

“Le particelle materiali isolate sono astrazioni,
le loro proprietà sono definibili ed osservabili
solo attraverso le loro interazioni
con gli altri sistemi”

Bohr *Atomic Theory and the Description of Nature*, 1934

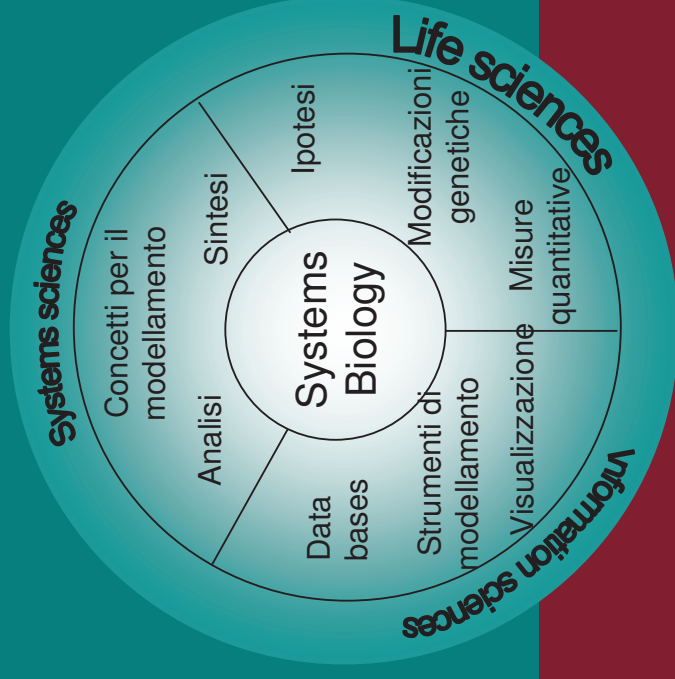
ARISTOTELE: “Il tutto non è rappresentato dalla somma delle sue componenti”

Il comportamento di un sistema complesso non si può predire in base alle sole proprietà delle sue componenti.

Esistono proprietà "emergenti"

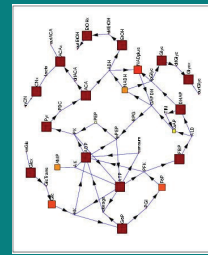
Systems biology

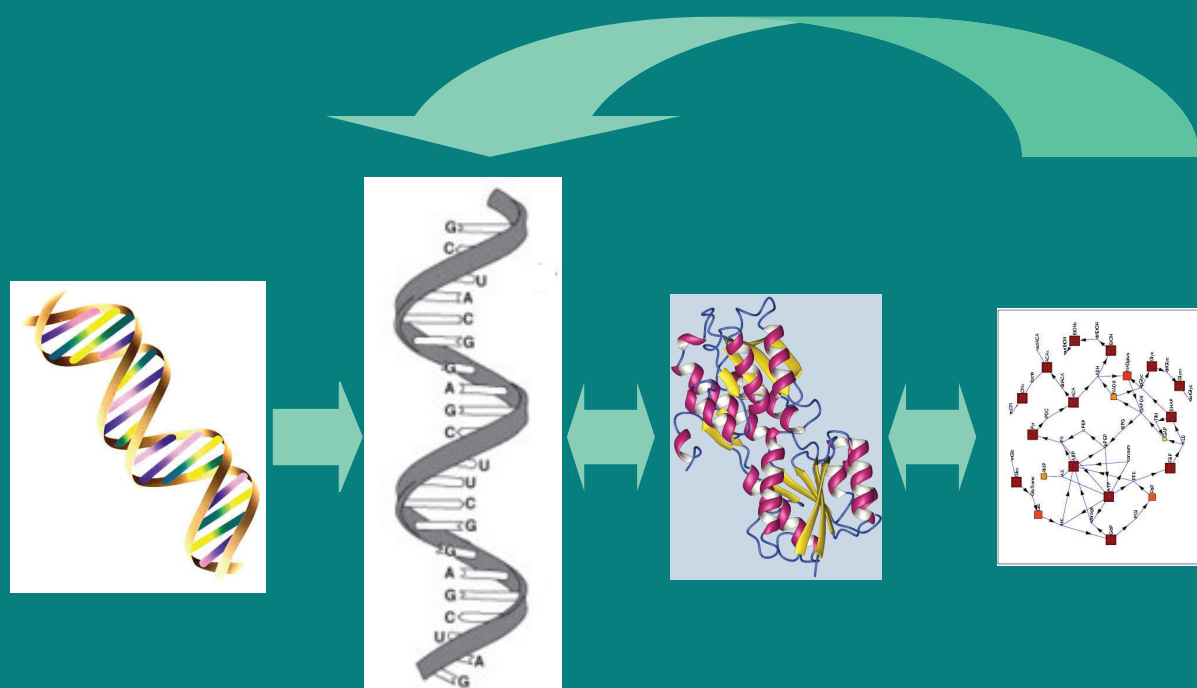
Lo **scopo** è seguire tutti i processi biologici attivi come un sistema integrato e così estrarre l'informazione biochimica latente. Tale informazione ha valore sia diagnostico che prognostico, in quanto riflette i reali processi biologici in corso piuttosto che i potenziali.



Modeling

- **Top down** (guidato dai dati):
 - Inizia con misure sperimentali del sistema su grande scala, caratterizzando il fenomeno di interesse (ad esempio, una malattia).
 - Il sistema è successivamente decomposto in sottosistemi.
- **Bottom up** (guidato dall'ipotesi):
 - Inizia dai componenti più basilari del sistema e da un'ipotesi su come sono legati insieme.
 - Vengono integrati uno alla volta in un modello del sistema, usando dati sperimentali, la letteratura, e metodi di fitting dei dati.





La determinazione dei metaboliti di un sistema biologico definisce il suo **metaboloma**, in altre parole la sua impronta metabolica, che permette di identificare e di seguire dinamicamente la sua crescita e/o la sua risposta agli stimoli ambientali.

Possono, dunque, essere monitorati i cambiamenti nei livelli dei metaboliti dovuti ad espressioni di geni alterati, ottenendo informazioni sulle conseguenze della modifica genetica sulla cellula.

La tecnica usata per caratterizzare i cambiamenti nel metaboloma della cellula è la **metabonomica**.

*“La **metabonomica** è la misura quantitativa della risposta metabolica, multiparametrica e correlata con il tempo che il sistema vivente dà a stimoli patofisiologici ed a modificazioni genetiche”.*

(J.K. Nicholson, 1999)

*“La **metabolomica** è la determinazione del set completo di metaboliti/intermedi a basso peso molecolare, dipendenti dal contesto, che variano a seconda dello stato fisiologico, evolutivo o patologico della cellula, tessuto, organo o organismo”*

(S. Oliver, 2002)

Tecniche di “Global Profiling”

- NMR
 - Soluzioni, stato solido, *in vivo*
 - Multi-nucleare (^1H , ^{13}C , ^{31}P ...)
 - Relativamente robusto
- GC- e LC-Massa
 - Sensibilità analitica elevata
 - Potenzialmente davvero globale
 - Problemi con la ionizzazione
- FT-IR
- Cromatografia su strato sottile
- ...

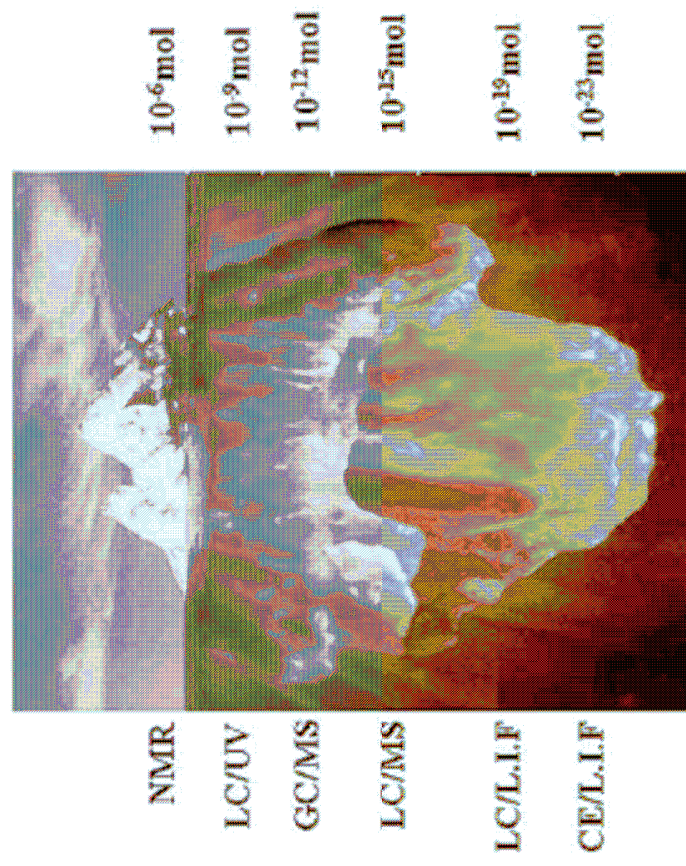


Fig. 3. A comparison of the relative sensitivities of various metabolomic tools. NMR has rapid analysis times but suffers from lower sensitivity thus allowing visualization only of the more concentrated metabolites (i.e. the tip of the iceberg). GC/MS and HPLC/MS provide good selectivity and sensitivity. CE/LIF (laser induced fluorescence) provides very high sensitivity but lower selectivity.

Gli spettri danno informazioni sul profilo metabolico.



I profili cambiano in risposta ai diversi input.

Seguire l'andamento di tali cambiamenti permette di capire il sito o il meccanismo del processo.

L'analisi multivariata degli spettri dà informazioni sullo spazio metabonomico.

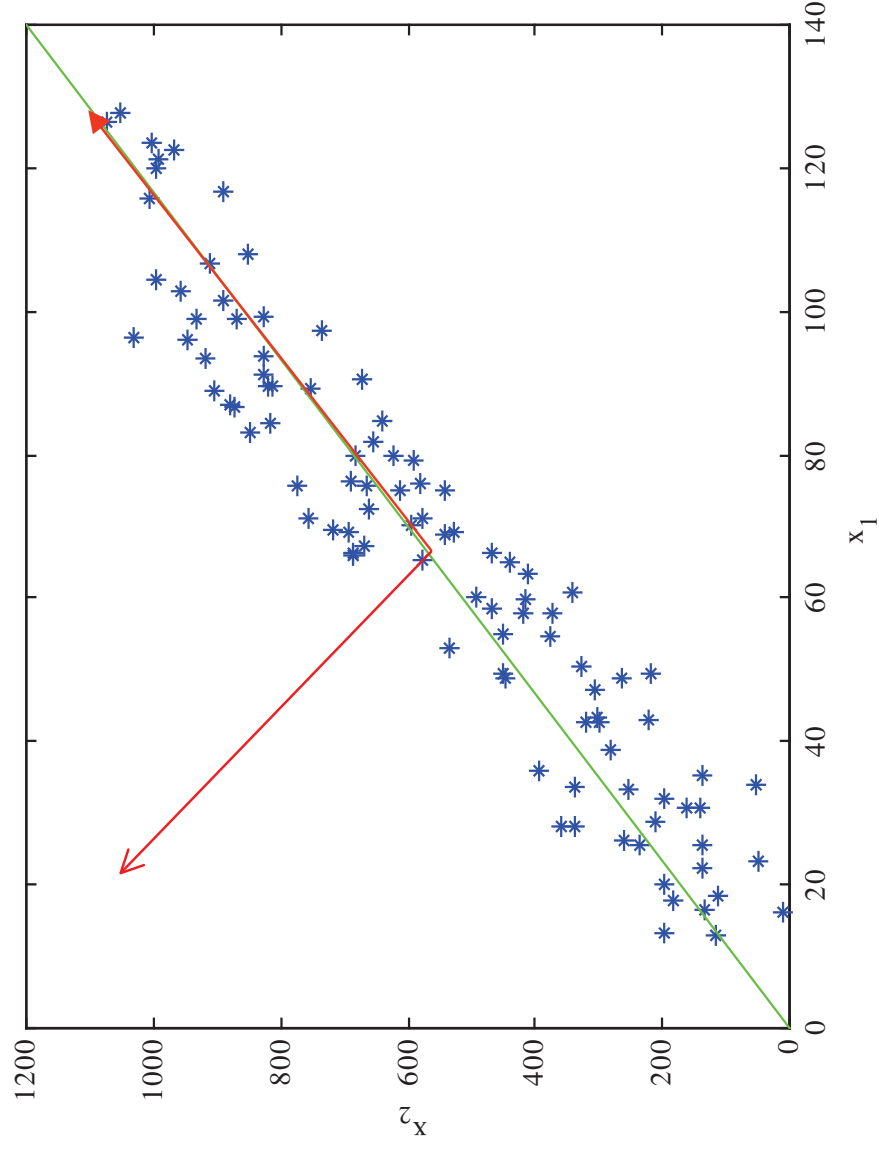


Regioni di questo spazio corrisponderanno a particolari profili metabolici.

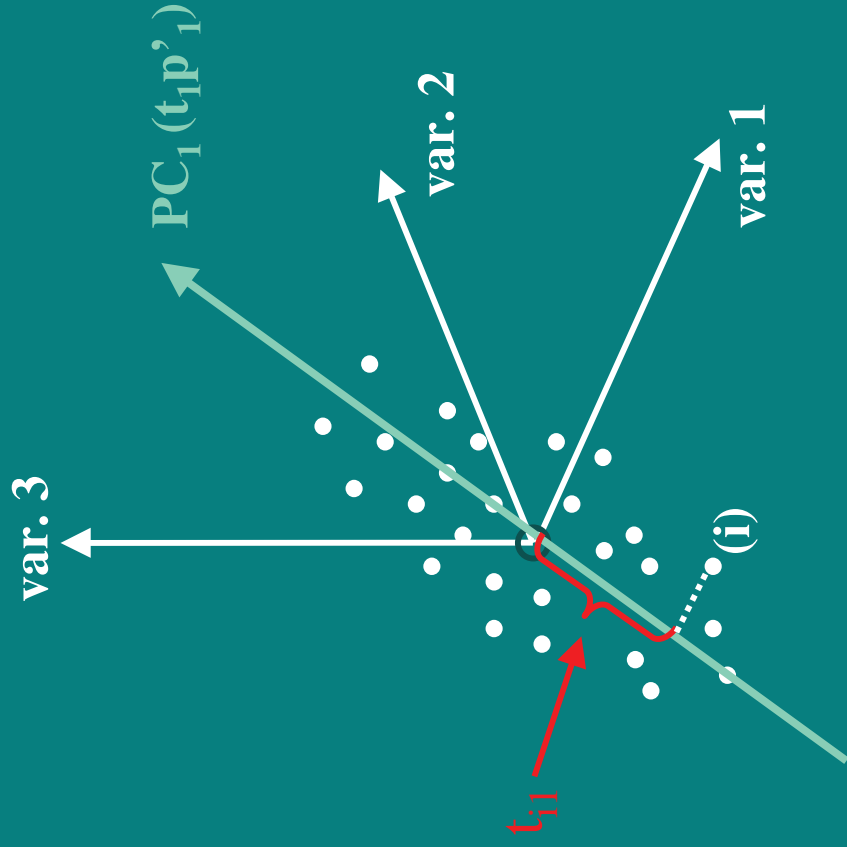
La struttura dello spazio può essere investigata per vedere raggruppamenti /partizionamenti dei dati in queste differenti regioni.

Campioni incogniti possono essere classificati a seconda delle regioni in cui cadono.

Dimensionalità 2 Variabili - 1 Dimensione



PCA – step by step

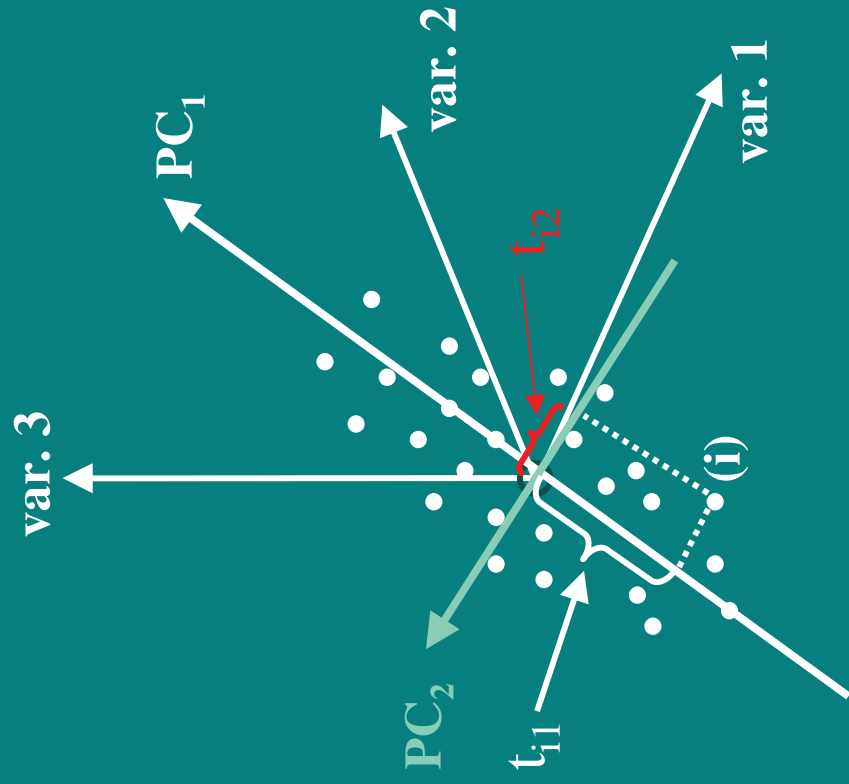


La prima Componente Principale (PC_1) è definita in modo da descrivere la maggiore variazione nei dati, che è la stessa direzione in cui i punti si disperdono di più nello spazio delle variabili.

Lo **Score** (t_{i1}) per il punto i è la distanza della proiezione del punto sulla 1^a componente dall'origine.

PC_1 dunque è la prima variabile latente in un nuovo sistema di coordinate che descrive la variazione nei dati.

PCA – step by step



La seconda Componente Principale (PC_2) è definita in modo da descrivere la maggiore variazione nei dati, perpendicolare (ortogonale) alla 1^a componente.

Lo **Score** (t_{i2}) per il punto i è la distanza della proiezione del punto sulla 2^a componente dall'origine.

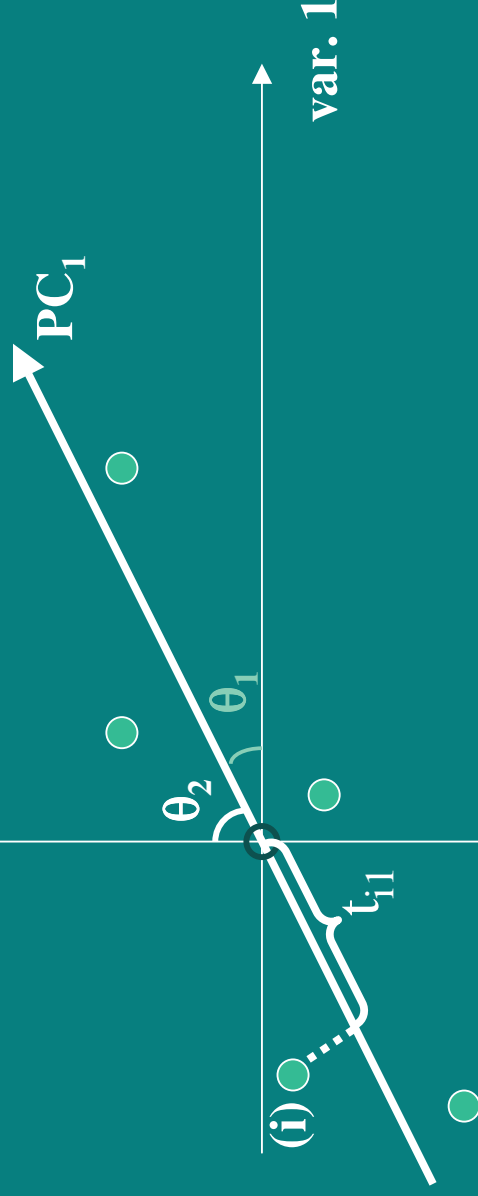
PCA – step by step

var. 2
↑
Il *loading* (p) descrive l'importanza della variabile originale nella PC, ossia la somiglianza nella direzione tra la variabile originale e la PC.

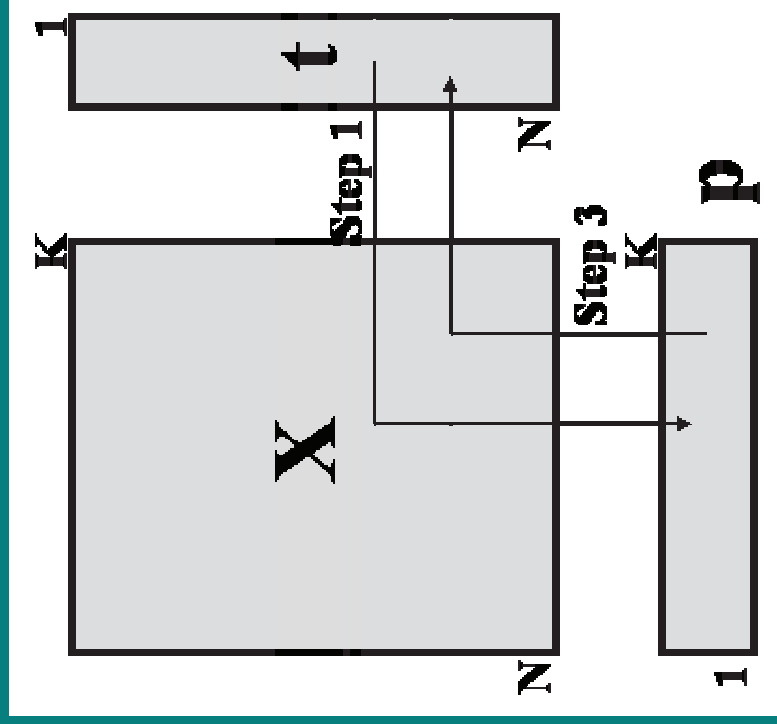
Il loading è descritto dal coseno dell'angolo tra la variabile originale e la PC.

$$p = \cos \theta$$

$$\sum p_i^2 = 1$$



PCA in formule



Modello di X:

$$X = T^* P^T = t_1^* p_1^T + t_2^* p_2^T + \dots + E$$

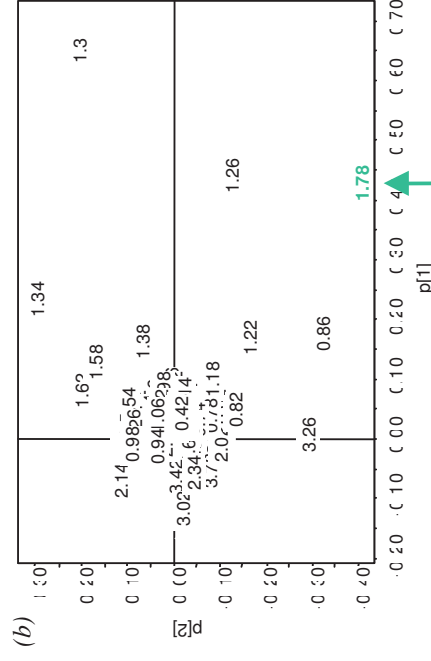
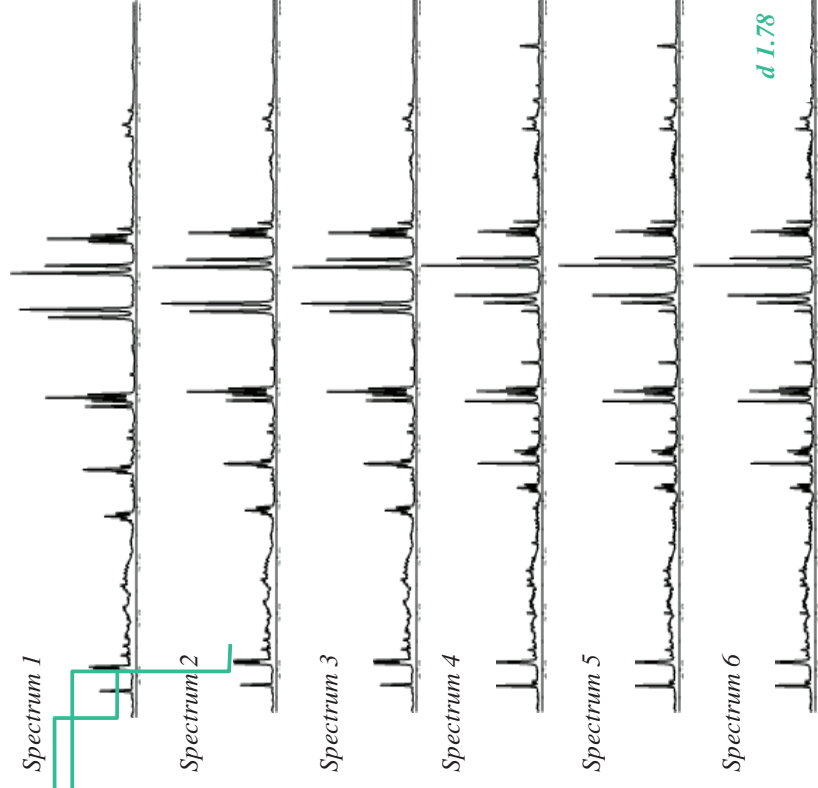
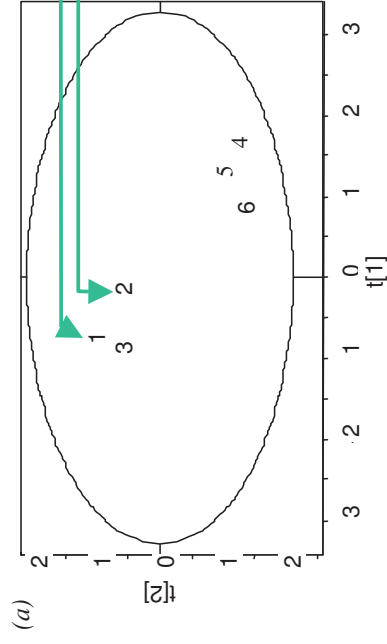
X matrice unità/variabili;

T score vector;

P loading vector.

PCA

scores plot



loadings plot

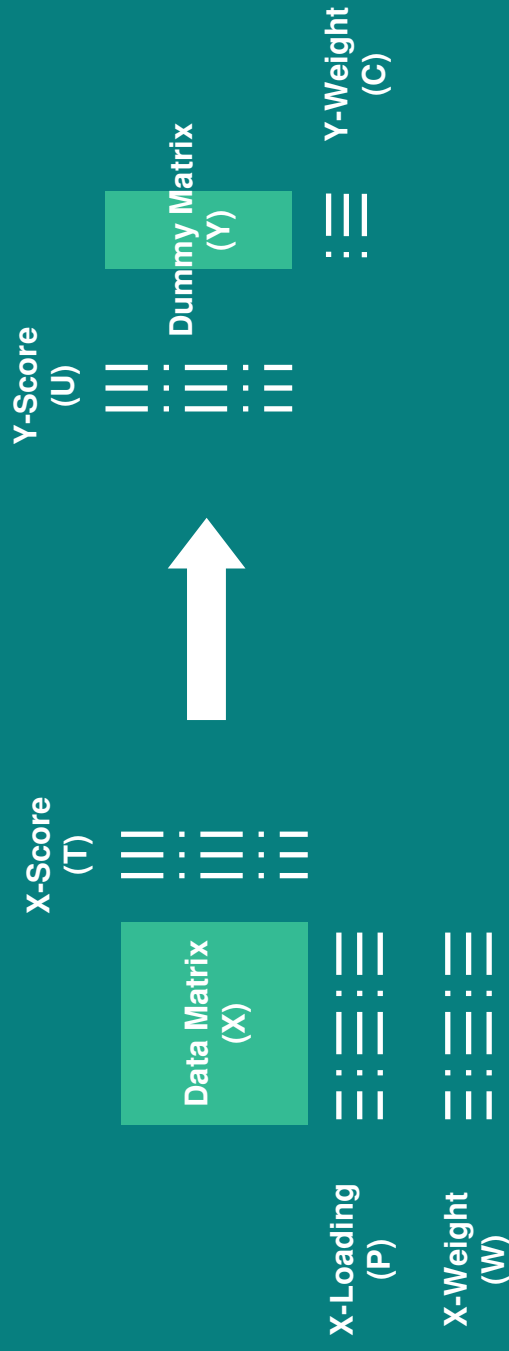
PLS-DA:



Il **blocco X** è una matrice che contiene gli **spettri NMR parcellizzati**, mentre il **blocco Y** è una matrice che contiene informazioni sul **gruppo** a cui ogni campione appartiene.



A schematic representation of PLS-DA:



where:

X-score (T), the coordinates of the samples in the hyper plane of the X-space;

Y-score (U), the coordinates of the samples in the hyper plane of the Y-space;

X-Loading (P), the correlation of the principal component, obtained by PCA performed on the X block, with the original variable;

X-weight (W), the correlation of the PLS component with the original variable;

Y-weight (C), the weights used to combine the Y's to form the scores U.

Scelta del numero di variabili latenti

Scelta del metodo di validazione (es. **leave-one-out**)

Il protocollo si compone delle seguenti fasi:

- Preparazione/Estrazione del campione

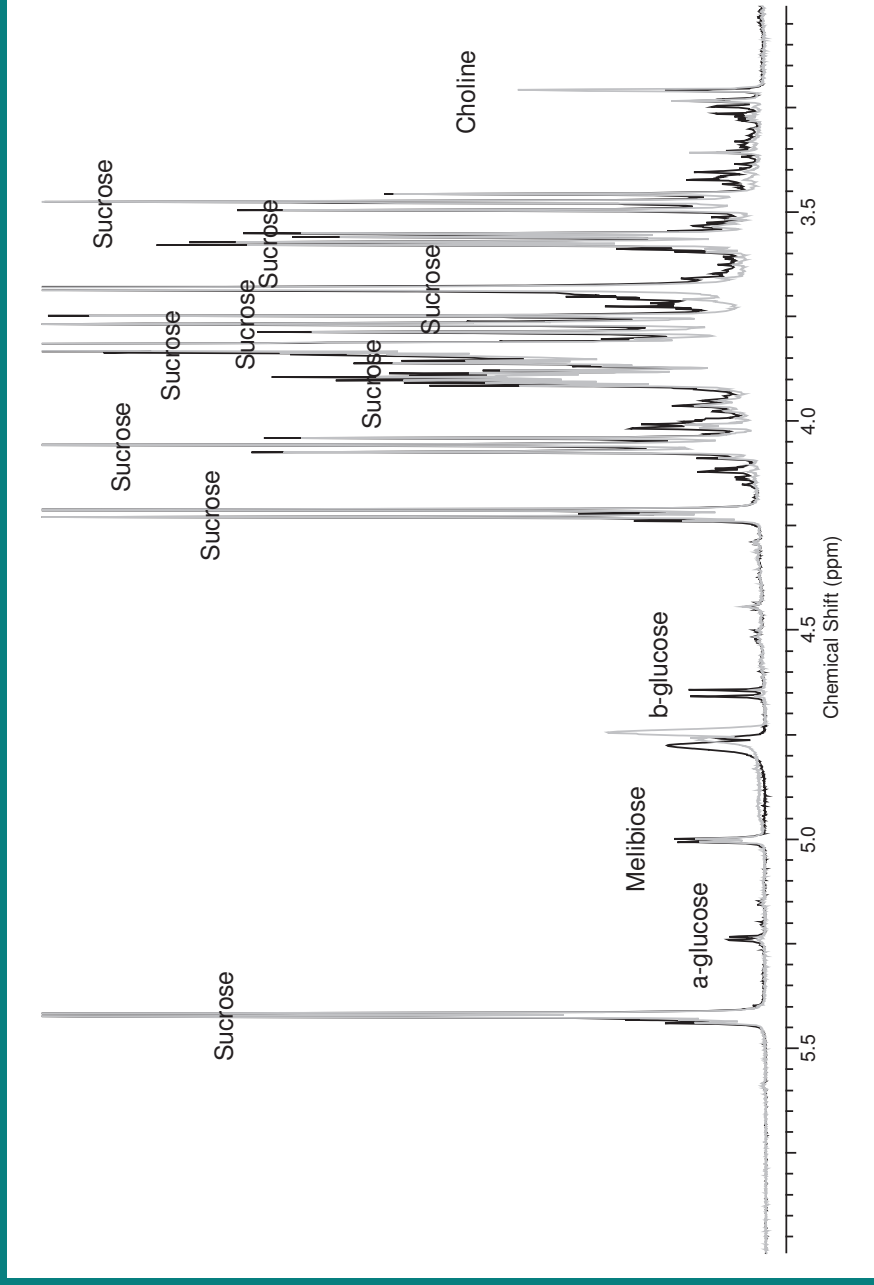
- Acquisizione degli spettri

- Analisi multivariata

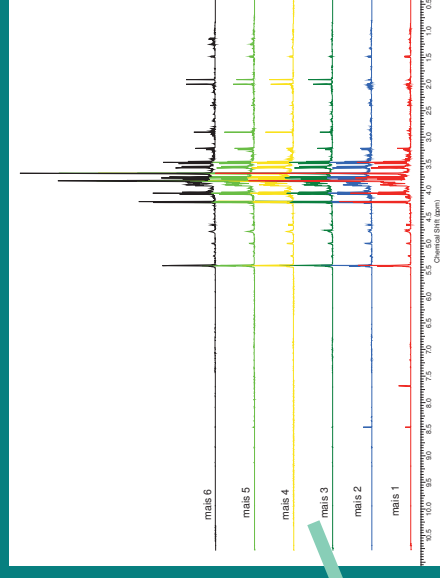
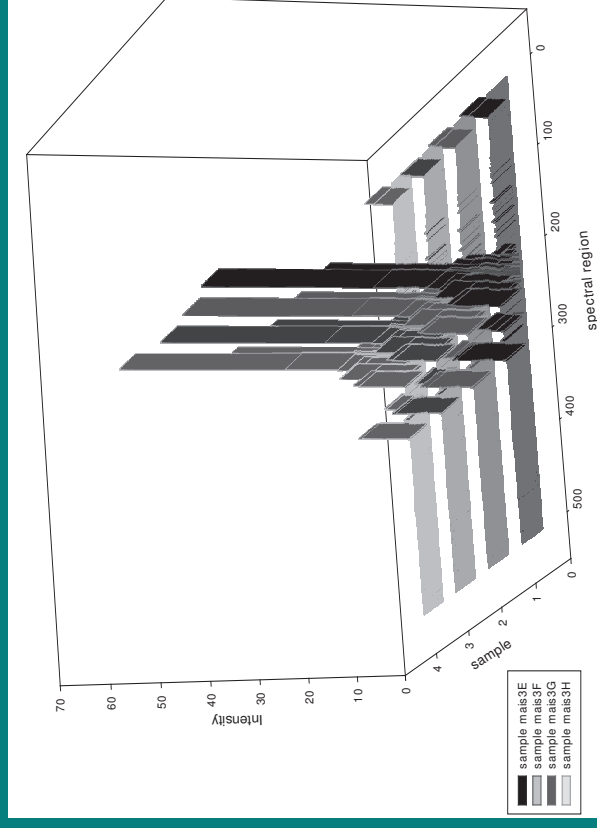
Analisi multivariata dei dati sperimentali:

- Classificazione;
- Raccordo tra classificazione e *metabolic insight*:
individuazione dei metaboliti chiave nella risposta del
sistema alla perturbazione;
- *Metabolic insight*.

Spettro



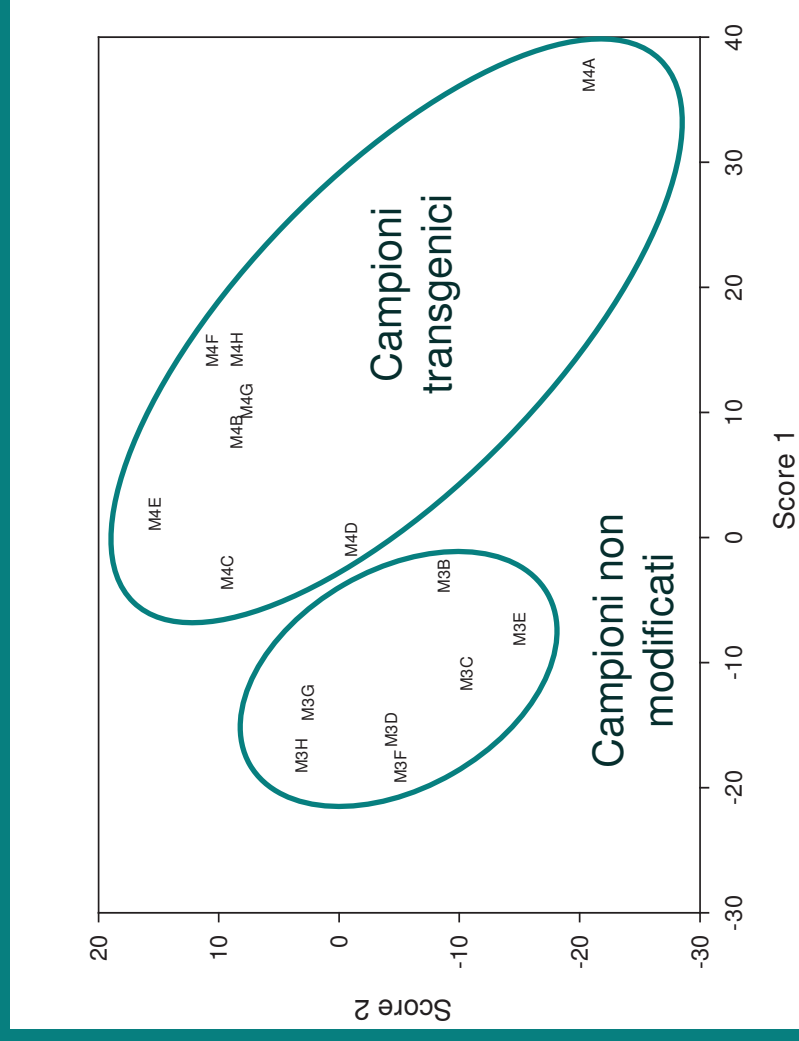
Pre-processamento spettrale :



unità

variabili

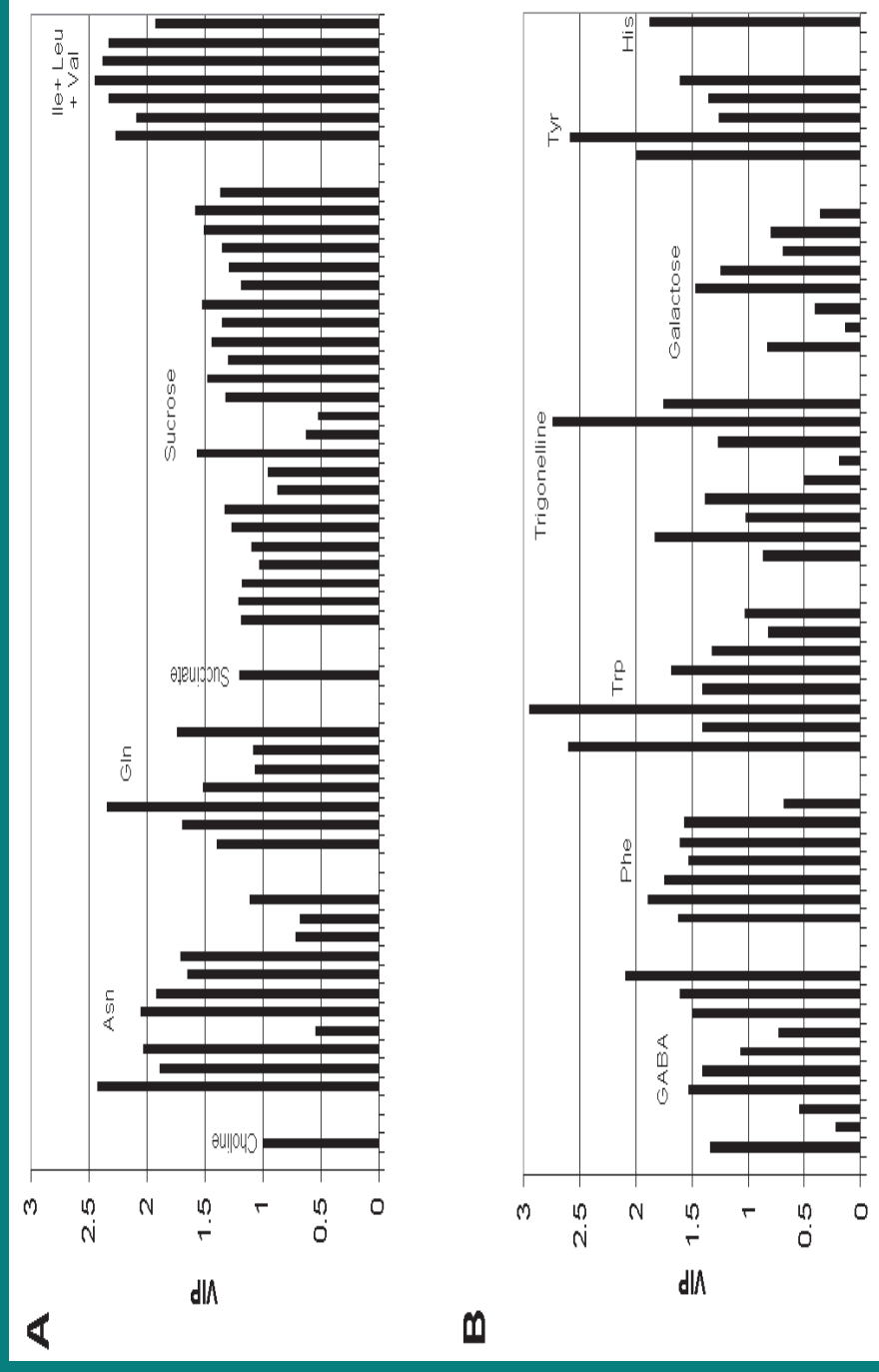
Applicazione della PLS-DA



Metaboliti che risultano importanti per la discriminazione: Colina, Asparagina, Istidina, Trigonellina.

È stato possibile riconoscere e classificare semi di mais incogniti a seconda delle loro modificazioni genetiche

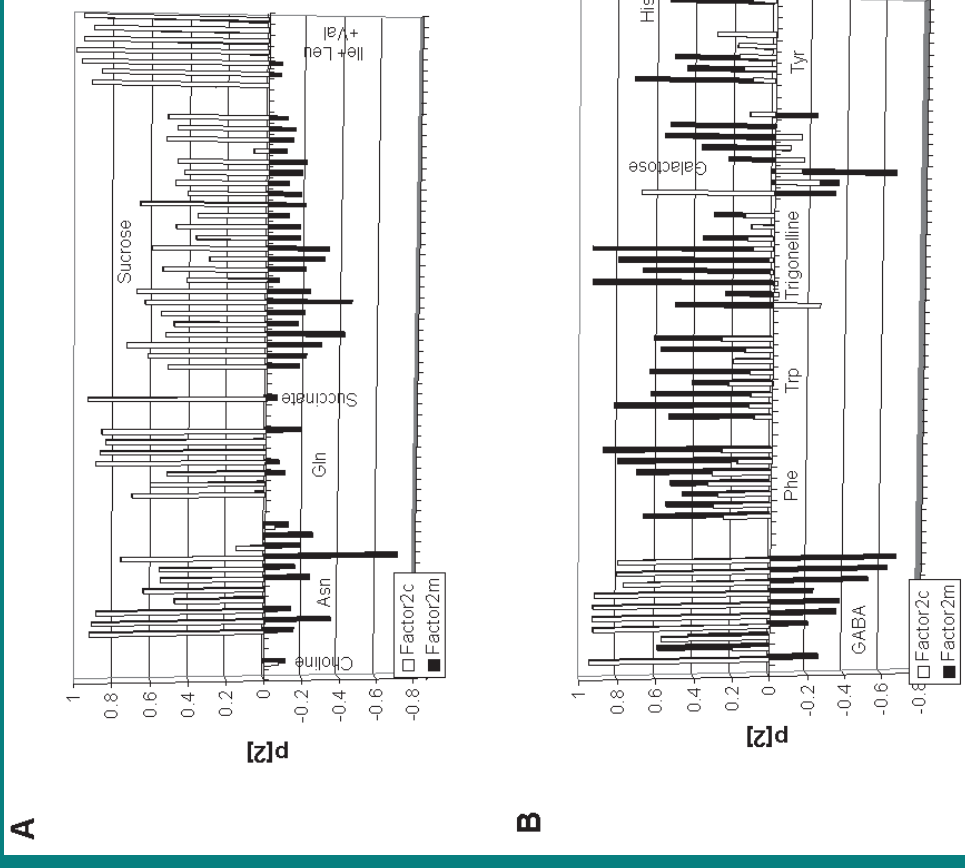
Raccordo tra classificazione e metabolic insight.



Variable Importance for Projection (VIP) Wold (1994).

Metabolic insight.

Grafico del valore del loading dei buckets corrispondenti ai metaboliti VIP (Controllo Bianco/Modificato Nero)



Origine della correlazione

- **Equilibrio:** due metaboliti in equilibrio chimico;
- **La presenza di un enzima in comune:** se una coppia di metaboliti è controllata essenzialmente da un singolo enzima, allora saranno correlati, indipendentemente da quanto vicini siano nella mappa metabolica.

