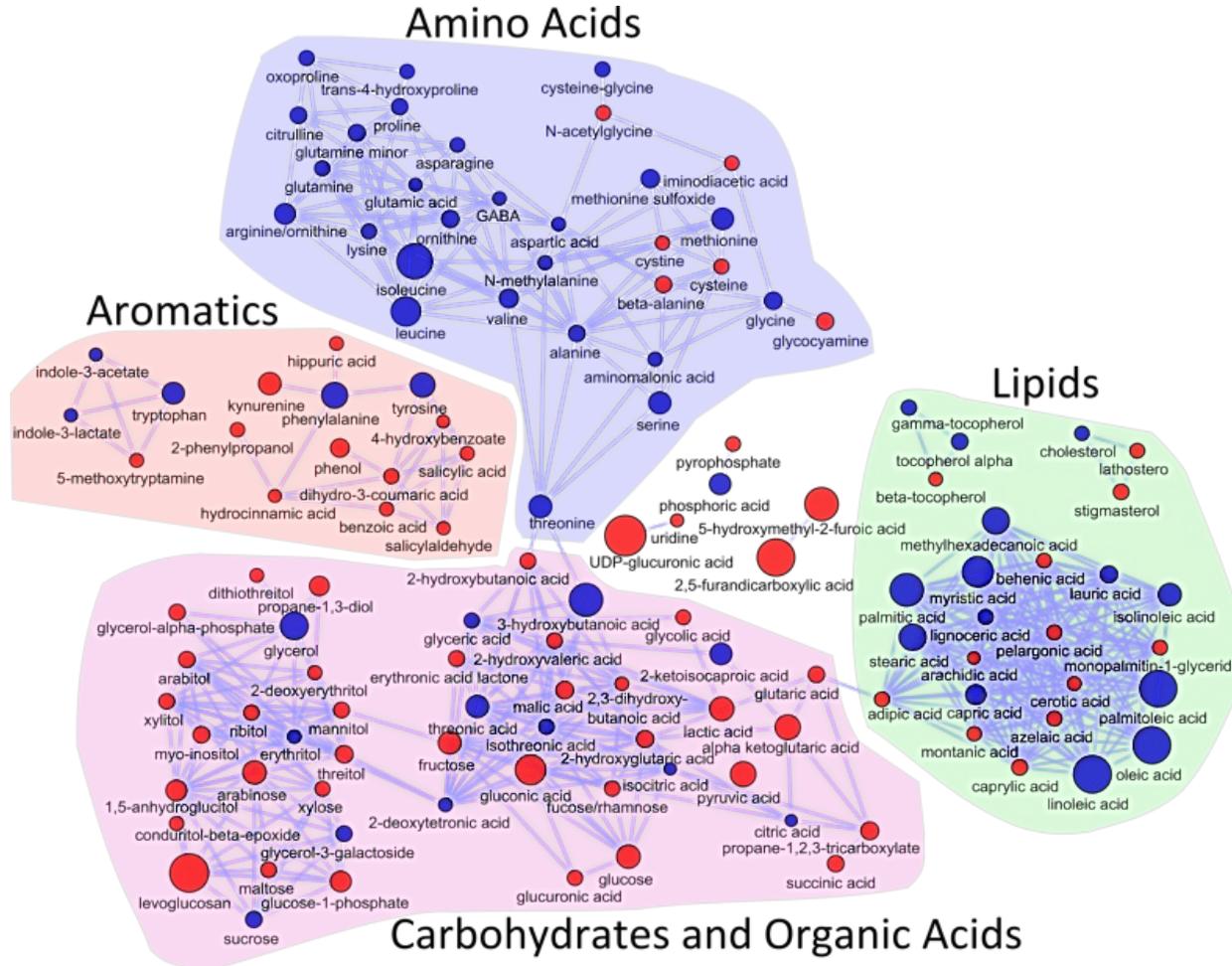
Marcatura di aminoacidi e proteine con  $^{15}\text{N}$  in colture idroponiche

### 3. Nessuna marcatura

1. Misurazione e comparazione delle intensità di segnale degli ioni precursori peptidici di una particolare proteina

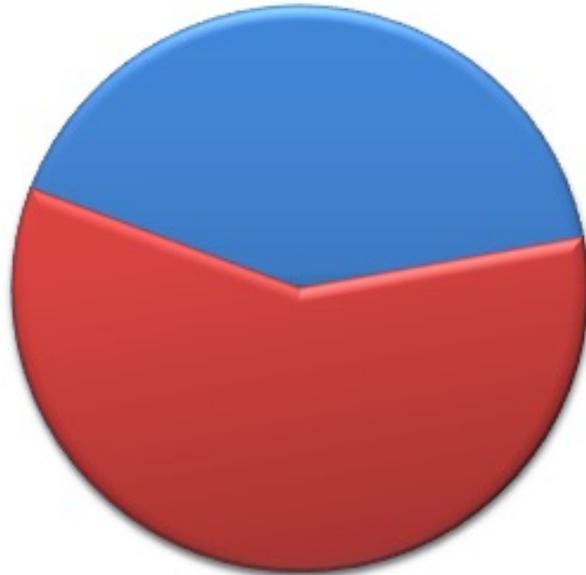
2. Conteggio e comparazione del numero degli spettri dei frammenti identificanti i peptidi di una determinata proteina

# Metabolomica



# Il metaboloma

**Set completo di metaboliti a basso peso molecolare (<1500 Da) presenti in un sistema biologico in un dato momento e in determinate condizioni**



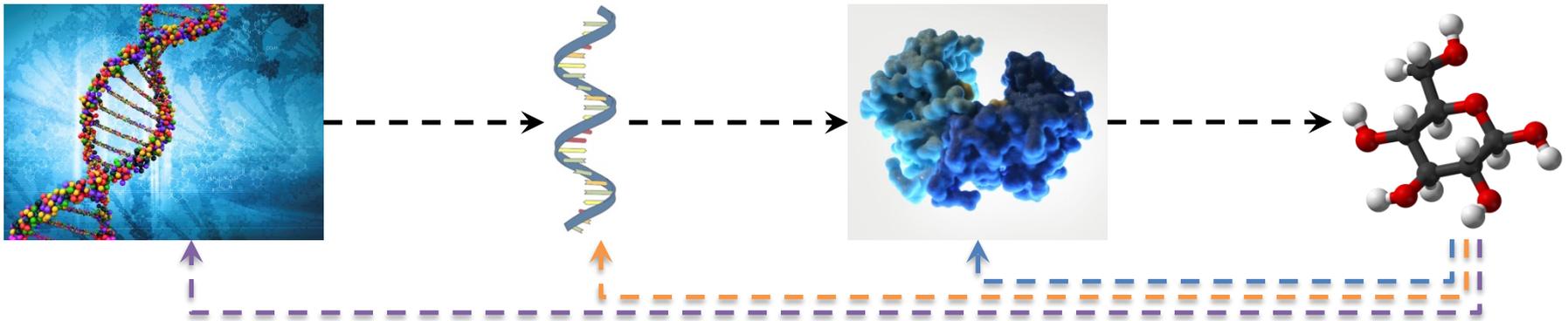
**Non esistono al momento tecniche e tecnologie che consentano di analizzare tutti i metaboliti contemporaneamente**

# Interazioni genoma-metaboloma

Il metaboloma è la manifestazione più fedele dell'ATTIVITÀ DEI GENI



Indagare il metaboloma significa risalire alla FUNZIONE DEI GENI



Meccanismi di retroazione positiva o negativa

Sistema  
integrato

# Lo studio del metabolismo

Analisi  
metabolica

Identificazione e  
quantificazione di **pochi  
metaboliti** scelti a priori

Confermare o confutare  
l'ipotesi iniziale

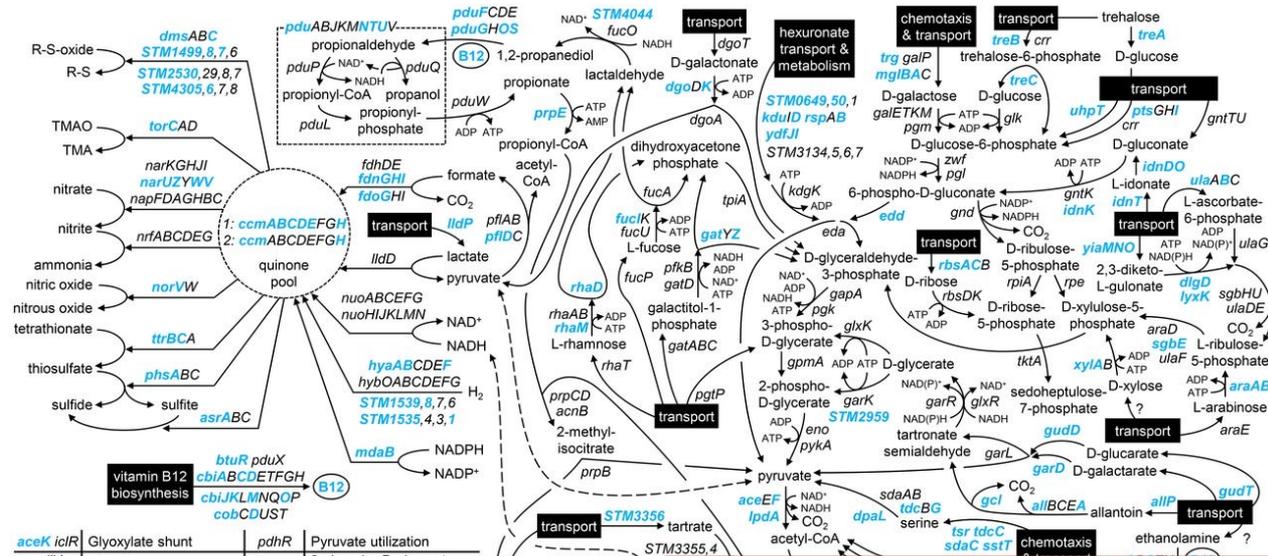
Analisi  
metabolomica

Identificazione e  
quantificazione di **tutti i  
metaboliti**

Determinazione del  
fenotipo metabolico

# Il fenotipo metabolico

## caratterizzazione della rete metabolica



**Identificazione e quantificazione** dei numerosi metaboliti presenti nel sistema

**misura dei flussi metabolici** utilizzando substrati arricchiti con isotopi

# La metabolomica fornisce un'immagine della **funzione reale dei geni**

Trascrittomica  
Proteomica

Funzione  
potenziale

Quali reazioni metaboliche **potrebbero essere** attivate o disattivate dai geni?

Metabolomica

Funzione  
reale

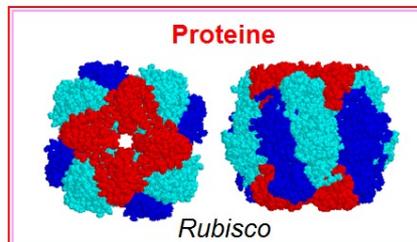
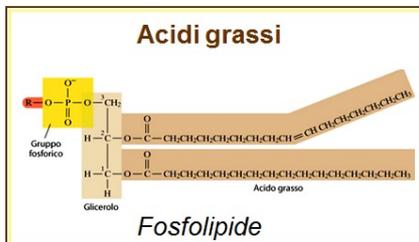
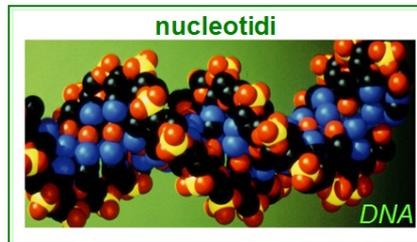
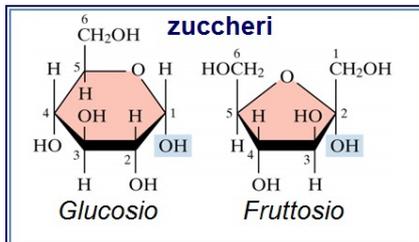
Quali reazioni metaboliche **sono effettivamente** attive nel sistema studiato?

# Il metaboloma vegetale

vasto e diversificato

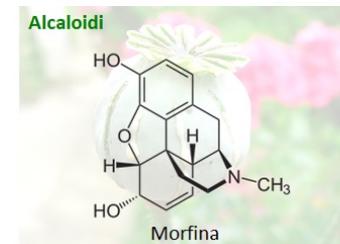
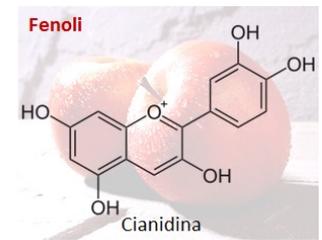
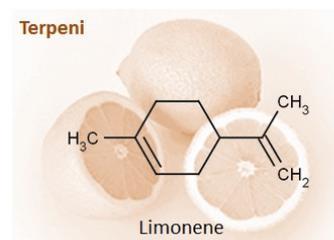
## Metaboliti PRIMARI

Essenziali per la crescita, lo sviluppo e la riproduzione



## Metaboliti SECONDARI

Non sono essenziali per la sopravvivenza



# La metabolomica vegetale presenta grandi difficoltà

**Vastità e variabilità del metaboloma**

**> 200.000 metaboliti secondari ad oggi noti**

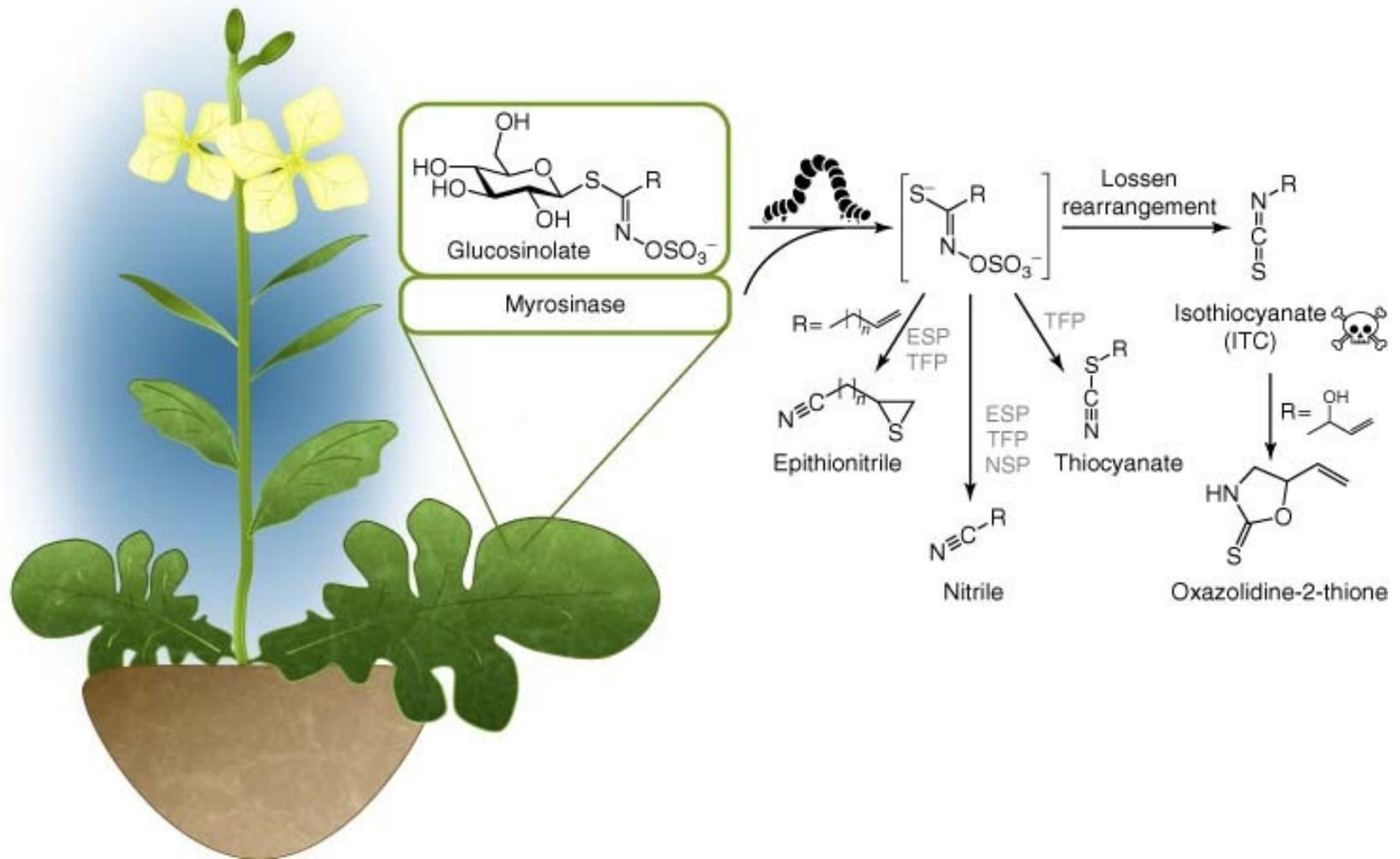
**Estesa compartimentazione subcellulare**

**Traslocazione di precursori, intermedi e prodotti finali**

**Vie metaboliche identiche in diversi compartimenti**

**Regolazione organello-specifica**

# La diversità del metabolismo vegetale



Brassicaceae

# Il *workflow* dell'analisi metabolomica

## 1. Preparazione del campione

- Obiettivo: Separare i metaboliti dalla biomassa non necessaria evitando la degradazione enzimatica
- Materiale vegetale: semi, tessuti, organi (foglie, radici, frutti)
- Step rapido, economico, semplice, facile da eseguire che consta di 3 fasi:
  - raccolta del materiale vegetale,
  - quenching (azoto liquido)
  - estrazione con solventi: metanolo, etanolo, cloroformio, acetonitrile



# Il *workflow* dell'analisi metabolomica

## 2. Analisi del campione

- Obiettivo: identificare e quantificare i metaboliti
- NMR
- LC-MS
- GC-MS

# Metodi analitici in metabolomica

Tra le varie tecniche chimiche analitiche le più usate in metabolomica sono la NMR e la MS

**NMR**

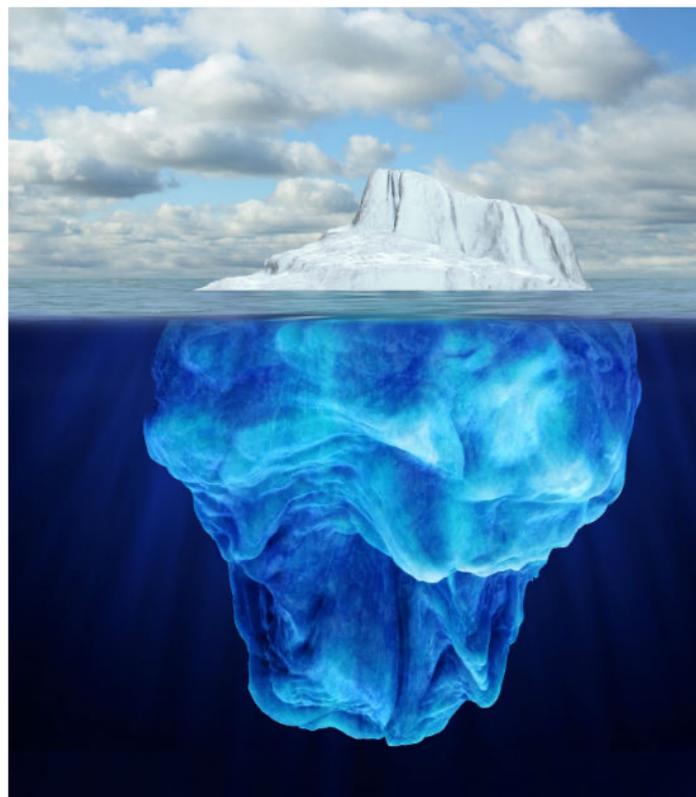
**LC/UV**

**GC/MS**

**LC/MS**

**LC/LIF**

**CE/LIF**



**$10^{-6}M$**

**$10^{-9}M$**

**$10^{-12}M$**

**$10^{-15}M$**

**$10^{-19}M$**

**$10^{-23}M$**

# Spettrometria di massa

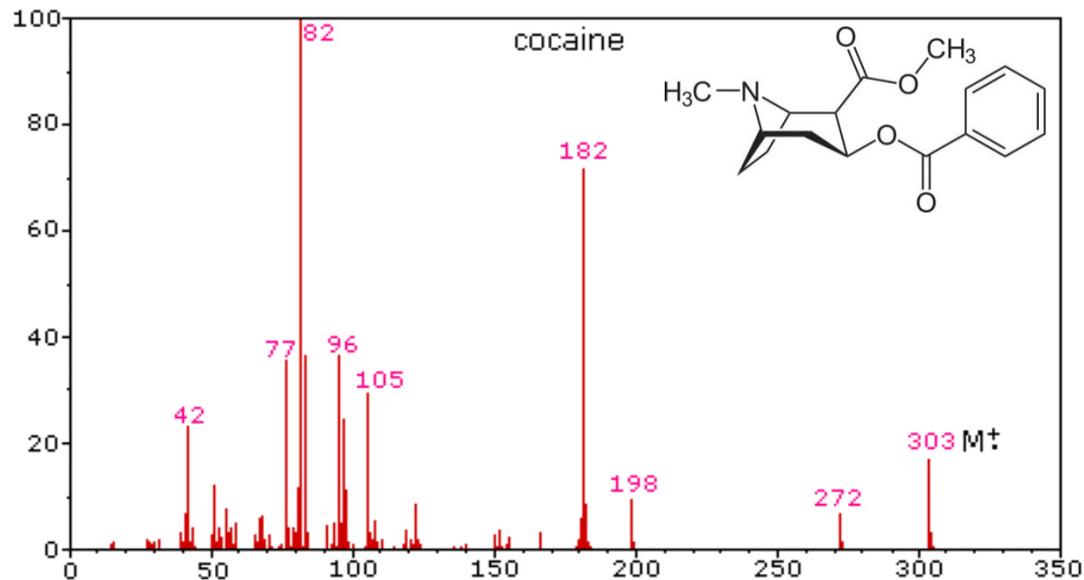
Spettro di massa → di valori  $m/z$  dell'analita ionizzato o frammentato

Confronto tra lo spettro di massa ottenuto con uno di quelli presenti in banca dati

→ IDENTIFICAZIONE

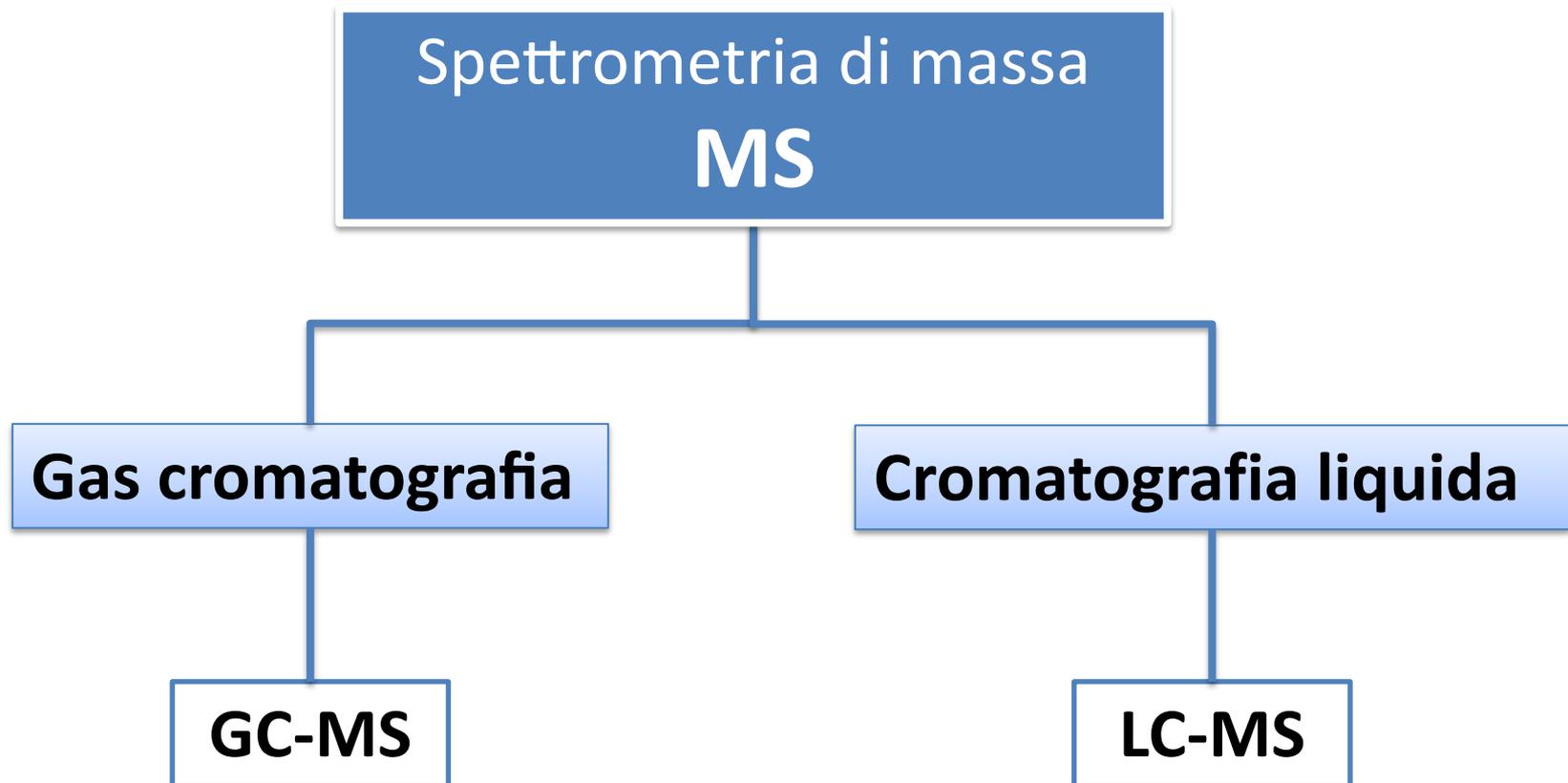
Altezza dei picchi

→ QUANTIFICAZIONE  
(relativa – assoluta)



# Spettrometria di massa

È in genere accoppiata a tecniche di **separazione cromatografica**



# Spettrometria di massa

## Separazione dei metaboliti

Accoppiamento con **gas-cromatografia** (**GC-MS**)



- Altissima risoluzione cromatografica
- Alta sensibilità ( $10^{-12}$ M)



- Richiede derivatizzazione per gli analiti non volatili: sostituzione dei gruppi  $-NH$ ,  $-OH$  ed  $SH$ , per aumentare la volatilità degli analiti
- Analisi dei metaboliti secondari complessa

# Spettrometria di massa

## Separazione dei metaboliti

Accoppiamento con **cromatografia liquida (LC-MS)**



- Buona risoluzione cromatografica



- Maggiore gamma di metaboliti analizzabili
- Maggiore sensibilità ( $10^{-15}\text{M}$ )

# Spettrometria di massa

Identificazione/quantificazione dei metaboliti

Spettrometro di massa



- Minima **preparazione del campione**
- Ampio **range** di metaboliti analizzabili
- Precisa misura del **peso molecolare**



- **Laboriosa misura delle concentrazioni**

**Quantificazione percentuale della ↓  
diminuzione/aumento relativo\***

\* La quantificazione assoluta dei composti è possibile solo con l'aiuto di curve di calibrazione di tutti i composti individuali. Questo procedimento è poco realizzabile quando in uno spettro MS sono presenti centinaia se non migliaia di segnali di masse.

# Spettroscopia NMR

Identificazione/quantificazione dei metaboliti



- **Preparazione semplice del campione**
- **Alta Risoluzione**
- **Analisi rapida e dettagliata**
- **Struttura fine dei composti** (proprietà chimico-fisiche dei nuclei)
- **Altissima riproducibilità**

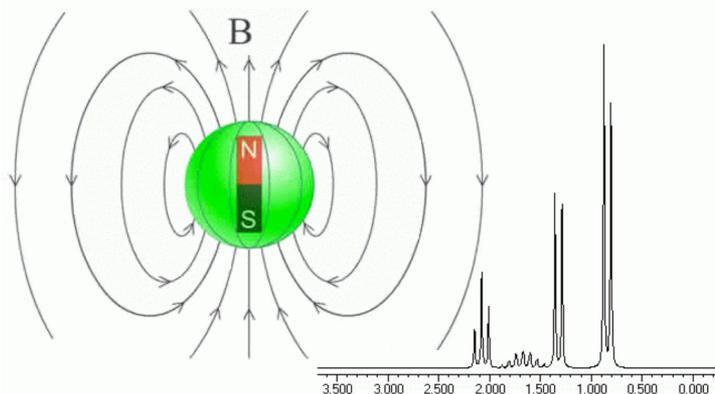


- **Minore sensibilità** ( $10^{-6}\text{M}$ )

# Spettroscopia NMR

## Identificazione/quantificazione dei metaboliti

- Misura l'assorbimento di radiazione elettromagnetica di frequenza radio in molecole immerse in un forte campo magnetico.
- Queste radiazioni provocano transizioni di spin nucleare in particolari atomi (tipicamente  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ).
- Con la tecnica NMR sono osservabili solo i nuclei che possiedono un momento magnetico nucleare di spin, e che quindi si comportano come l'ago di una bussola che si può orientare in un campo magnetico applicato.



# Spettroscopia NMR

## Identificazione/quantificazione dei metaboliti

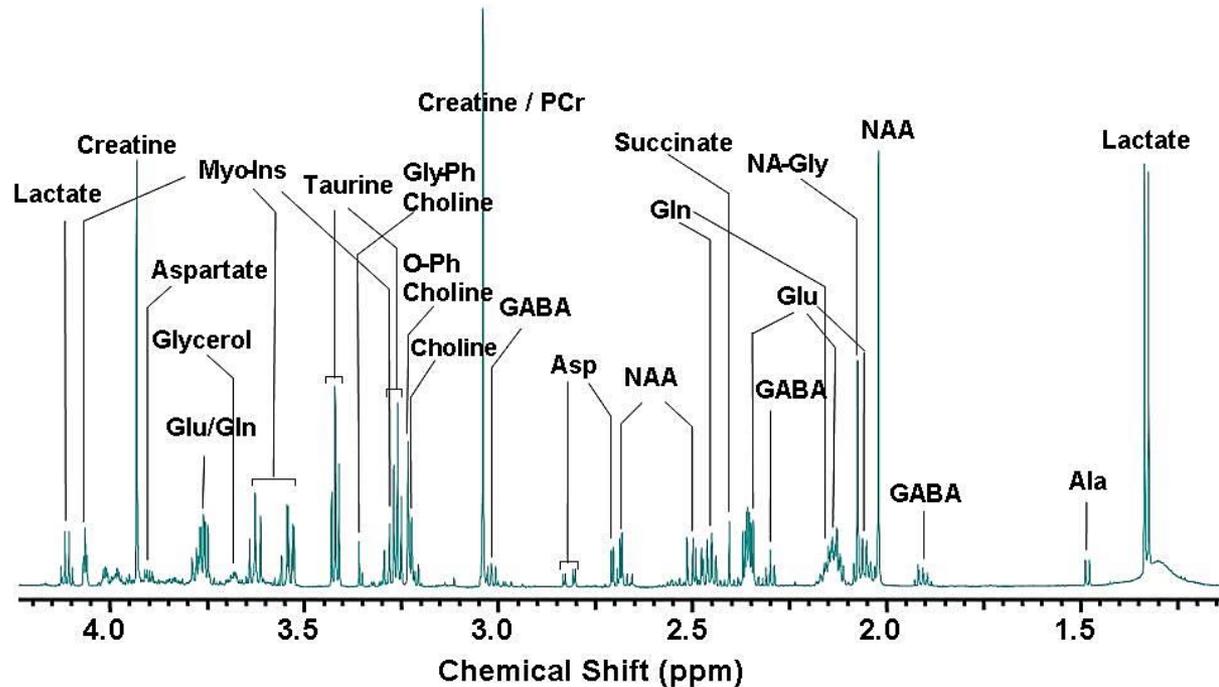
### PARAMENTRI SPETTRALI NMR

- *Chemical shift* (spostamento della frequenza di assorbimento di un atomo per l'interazione con gli atomi circostanti; *part.*, ppm)
- Poiché l'intensità del segnale NMR è proporzionale alla densità nucleare presente, mediante l'aggiunta nel campione di un composto di riferimento a concentrazione nota, sarà possibile analizzare quantitativamente tutti i componenti presenti nel campione.

# Spettroscopia NMR

Dallo spettro NMR è possibile risalire:

1. Struttura molecolare (analisi **qualitativa**)
2. Concentrazione (analisi **quantitativa**)



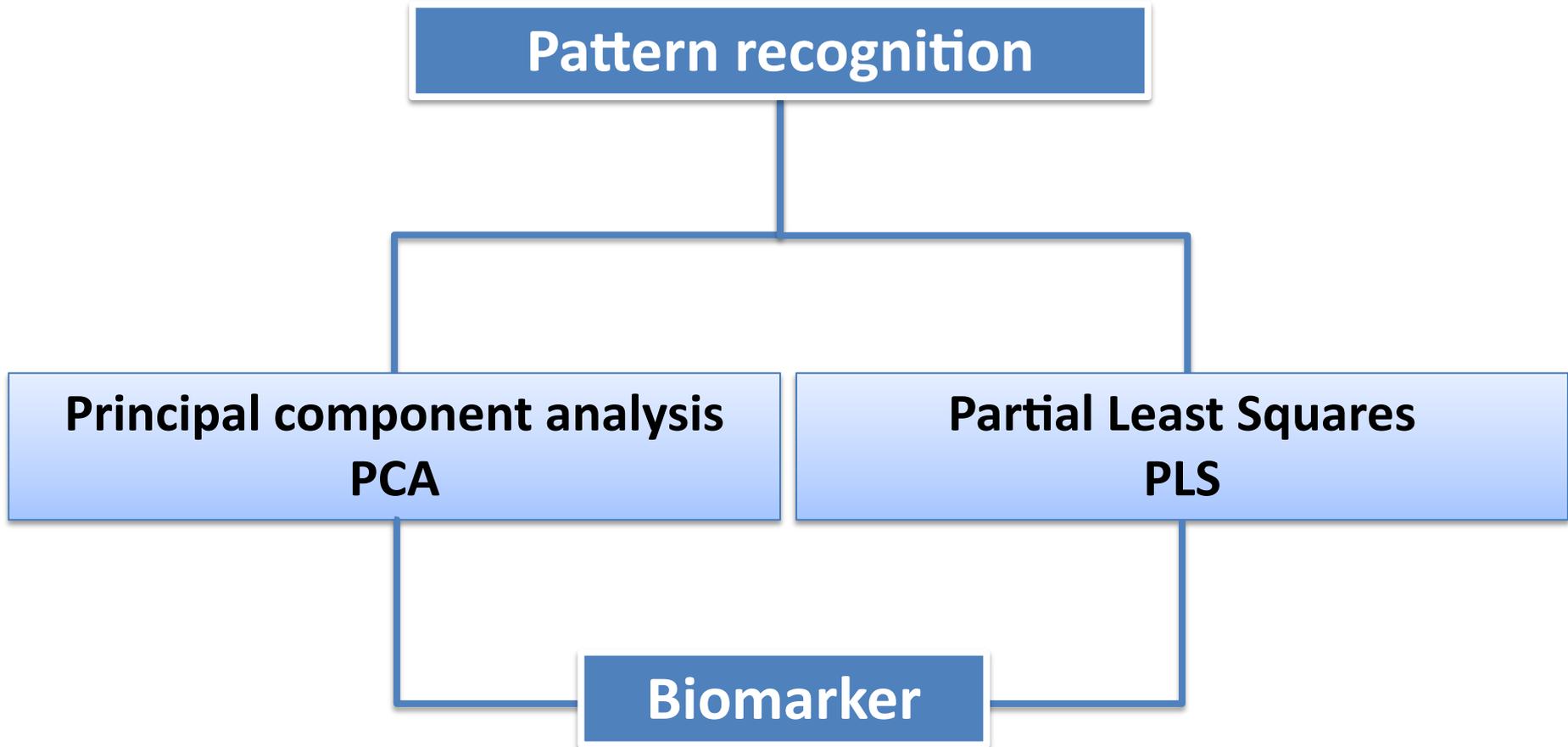
**Chemical shift:** grandezza che esprime l'entità dello spostamento di frequenza di assorbimento di un atomo per l'interazione con gli atomi circostanti

# Il *workflow* dell'analisi metabolomica

## 3. Analisi e processamento dei dati

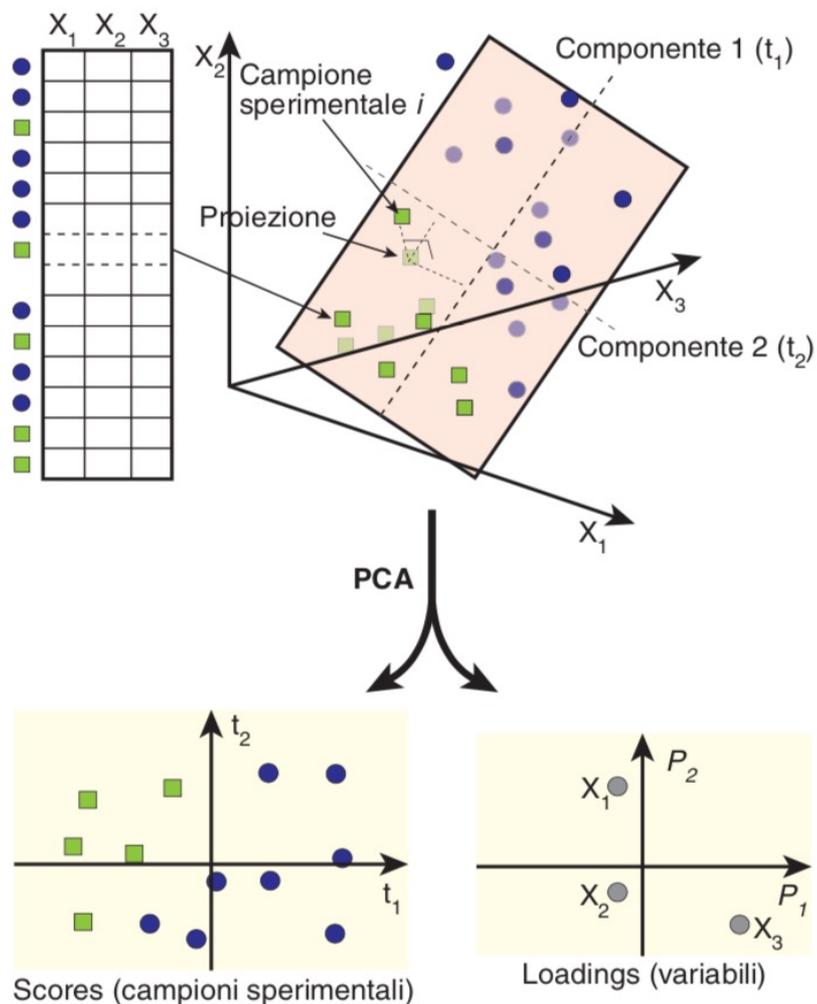
- Obiettivo: classificare i campioni e ridurre la complessità
- Consta di 3 fasi:
  - Pre-processamento
  - Pre-trattamento
  - Analisi statistica dei dati: ANOVA  
PCA  
PLS-DA  
ASCA

# Analisi multivariata dei dati



# Analisi multivariata dei dati

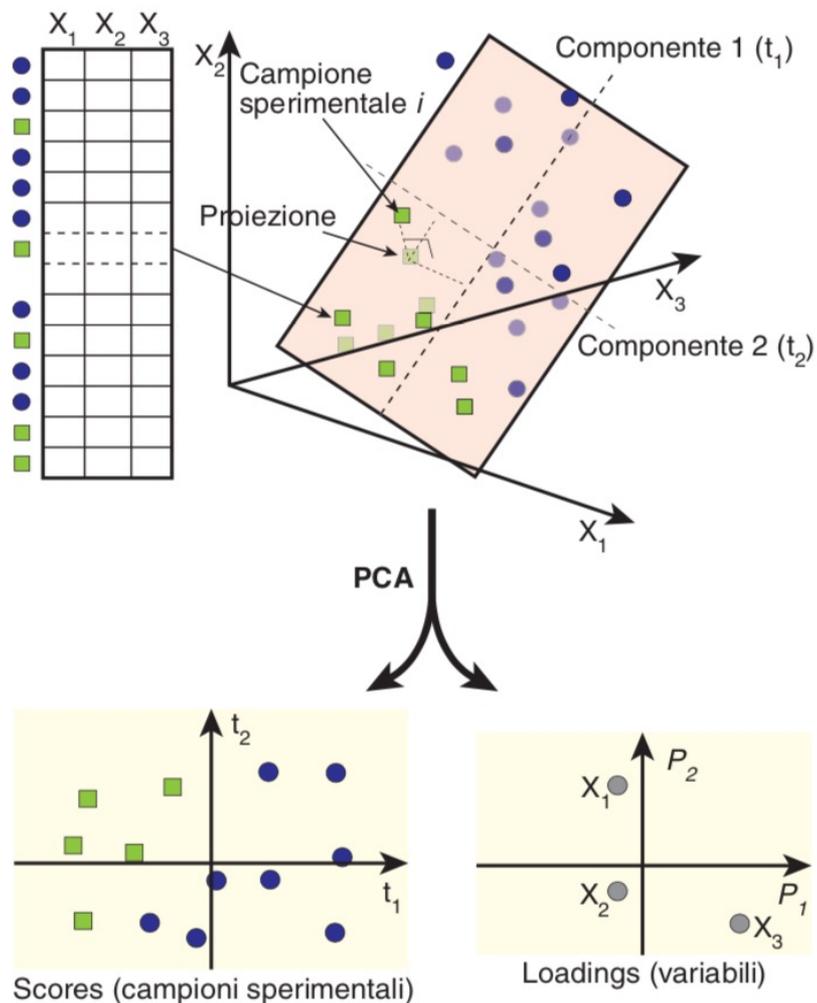
## Principal Component Analysis



- Raggruppa i dati in modo aprioristico, senza imporre alcun vincolo di riconoscimento ai dati.
- Identifica i gruppi di dati con le stesse caratteristiche, riducendo la dimensionalità del data set.
- I dati sono rappresentati da vettori in un iperpiano a più dimensioni, con tante componenti quante sono le variabili originarie, cioè i metaboliti.

# Analisi multivariata dei dati

## Principal Component Analysis



- I dati NMR consistono in una matrice di  $N$  osservazioni ( $i$  campioni) e  $K$  variabili (concentrazioni dei metaboliti).
- Ogni spettro NMR o campione è definito come un punto (coordinata) nello spazio.
- **Score plot:** rivela i possibili raggruppamenti dei campioni sulla base della loro similarità
- **Loading plot:** rivela le variabili importanti per la discriminazione.

# Analisi multivariata dei dati

## Principal Component Analysis

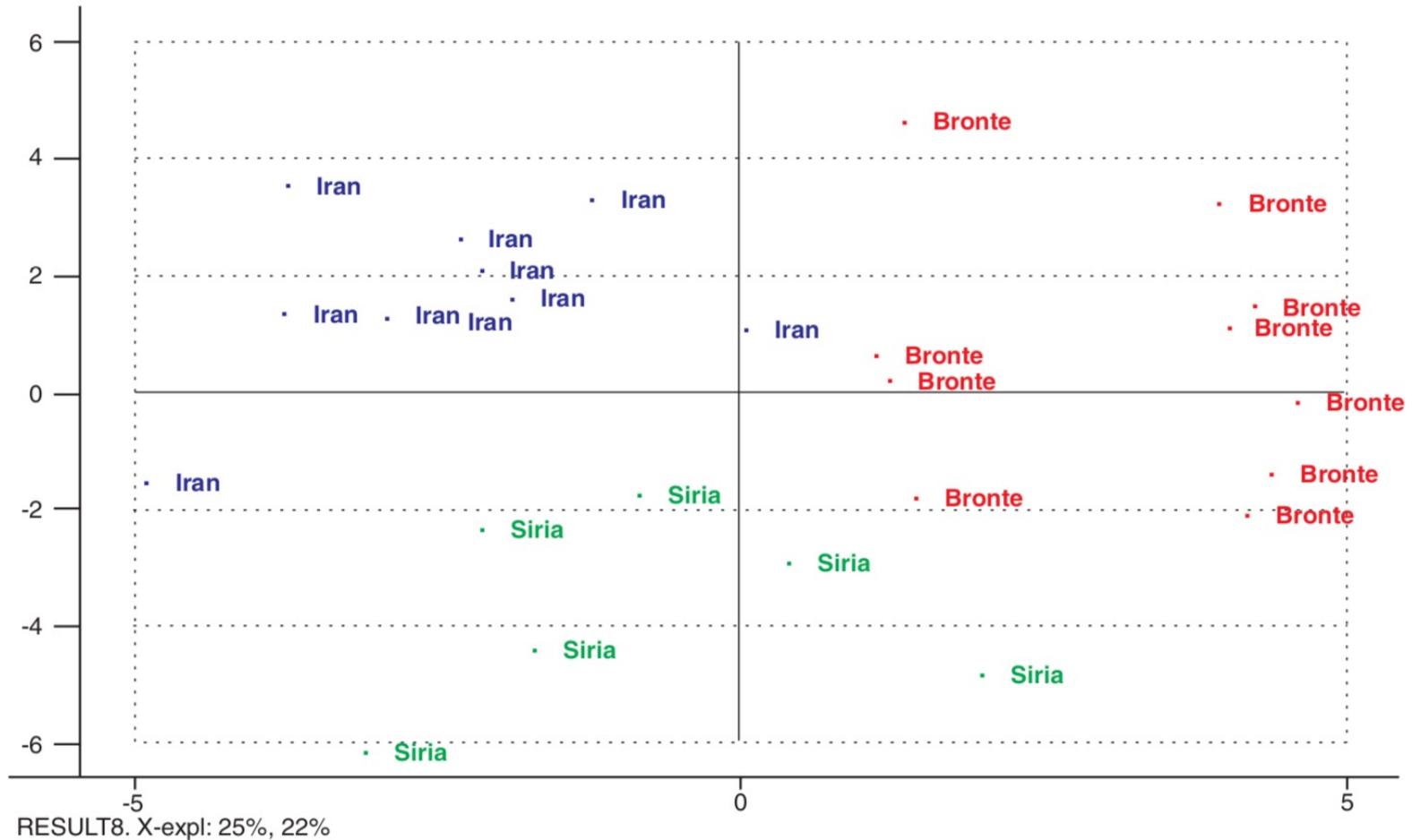


Figura 17.19

estratti idroalcolici di pistacchi

# Analisi multivariata dei dati

## Principal Component Analysis

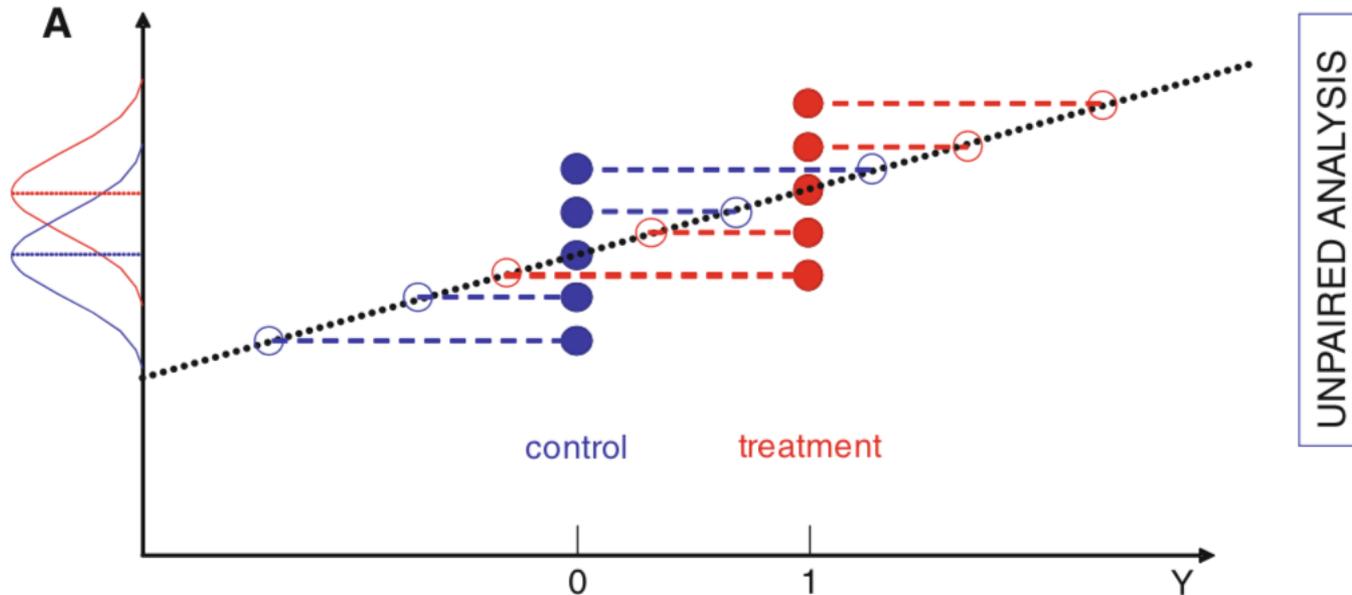
- I metodi non supervisionati come la PCA possiedono dei limiti di classificazione, in particolare quando in un insieme di dati sono presenti un gran numero di classi caratterizzate da un ampio numero di variabili.

## Partial Least Squares (PLS)

- Una volta stabilita la presenza di raggruppamenti tra i vari campioni analizzati, si possono utilizzare metodi di analisi supervisionata per massimizzare la separazione tra 2 o più classi di campioni, per esempio distinguere campioni trattati da campioni di controllo.

# Analisi multivariata dei dati

## Partial Least Squares (PLS)

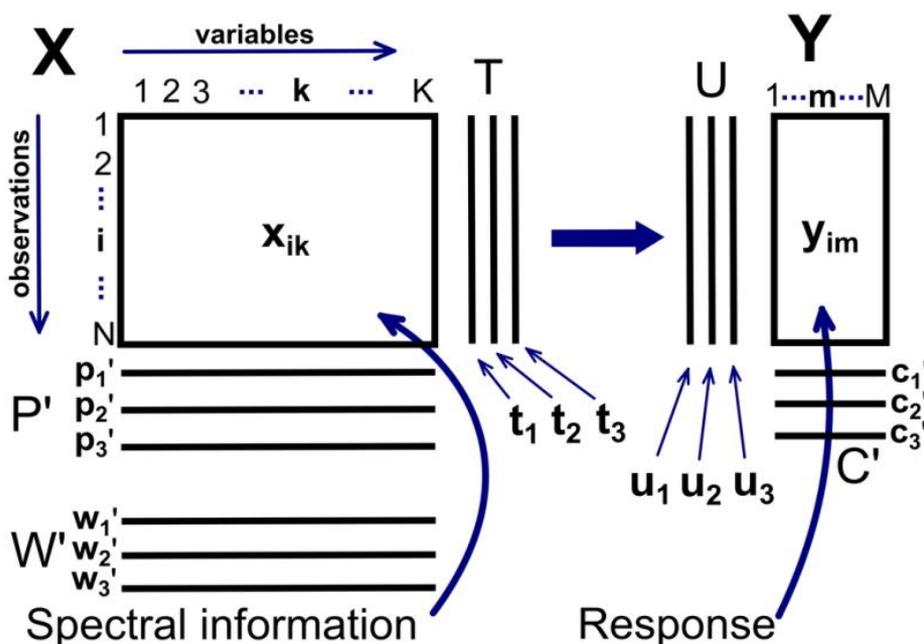


La PLS è una tecnica di regressione lineare della PCA  
Si utilizza per cercare una relazione quantitativa

# Analisi multivariata dei dati

## Partial Least Squares (PLS)

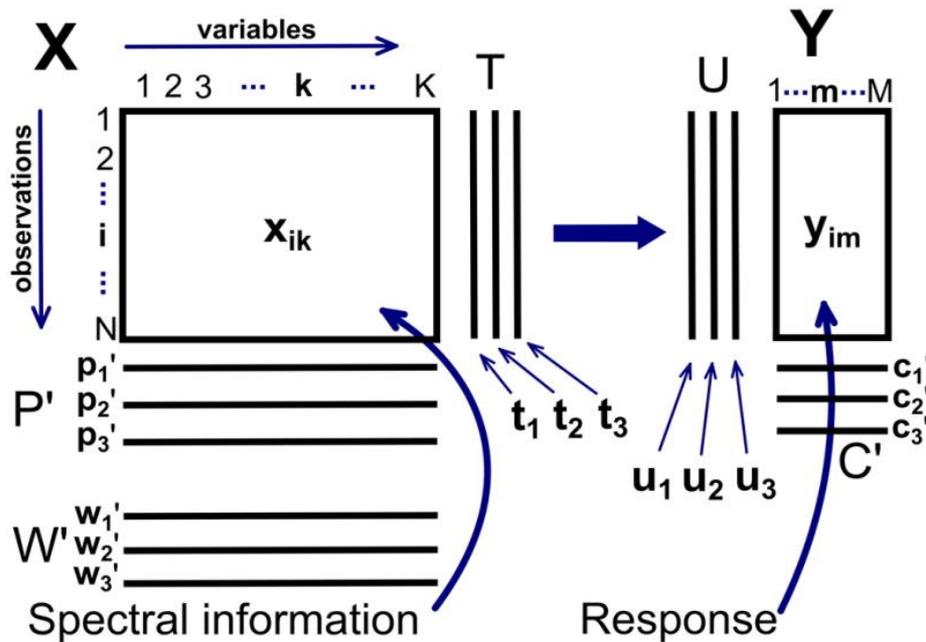
Si utilizza quando si è alla ricerca di una relazione quantitativa tra una matrice di dati  $X$  che contiene i dati spettrali, e una matrice di dati  $Y$  che contiene le informazioni legate al gruppo a cui ogni campione appartiene (controllo e trattato).



Applicando la PLS è possibile descrivere un sistema biologico mettendo in risalto la massima separazione tra le classi predefinite.

# Analisi multivariata dei dati

## Partial Least Squares (PLS)



Come per la PCA, sono generati sia uno score plot che un loading plot e quindi i metaboliti responsabili della discriminazione delle classi di campioni possono essere visualizzati.

# Il workflow dell'analisi metabolomica

## 4. Identificazione di biomarkers

Table 2. List of bioinformatics and statistical tools for plant metabolomics workflow.

Tool	Weblink	Major Function	Reference
MetaboAnalyst	<a href="http://www.metaboanalyst.ca/">www.metaboanalyst.ca/</a>	Statistical analysis	[103]
MetaboSearch	<a href="http://omics.georgetown.edu/metabosearch.html">http://omics.georgetown.edu/metabosearch.html</a>	Data annotation	[104]
MeltDB 2.0	<a href="https://meltdb.cebitec.uni-bielefeld.de">https://meltdb.cebitec.uni-bielefeld.de</a>	Data processing	[93]
metaP-server	<a href="http://metabolomics.helmholtz-muenchen.de/metap2/">http://metabolomics.helmholtz-muenchen.de/metap2/</a>	Data analysis	[105]
MetExplore	<a href="http://metexplore.toulouse.inra.fr">http://metexplore.toulouse.inra.fr</a>	Pathway analysis	[106]
Metabox	<a href="https://github.com/kwanjeeraw/metabox">https://github.com/kwanjeeraw/metabox</a>	Analysis workflow	[100]
METLIN	<a href="https://metlin.scripps.edu/">https://metlin.scripps.edu/</a>	Metabolite annotation	[89]
MetAlign	<a href="http://www.metalign.nl">www.metalign.nl</a>	Data processing & statistical analysis	[95]
MetiTree	<a href="http://www.metitree.nl/">http://www.metitree.nl/</a>	Data annotation	[107]
Metab	<a href="http://www.metabolomics.auckland.ac.nz/index.php/downloads">www.metabolomics.auckland.ac.nz/index.php/downloads</a>	Workflow analysis	[74]
MetabR	<a href="http://metabr.r-forge.r-project.org/">http://metabr.r-forge.r-project.org/</a>	R package	[79]
MetaboAnalystR	<a href="https://github.com/xialab/MetaboAnalystR">https://github.com/xialab/MetaboAnalystR</a>	R package	[80]
Lilikoï	<a href="https://github.com/lanagarmire/lilikoï">https://github.com/lanagarmire/lilikoï</a>	R package	[81]
MetaboDiff	<a href="http://github.com/andreamock/MetaboDiff/a">http://github.com/andreamock/MetaboDiff/a</a>	R package	[82]
MetFrag	<a href="http://c-ruttikies.github.io/MetFrag">http://c-ruttikies.github.io/MetFrag</a>	Metabolite annotation	[108]
MetaGeneAlyse	<a href="http://metagenealyse.mpimp-golm.mpg.de/">http://metagenealyse.mpimp-golm.mpg.de/</a>	Metabolite data analysis	[90]
Metacrop 2.0	<a href="http://metacrop.ipk-gatersleben.de">http://metacrop.ipk-gatersleben.de</a>	Data annotation	[109]
MetAssign	<a href="http://mzmatch.sourceforge.net/">http://mzmatch.sourceforge.net/</a>	Data annotation	[110]
MET-COFEA	<a href="http://bioinfo.noble.org/manuscript-support/met-cofea/">http://bioinfo.noble.org/manuscript-support/met-cofea/</a>	Data processing	[111]
MetPA	<a href="http://metpa.metabolomics.ca">http://metpa.metabolomics.ca</a>	Pathway analysis	[91]
iMet-Q	<a href="http://ms.iis.sinica.edu.tw/comics/Software_iMet-Q.html">http://ms.iis.sinica.edu.tw/comics/Software_iMet-Q.html</a>	Data processing	[94]
Babelomics 5.0	<a href="http://www.babelomics.org/">http://www.babelomics.org/</a>	Statistical analysis	[101]

# Il workflow dell'analisi metabolomica

## 4. Identificazione di biomarkers

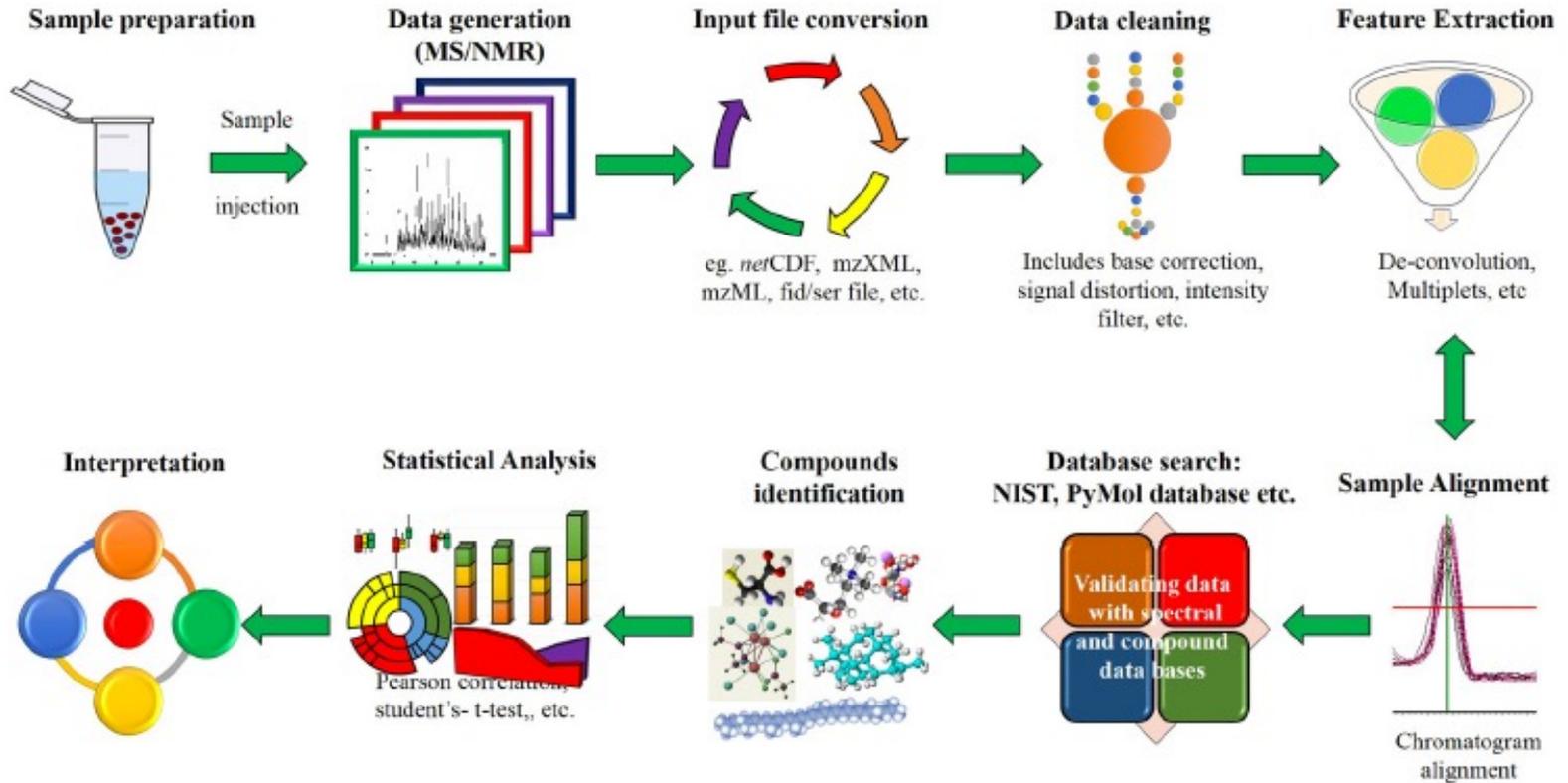
*Metabolites* 2019, 9, 303

11 of 37

**Table 2.** *Cont.*

Tool	Weblink	Major Function	Reference
XCMS	<a href="https://xcmsonline.scripps.edu">https://xcmsonline.scripps.edu</a>	Data processing	[85]
MZedDB	<a href="http://maltese.dbs.aber.ac.uk:8888/hrmet/index.html">http://maltese.dbs.aber.ac.uk:8888/hrmet/index.html</a>	Data annotation	[97]
MassBank	<a href="http://www.massbank.jp/">http://www.massbank.jp/</a>	Metabolite annotation	[112]
MaxQuant	<a href="https://www.maxquant.org/">https://www.maxquant.org/</a>	Data annotation & processing	[113]
MetFusion	<a href="http://mgerlich.github.io/MetFusion/">http://mgerlich.github.io/MetFusion/</a>	Integrated compound detection	[114]
MAVEN	<a href="https://maven.apache.org/">https://maven.apache.org/</a>	Data processing	[115]
MZmine2	<a href="http://mzmine.github.io/">http://mzmine.github.io/</a>	Data processing	[116]
MSEA	<a href="http://www.metaboanalyst.ca/">http://www.metaboanalyst.ca/</a>	Pathway analysis	[92]
MS-Dial	<a href="http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-DIAL/">http://prime.psc.riken.jp/Metabolomics_Software/MS-DIAL/</a>	Data processing	[96]
MarVis	<a href="http://marvis.gobics.de/">http://marvis.gobics.de/</a>	Metabolite annotation	[117]
Mummichog	<a href="http://mummichog.org">http://mummichog.org</a>	Pathway analysis	[118]
MMCD	<a href="http://mmcd.nmr.fam.wisc.edu/">http://mmcd.nmr.fam.wisc.edu/</a>	Metabolite annotation	[119]
COVAIN	<a href="http://www.univie.ac.at/mosys/software.html">http://www.univie.ac.at/mosys/software.html</a>	Statistical analysis	[62]
CAMERA	<a href="https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CAMERA.html">https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CAMERA.html</a>	Data annotation	[120]
CDK	<a href="https://cdk.github.io">https://cdk.github.io</a>	Structural annotation	[121]
CFM-ID	<a href="http://cfmid.wishartlab.com">http://cfmid.wishartlab.com</a>	Metabolite identification	[122]
ADAP	<a href="http://www.du-lab.org/software.htm/">http://www.du-lab.org/software.htm/</a>	Data processing	[123]
KEGG	<a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>	Metabolic models	[98]
GenePattern	<a href="http://software.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/">http://software.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/</a>	Statistical analysis	[102]
Galaxy-M	<a href="https://github.com/Viant-Metabolomics/Galaxy-M">https://github.com/Viant-Metabolomics/Galaxy-M</a>	Workflow analysis	[99]

# Il workflow dell'analisi metabolomica



# LA METABOLOMICA PER LO STUDIO DEI SISTEMI BIOLOGICI

## Biological matrix



Nutritional crops

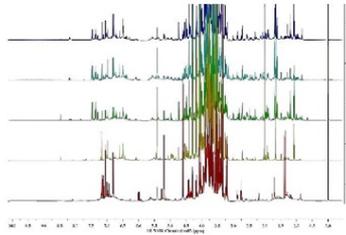


Medicinal plants

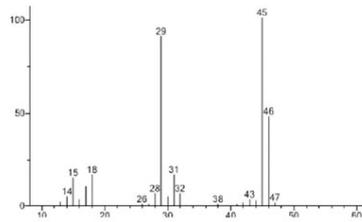


Human biofluids

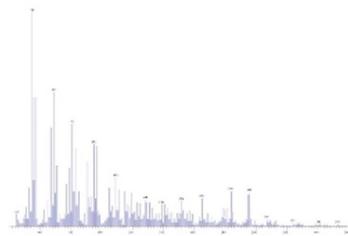
## Data acquisition



NMR spectrum

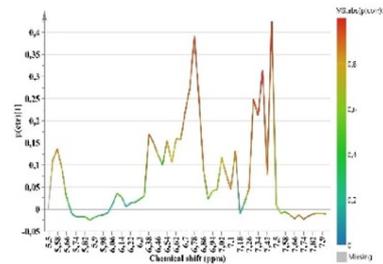
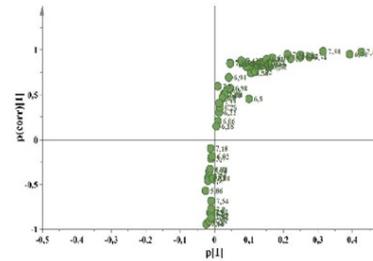
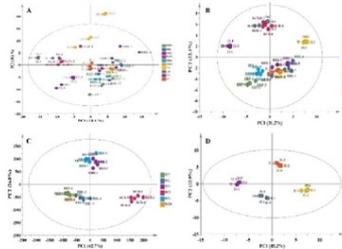


LC/MS spectrum



GC/MS spectrum

## Statistical analyses



Multivariate data analysis

## Potential applications

- Metabolomics-assisted breeding
- Improved nutritional quality
- Increased crop yield
- Determination of adaptive stress mechanism

## Nutritional crops

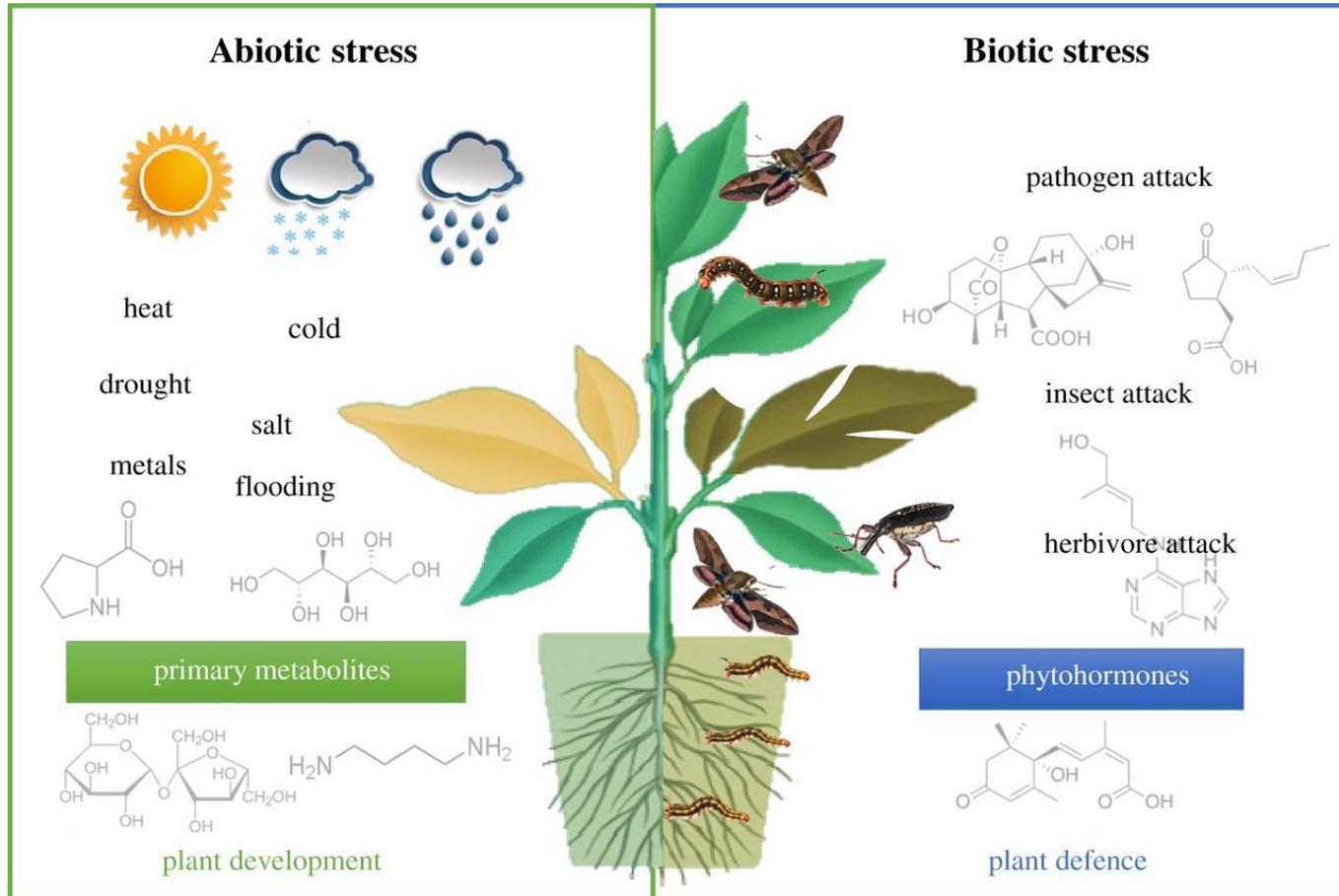
- Identification of bioactive leads
- Elucidation of biosynthetic pathways
- Drug development
- Quality control
- Authentication

## Medicinal plants

- Early prognostic and diagnostic biomarkers
- Identification of therapeutic targets
- Monitoring of drug safety
- Personalization of drug treatment

## Human biofluids

# L'IMPORTANZA DELLA METABOLOMICA NELLO STUDIO DELLE PIANTE



**'DETECTING THE UNEXPECTED'**

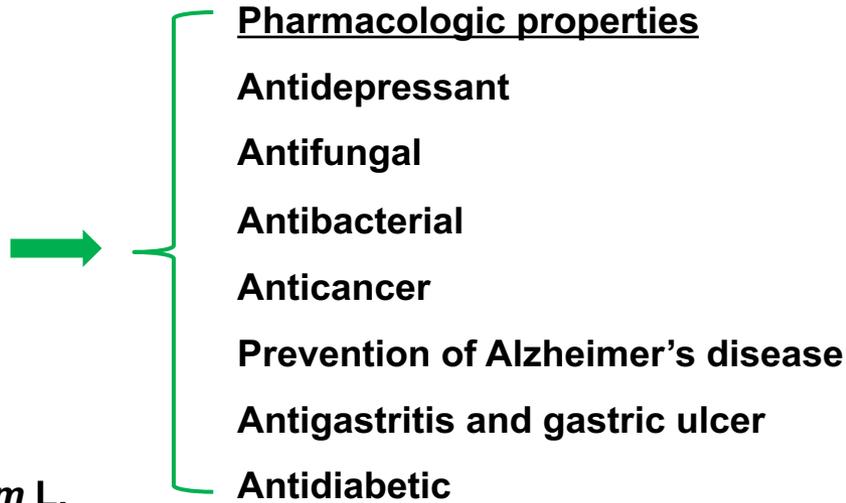


# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE MEDICINALI

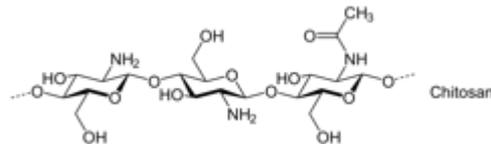
What was the question?



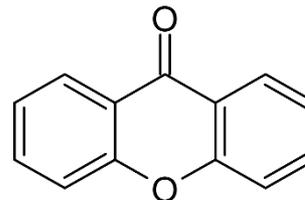
*Hypericum perforatum* L.



*H. perforatum* in vitro roots



Xanthones

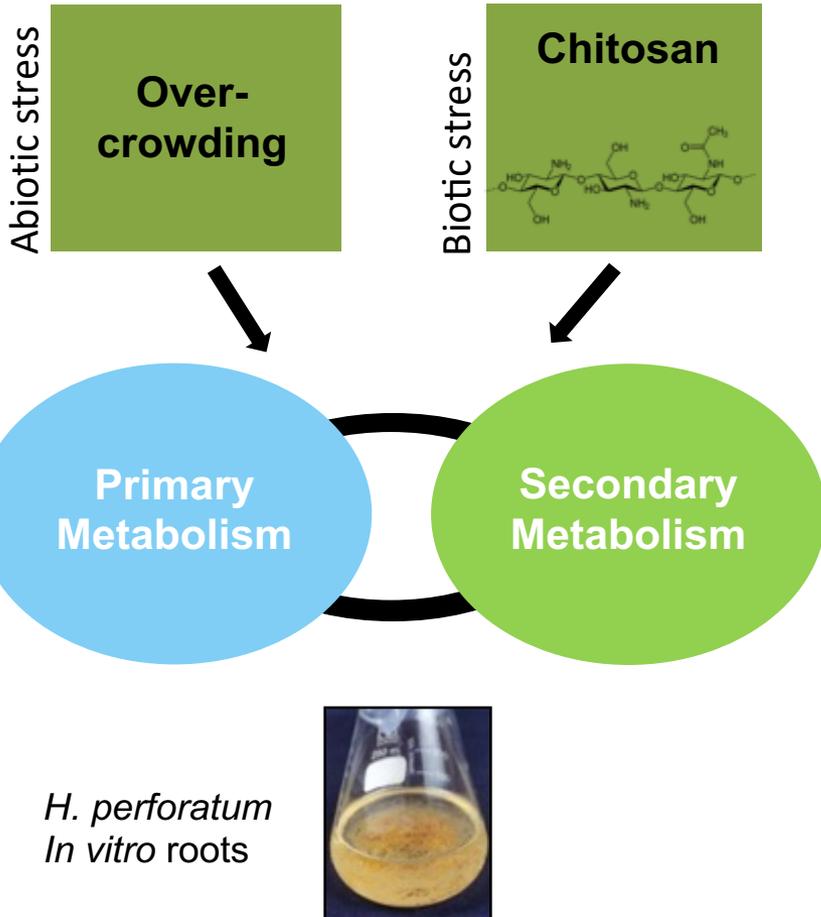


CLASS	COMPOUNDS
Naphtodiantrones	Hypericin Pseudohypericin
Flavonoids	Hyperoside, Quercetin, Isoquercetin, Rutin, Quercitrin, Campferol, Luteolin
Floroglucinols	Hyperforin Adhyperforin
Procyanidins	Catechin Epicatechin
Xanthones	Paxanthone, kielcorin, 1,3,5,6- tetradihydroxy- xanthone, 1,3,5,7- tetradidroxy- xanthone
Tannins	Tannic Acid
Essential oil	Terpenes
Aminoacids	GABA, Glutamine, Threonine, Leucine





# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE MEDICINALI



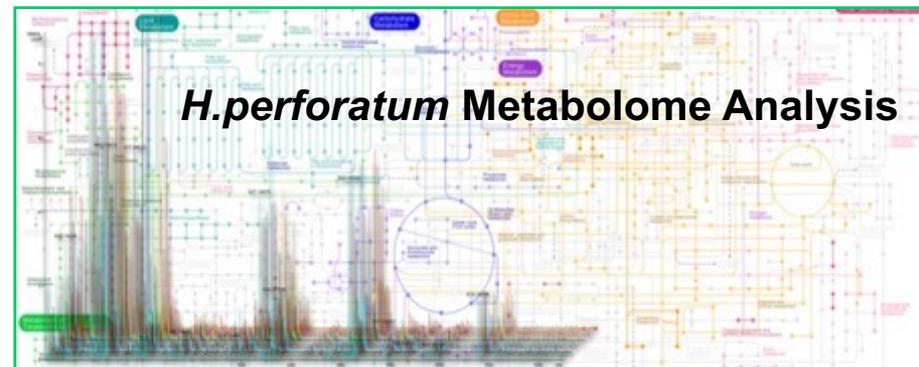
Metabolomics (2014) 10:1186–1196  
DOI 10.1007/s11306-014-0660-z

ORIGINAL ARTICLE

**A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum* in vitro roots**

Elisa Brasili · Giulia Praticò · Federico Marini · Alessio Valletta · Giorgio Capuani · Fabio Scubba · Alfredo Micheli · Gabriella Pasqua

NMR-based metabolomics approach





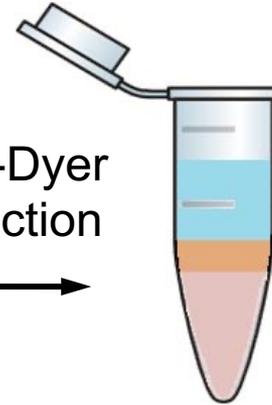
# LA PREPARAZIONE DEL CAMPIONE NELL'ANALISI NMR



Liquid nitrogen



Bligh-Dyer Extraction



Hydroalcoholic phase

Pellet

Chloroformic phase



$^1\text{H-NMR}$

Hydroalcoholic phase

MeOD / D<sub>2</sub>O (2:1)

+

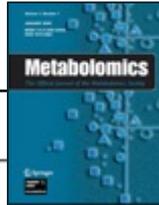
3-(trimethylsilyl)-  
propionic-2,2,3,3,-d<sub>4</sub> acid  
sodium salt (TSP)

Chloroformic phase





# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE MEDICINALI



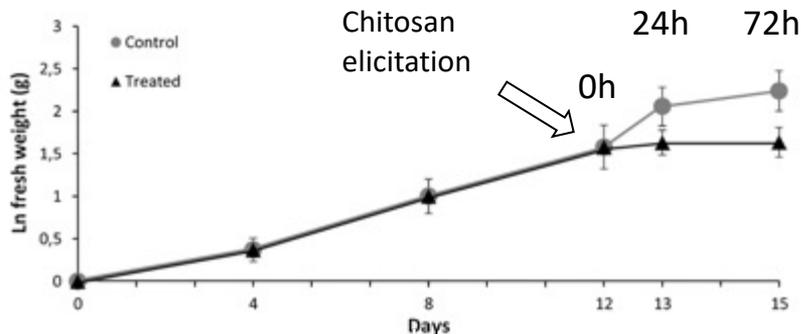
Metabolomics (2014) 10:1186–1196  
DOI 10.1007/s11306-014-0660-z

ORIGINAL ARTICLE

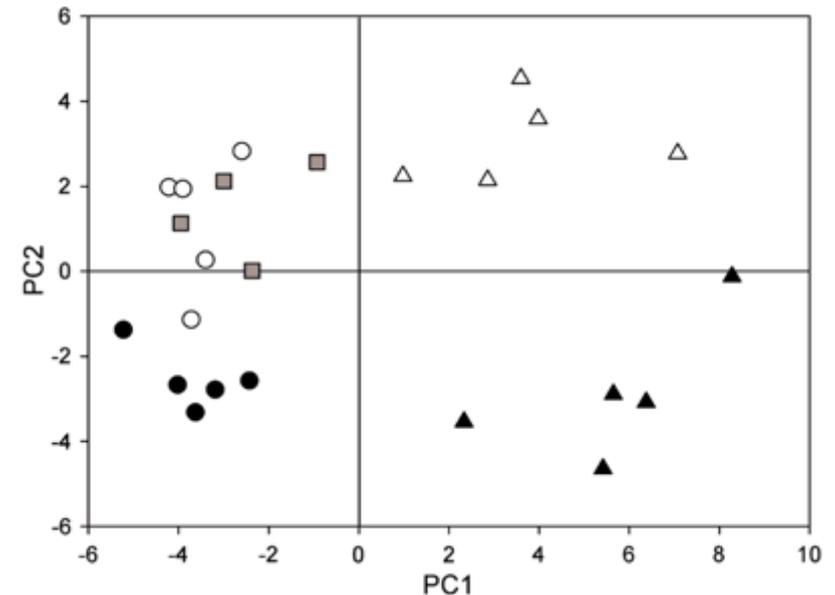
**A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum* in vitro roots**

Elisa Brasili · Giulia Praticò · Federico Marini ·  
Alessio Valletta · Giorgio Capuani ·  
Fabio Scubba · Alfredo Micheli · Gabriella Pasqua

The growth curve of *H. perforatum* in vitro roots



The PCA scores plot from  $^1\text{H-NMR}$  spectra of *in vitro* roots

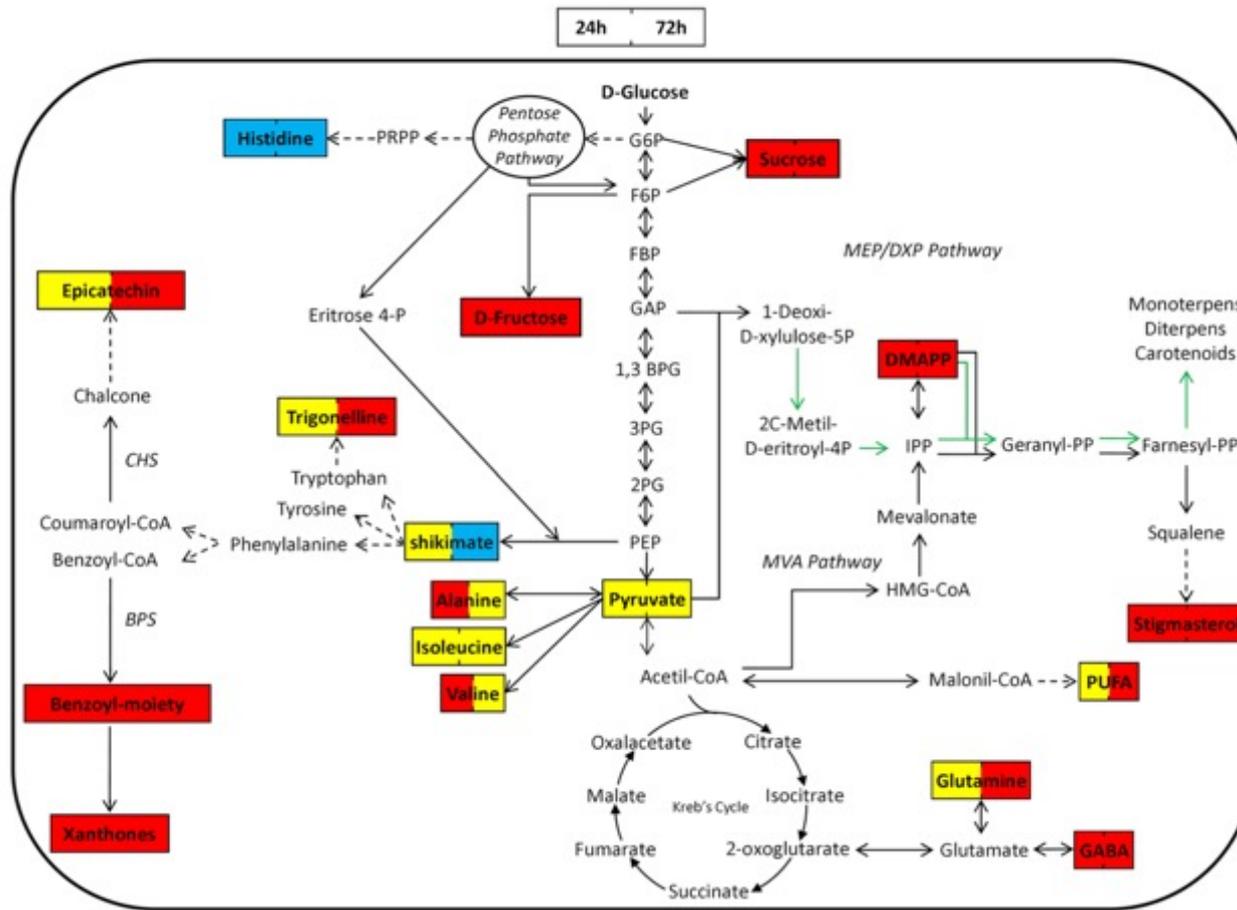


- T0
- Control 24 h
- Control 72 h
- △ Treated 24 h
- ▲ Treated 72 h



# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE MEDICINALI

## Metabolic network of *H. perforatum* in vitro roots



Brasili et al. *Metabolomics*, 2014

Loadings number	Metabolites	Time	Treatment
1	U1		
3	Isoleucine		
5	Valine		
6	U3		
7	Lactate + threonine		
8	Alanine		
9	GABA		
11	Glutamine		
13	Fructose		
14	Sucrose (fructose)		
15	$\alpha$ -Glucose		
16	U4		
17	$\beta$ -Glucose		
18	U5		
19	Sucrose (glucose)		
20	U6		
21	U7		
23	Epicatechin		
24	U8		
25	U9		
26	U10		
27	Shikimate		
28	U11		
29	U12		
30	Tryptophan		
31	U13		
32	Adenosine		
33	Formate		
34	Trigonelline		
35	DMAPP		
36	U14		
37	U15		
38	U16		
39	U17		
40	U18		
41	U19		
42	Histidine		
43	Benzoyl moiety		
45	Stigmasterol		
46	PUFA		
47	Xanthone		
48	Total xanthones		
49	Other xanthones		



# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE ALIMENTARI



Compositae

*Cichorium intybus*

Theophrastus	300 BC
Horatius	100 BC
Dioscurides/Apicius/Plinius/Celsus	100 AD
Galenus	200 AD
Islamic medicine	700–900
von Bingen	1150
Ibn al-Baytā	>1220
Magnus	1256
Megenberg	1350
Wonnecke von Kaub	1485
Bock/Fuchs	1539/1543
Lonizter/Daléchamps	1582/1586
Tabernaemontanus/Castelvero/Dodoens	1613/1614/1618
Zwinger/Munting	1696
Schützen /Gleditsch	1758/1788
Van Trappen/Kops&Gevers	1843/1853
Flückiger & Hanbury ( <i>inulin</i> )	1874
Kneipp	1886
Schmiedeberg ( <i>identification bitter compound</i> )	1912
Shannon & Smith ( <i>inulin – renal function</i> )	1935
Madaus	1938
World War II	1939–1945
Holzer & Zinke ( <i>extraction bitter compound</i> )	1953
Chopra/Hoppe	1956/1958
Kleijn	1970
Bosnian war	1992–1995

**Food use**

Leaf vegetable

Food for the sick

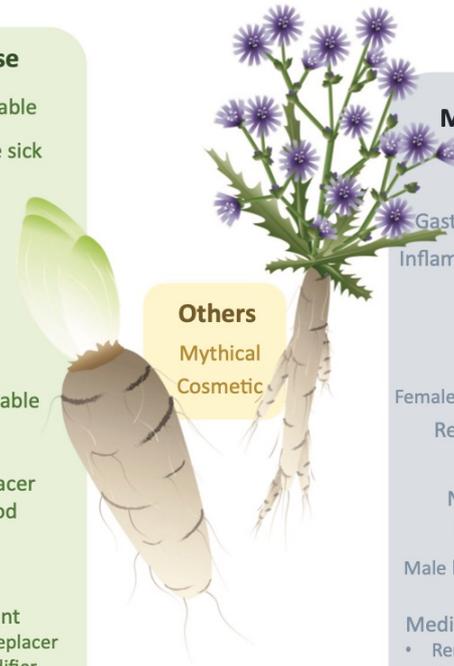
Root vegetable

Coffee replacer

Famine food

Food ingredient

- Fat-/sugar replacer
- Texture modifier
- (prebiotic) Fiber



**Others**

Mythical

Cosmetic

**Medicinal use**

Gastrointestinal system

Inflammations & infections

Antidote

Liver

Urinary tract

Female Reproductive system

Respiratory system

Spleen

Nervous system

Anthelminthic

Male Reproductive system

Medicinal ingredient

- Renal function test
- Encapsulation colonic delivery



# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE ALIMENTARI

## Plant growth promoting fungi as biostimulants

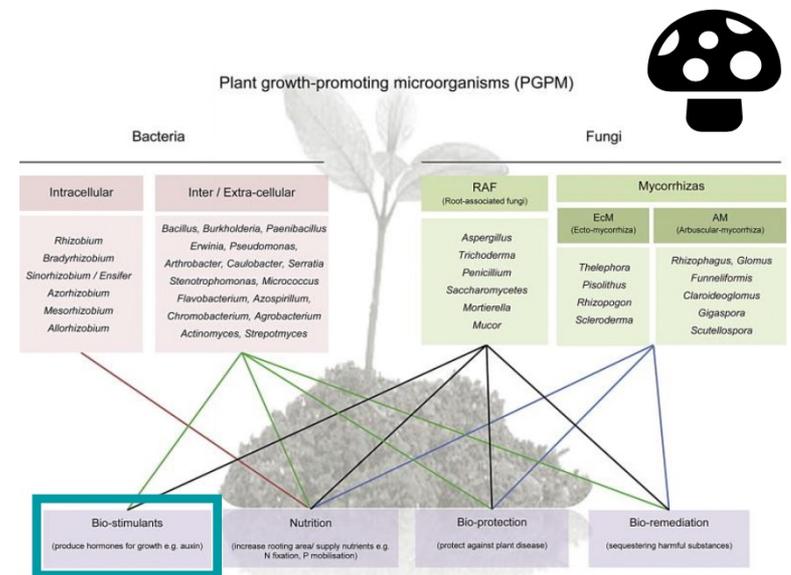
Microbial biostimulants represent an interesting sustainable solution that may play a key role in increasing crop resilience and productivity in adverse environmental conditions, minimizing agrochemicals applications and tackling climate change effects.

Microbes are able to secrete phytohormones and other plant regulating compounds or alter their levels, significantly enough to cause changes to plant growth and metabolism.



Metabolism modification alter also the composition of root exudates, affecting the solubility and availability of other nutrients and influencing the abundance and behaviour of the microbiome.

Therefore, learning from nature, the metabolites released in the culture medium during growth in controlled conditions may be used to simulate these interactions and effectively stimulate plant growth.



(Owen et al., 2015)



# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE ALIMENTARI

## Aim and Objectives



To assess the efficacy of *M. polyspora* (Hotson) Weresub & P. M. LeClair and *C. globosum* Kunze culture filtrates as biostimulant for the cultivation *Cichorium intybus*, a plant of agricultural and medicinal interest, evaluating:

- the effectiveness of culture filtrates in promoting plant growth;
- the metabolism changes addressing possible mechanisms of action of biostimulation.



### *Cichorium intybus* (L.)

Alimurgic species, thus an edible wild plant growing spontaneously in natural grassland and farmed fields.

Rich and complex phytochemical profile, including a great number of bioactive substances

High nutritional value and its health-promoting characteristics

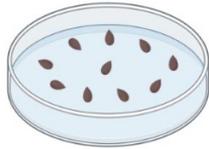
#### Commonly used as

- Medicinal plant
- Vegetable
- Coffee substitute
- Forage
- Probiotics
- Functional ingredient in commercial food products



# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE ALIMENTARI

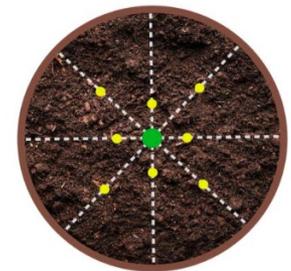
## *Cichorium intybus* plant biostimulation with fungal culture filtrates



*C. intybus* seeds were surface sterilized and plated on Murashige and Skoog (MS) incubated at 25°C under a photoperiod of 16/8 h (light/dark)



After 15 days seedlings were transferred to disposable plastic pots incubated in a walk-in chamber at 18/22°C under a photoperiod of 15/9 h (light/dark) and watered every three days



One month after the seedling were transferred into the pots, 8 mL of culture filtrate added to the soil of each pot. 4 treatments: MEB Control (MEB), Water control, *C.globosum* (205) and *M. polyspora* (503).



*C. globosum*

*M. polyspora*



Liquid culture in Malt extract broth (MEB) incubated 14 days at 25°C in the dark

Culture filtrates's analysis trough nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopy 600MHz

### Material & Methods



# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE ALIMENTARI

## Biostimulant effects of culture filtrates on *Cichorium intybus* plant: evaluation of growth performance and metabolomic traits

Fourteen days after culture filtrate addition

### Evaluation of growth parameters of 5 replicates randomly picked for each treatment.

- Total dry weight
- Shoot Dry weight
- Root dry weight
  - Taproot
  - Lateral root
- Leaves number
- Leaf area
- Specific leaf area index
- Root/shoot

### Untargeted metabolomic analysis by $^1\text{H-NMR}$ of leaves and roots of 5 replicates

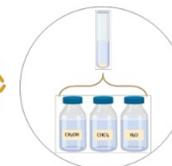
for the treatments: MEB Control, *C. globosum* and *M. polyspora*



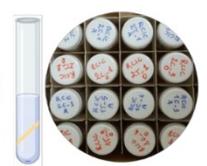
1.5 g of fresh biomass was frozen with liquid nitrogen to ensure metabolic quenching.



Pulverization of the sample by pestle.



Addition of a mixture of methanol: chloroform: distilled water (3: 3: 1.2 mL). Shaking and overnight incubation at 4 ° C.



Separation by centrifugation (11000 rpm, 4 ° C, 30 min) of the hydroalcoholic and fat-soluble phases.



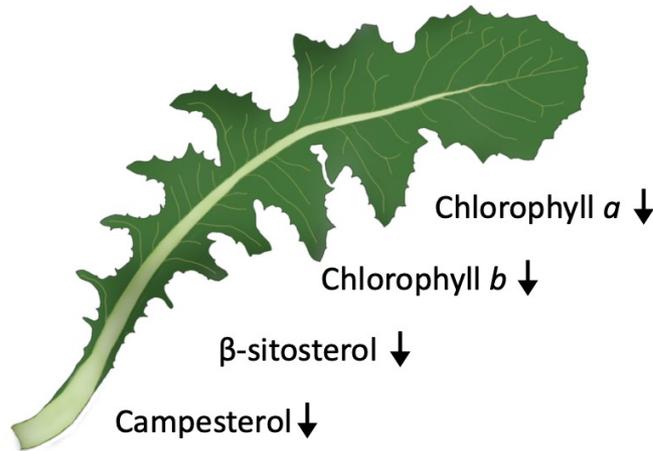
Analysis by  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz)

Material & Methods



# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE ALIMENTARI

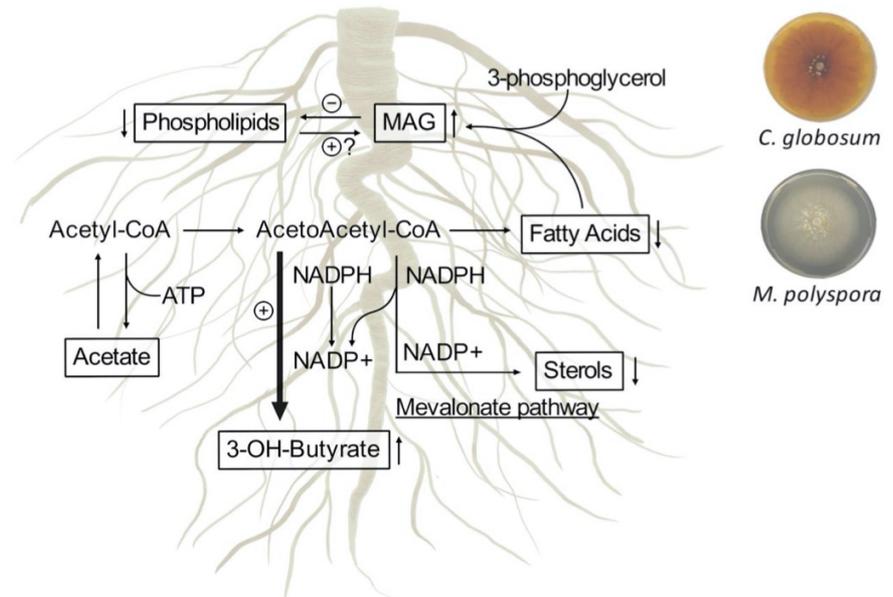
## Impact of soil application of *C. globosum* and *M. polyspora* culture filtrates on *C. intybus* metabolome: common threads in leaves and root metabolism



*C. intybus* leaves after treatment with *C. globosum* and *M. polyspora* culture filtrates showed the reduction in chlorophylls *a* and *b* content not associated to leaf greening decrease. A significant decrease in campesterol, and  $\beta$ -sitosterol was also observed.

Discussion

Both the culture filtrates stimulated a common metabolic response involving the increase of 3-OH-butyrate and monoacylglycerols associated to the decrease of unsaturated fatty acids (UFAs) such as linolenic acid, sterols including campesterol and  $\beta$ -sitosterol and phospholipids.





# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE ALIMENTARI

## *C. globosum* culture filtrate triggers phenylpropanoid pathway in *C. intybus* roots: biosynthesis of chicoric acid

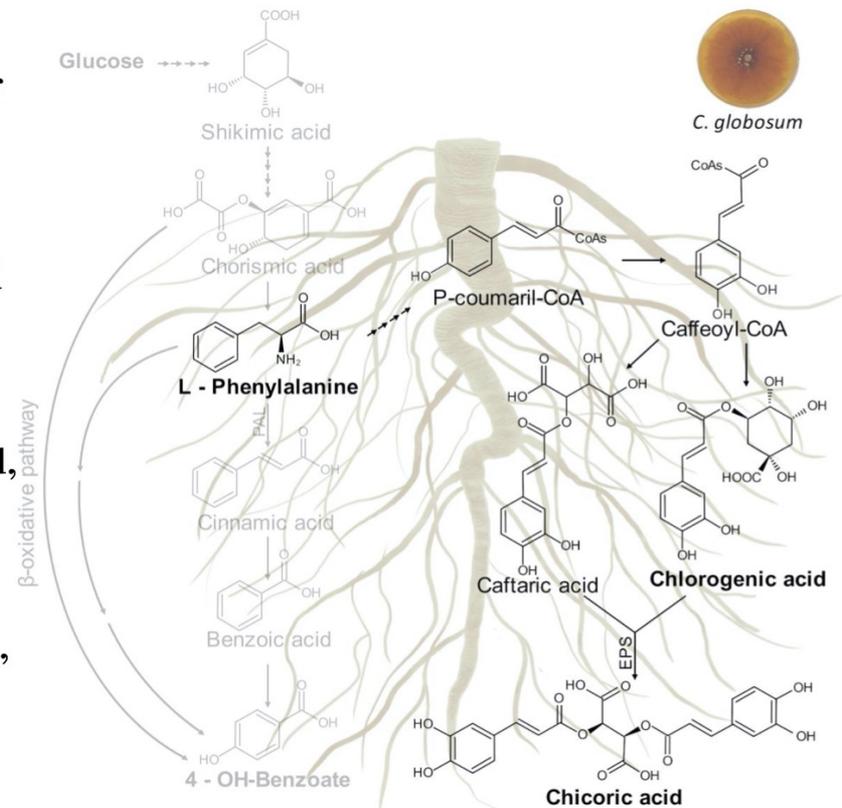
*C. globosum* culture filtrate triggered the phenylpropanoid pathway leading to an increase of chicoric acid synthesis ( $16.74 \pm 2.16$  mg / 100 g vs MEB  $7.91 \pm 3.18$ ).

The putative biosynthetic pathway of chicoric acid in *C. intybus* plants reported in the figure has been proposed.

Chicoric acid is a very promising natural compound, which occurs in a variety of plant species

Chicoric acid plays an important role in plant defence against different diseases caused by viruses, bacteria, fungi, nematodes, and insects.

Discussion





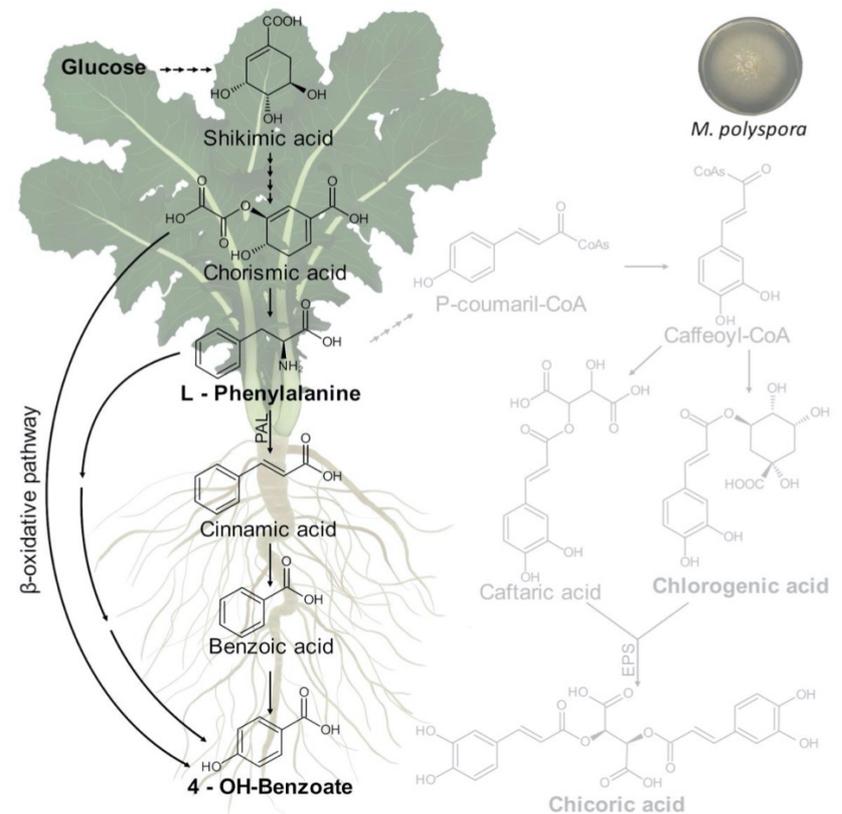
# LA METABOLOMICA PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PIANTE ALIMENTARI

*M. polyspora* culture filtrate triggers phenylpropanoid pathway in *C. intybus* leaves and roots: biosynthesis of 4-OH benzoate

*M. polyspora* culture filtrate triggers the phenylpropanoid pathway increasing the synthesis of 4-OH-benzoate generated from aromatic amino acids produced via the shikimate pathway in leaves and roots.

Benzoic acids serve as precursors for a wide variety of essential compounds and natural products playing crucial roles in plant fitness and in defence response activation.

4-OH benzoate has been reported for *in vitro* antifungal effects on *Eutypa lata*



Discussion

# LA METABOLOMICA PER L'IDENTIFICAZIONE DI BIOMARCATORI CHIMICI PER IL PERIODO OTTIMALE DI RACCOLTA



 *applied sciences*



Article

## NMR-Based Metabolomic Study of Purple Carrot Optimal Harvest Time for Utilization as a Source of Bioactive Compounds

Fabio Sciubba <sup>1,2,\*</sup>, Alberta Tomassini <sup>1,2</sup>, Giorgio Giorgi <sup>3</sup>, Elisa Brasili <sup>4</sup>, Gabriella Pasqua <sup>4</sup>, Giorgio Capuani <sup>1,2</sup>, Walter Aureli <sup>3</sup> and Alfredo Micheli <sup>2,4</sup>



NMLab



*Daucus carota ssp. sativus var. atrorubens*

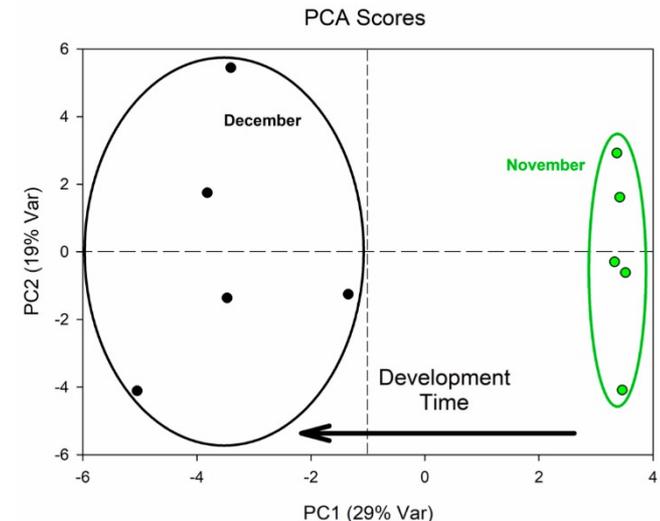
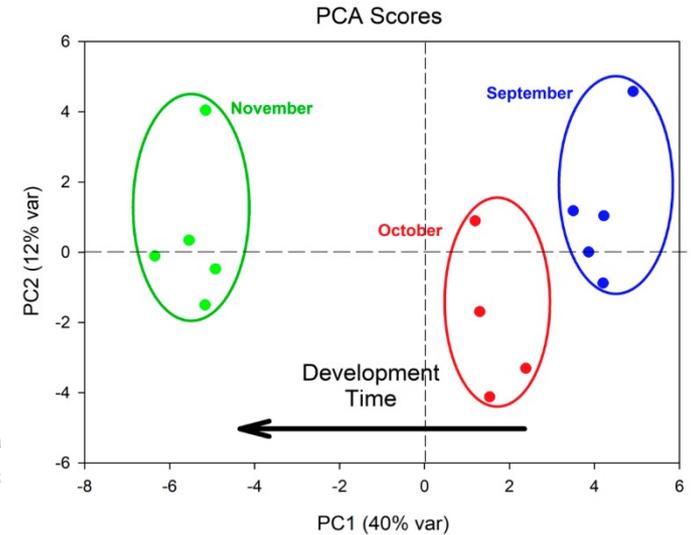
# LA METABOLOMICA PER L'IDENTIFICAZIONE DI BIOMARCATORI CHIMICI PER IL PERIODO OTTIMALE DI RACCOLTA

- L'identificazione di biomarcatori chimici per il periodo ottimale di raccolta è di fondamentale interesse sia dal punto di vista nutrizionale che per l'industria agroalimentare

**Table 2.** Comparison of the carrots harvested in November and December for the molecules resultin to be significant by PCA analysis, and one-way-ANOVA was employed to assess statistical difference

Metabolite	Amount ( $\mu\text{mol/g}$ )	
	November	December
Leucine	$1.93 \pm 0.14$	$1.18 \pm 0.13$ **
1,2-Propanediol	$0.25 \pm 0.03$	$0.13 \pm 0.02$ **
Alanine	$1.19 \pm 0.11$	$2.61 \pm 0.12$ **
GABA	$1.27 \pm 0.13$	$3.05 \pm 0.33$ **
Aspartic acid	$0.94 \pm 0.11$	$0.51 \pm 0.05$ *
Luteolin 7-O-Glucoside	$0.83 \pm 0.08$	$1.18 \pm 0.12$ *
Chlorogenic acid	$1.14 \pm 0.15$	$2.09 \pm 0.41$ *
Fumaric acid	$0.30 \pm 0.03$	$0.65 \pm 0.18$ *
Tyrosine	$1.08 \pm 0.08$	$1.68 \pm 0.25$ *
NAD	$0.054 \pm 0.002$	$0.11 \pm 0.02$ *
$\omega$ -6 unsaturated fatty acids	$2.62 \pm 0.24$	$1.42 \pm 0.26$ *
Falcarinol	$0.26 \pm 0.04$	$0.54 \pm 0.03$ **
Carotenoids	$0.009 \pm 0.002$	$0.0031 \pm 0.0004$ **

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .



# LA METABOLOMICA PER LA CARATTERIZZAZIONE DI DIVERSE CULTIVAR DI FRUTTI

## Correlazione tra fenotipo e chemotipo



*Golden delicious*



mio-inositolo, carboidrati e acido succinico



*Red delicious*



triterpeni/steroli, flavonoidi, acidi fenolici, acido stearico, antociani e carboidrati.



*Fuji*



triterpeni/steroli, flavonoidi, acidi fenolici, acido stearico, antociani e carboidrati (glucosio e sorbitolo).

# LA METABOLOMICA PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI DELL'ADDOMESTICAMENTO DELLE PIANTE NEL CORSO DEI SECOLI

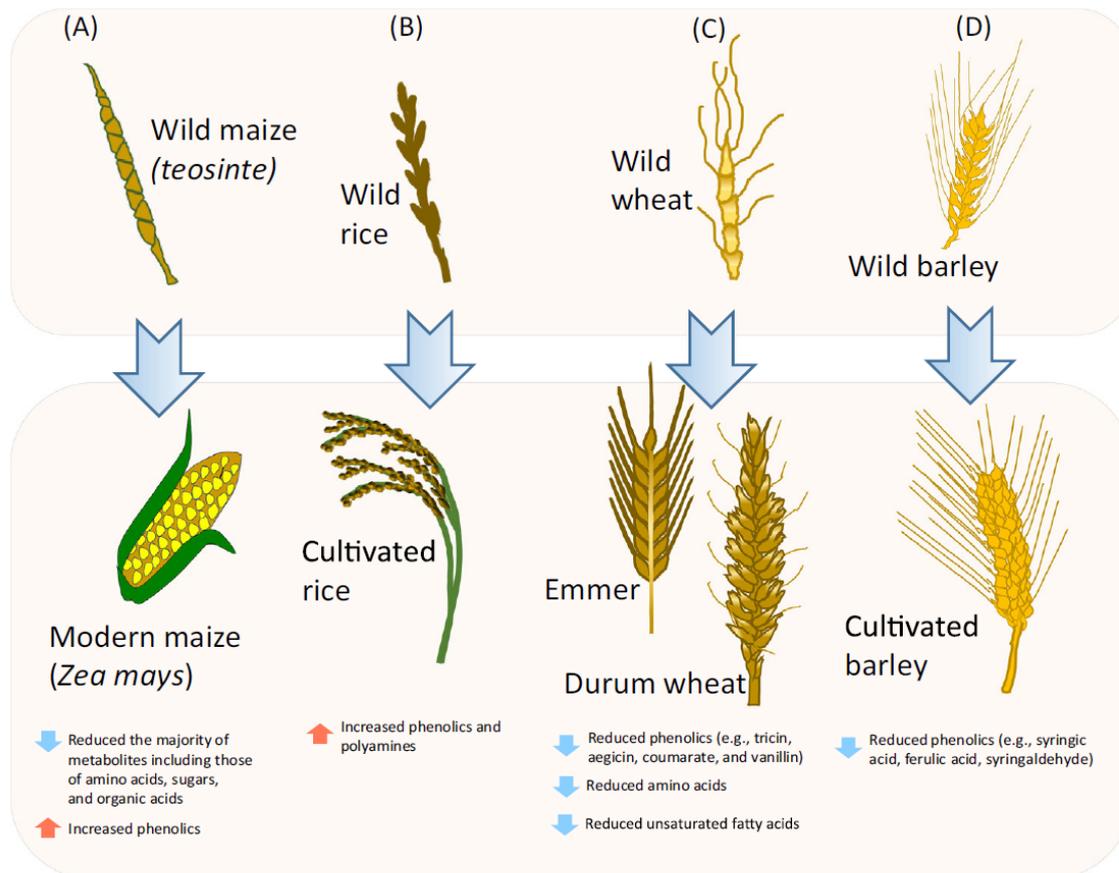
Le pratiche agronomiche di addomesticamento per aumentare la resa delle colture vegetali hanno portato ad una **riprogrammazione trascrizionale e metabolica** delle piante, spesso con perdita delle qualità nutrizionali.

## Esempi:

- riduzione dell'amaro in patata, pomodoro, e cetriolo
- acidità modificata nel melone dolce (*Cucumis melo var. cantalupo*), e nella mela (*Malus domestica*), nell'anguria (*Citrullus lanatus*), di seguito più dolci
- Colorazione negli agrumi, melone, pomodoro, mais, riso, orzo, soia, uva, mela
- Variazione nel contenuto di amido nel riso e dell'aroma di un'ampia gamma di colture tra cui pomodoro, peperone, cetriolo, Brassicaceae e cipolla (*Allium cepa*).

# LA METABOLOMICA PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI DELL'ADDOMESTICAMENTO DELLE PIANTE NEL CORSO DEI SECOLI

Cambiamenti metabolici in seguito ad addomesticamento e miglioramento dei principali cereali

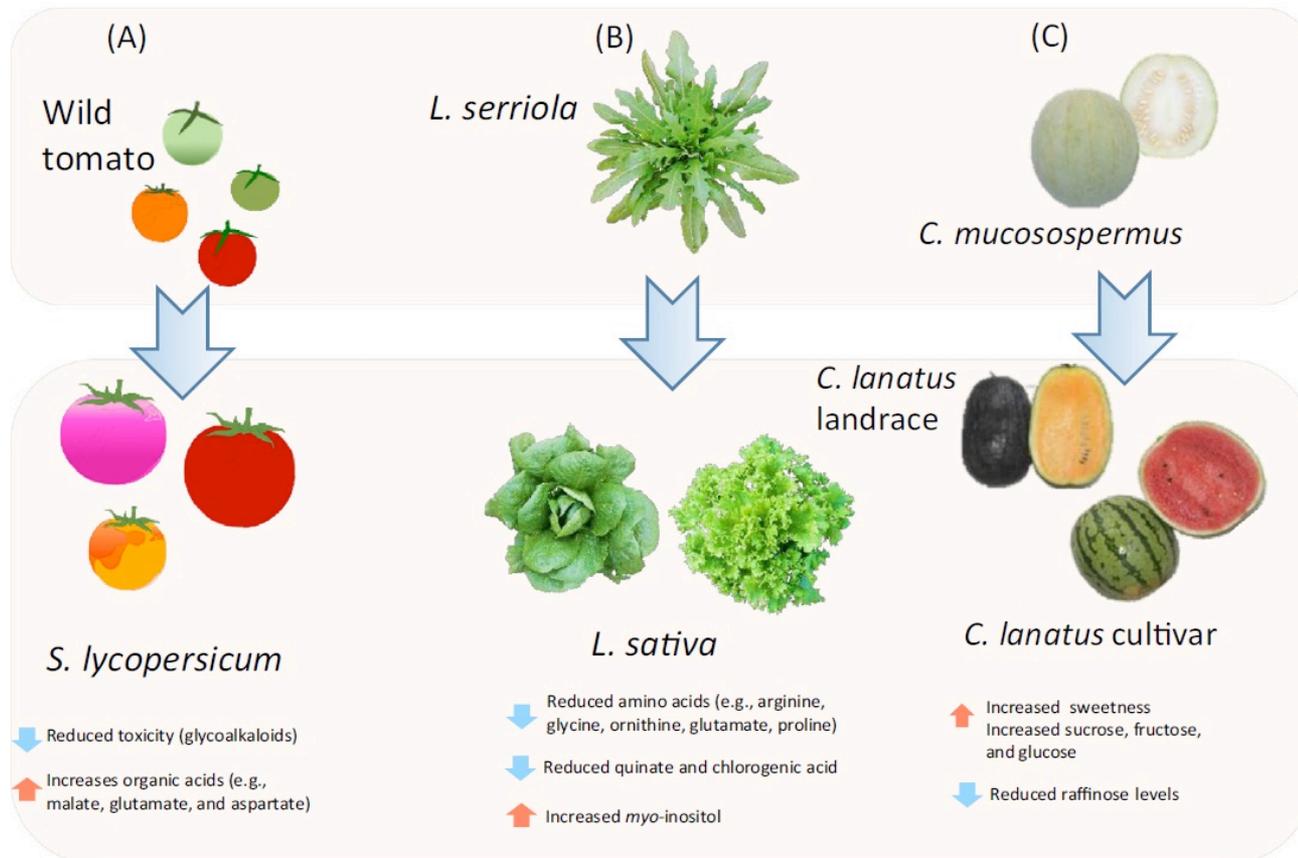


(A) mais, (B) riso, (C) frumento e (D) orzo

Trends in Plant Science

# LA METABOLOMICA PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI DELL'ADDOMESTICAMENTO DELLE PIANTE NEL CORSO DEI SECOLI

Alterazioni morfologiche e metaboliche legate all'addomesticamento di frutti e ortaggi: aumento del colore e delle dimensioni, introgressione di geni di resistenza, associate con perdita di fattori antinutrizionali e disfunzioni metaboliche



# LA METABOLOMICA PER STUDIARE L'INTERO SPETTRO BIOCHIMICO DELLA NOSTRA DIETA



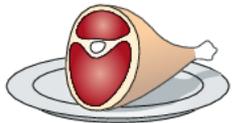
La comprensione di come la dieta influisce sulla salute è limitata a **150 componenti nutrizionali** chiave che sono monitorati e catalogati dal Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti (USDA) e da altri database nazionali.

Sebbene questa conoscenza abbia svelato il ruolo di calorie, zuccheri, grassi, vitamine e altri fattori nutrizionali nella genesi di malattie comuni, tali componenti nutrizionali rappresentano solo una piccola frazione delle oltre **26.000 sostanze biochimiche distinte** e definibili presenti nei nostri alimenti, molti dei quali hanno effetti documentati sulla salute ma rimangono non quantificati in modo sistematico tra i diversi alimenti.

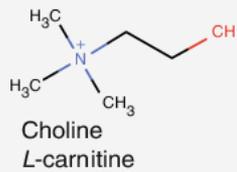
Utilizzando la metabolomica e nuove banche dati sarà possibile aprire nuove strade per comprendere la composizione di ciò che mangiamo e come il cibo influisce sulla salute e malattia.

# The unmapped chemical complexity of our diet

Albert-László Barabási<sup>1,2,3\*</sup>, Giulia Menichetti<sup>1</sup> and Joseph Loscalzo<sup>2</sup>

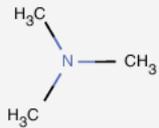


Red Meat: 78 nutrients in USDA



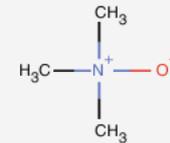
Gut bacteria

TMA



Liver

TMAO

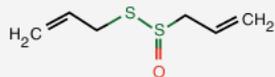


Heart disease

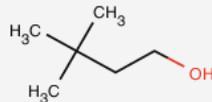


Garlic: 67 nutrients in USDA

Allicin



DMB



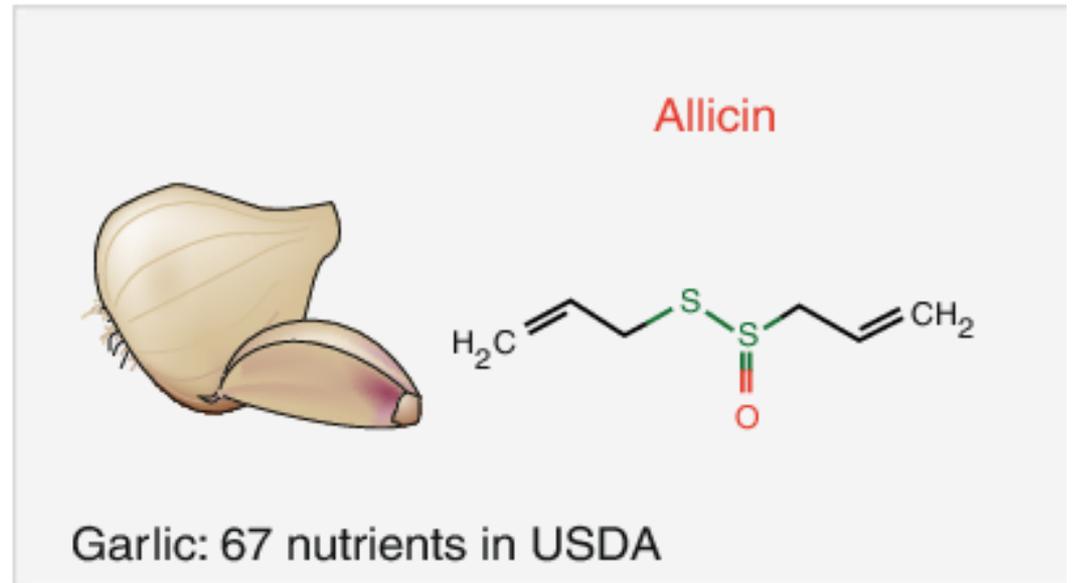
Of the six chemicals involved in this pathway, only choline is reported by nutritional studies. The other five are undetected.

Untracked biochemicals and their health implications

# THE DARK MATTER OF NUTRITION

---

- **37** componenti nutrizionali dell'aglio hanno un ruolo sulla salute umana secondo il Comparative Toxicogenomics Database (CTD).
- L'aglio trasporta le vitamine B1, B6 e C e i minerali manganese, rame, selenio e calcio, nutrienti la cui carenza o eccesso è collegata a malattie come il diabete di tipo 2, il morbo di Parkinson e le cardiomiopatie.



- **485** delle sostanze chimiche attualmente non quantificate nell'aglio possono anche essere collegate a molteplici effetti terapeutici, come l'azione protettiva dell'allicina nelle malattie cardiovascolari

## PARALLELISMI

C'è un notevole parallelismo tra la biologia pre-genomica e l'attuale comprensione delle implicazioni della dieta sulla salute.

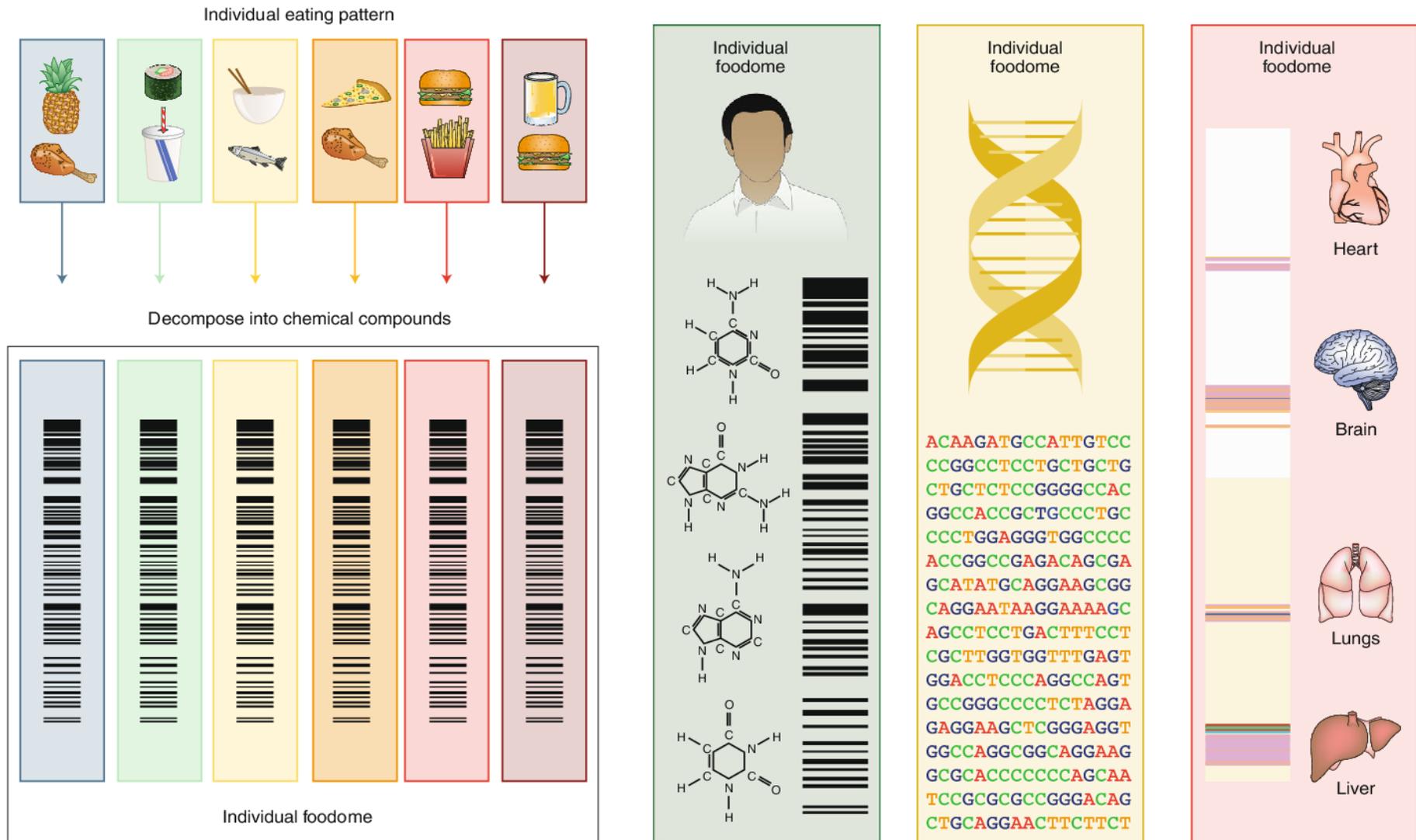
Negli anni '80, i detrattori del Progetto Genoma Umano hanno stabilito che solo le regioni codificanti, che rappresentano **l'1,4%** di tutte le coppie di basi nel nostro DNA, valgono il costo della decodifica, etichettando il restante **98,6%** come "DNA spazzatura".

Eppure, oggi si stima che il 66% delle varianti portatrici di malattie si trovi, di fatto, in queste regioni non codificanti.

Allo stesso modo, i **150** componenti nutrizionali tracciati nelle tabelle di composizione degli alimenti rappresentano circa lo **0,5% dei 26.625** composti chimici documentati negli alimenti.

Oltre il **99%** delle sostanze biochimiche presenti negli alimenti, non sono presenti nei database, e le implicazioni sulla salute di questa materia oscura nutrizionale in gran parte inesplorata rimangono in gran parte sconosciute.

# Linking the diet to the genome and disease



I modelli alimentari quotidiani definiscono un **codice a barre biochimico univoco**, che rappresenta la descrizione ad alta risoluzione delle caratteristiche biochimiche di ogni individuo risultanti dall'interazione del genoma con la dieta.