

Roberta Paolillo, Nicola Boccella, Stefania D'Apice, Giovanni Esposito, Cinzia Perrino

Limiti e potenzialità dell'analisi combinata epigenetica e trascrizionale su ampia scala per individuare obiettivi terapeutici nelle malattie cardiovascolari

Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate, Università Federico II, Napoli

RIASSUNTO. Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morbidità e mortalità nelle società industrializzate di tutto il mondo. Data la complessa fisiopatologia delle patologie cardiovascolari, un approccio sperimentale in grado di identificare molteplici vie di segnalazione attivate nel cuore potrebbe essere particolarmente efficace nella ricerca di nuovi obiettivi diagnostici, prognostici o terapeutici. Tecniche di ultima generazione consentono indagini ad alta risoluzione su tutto il genoma, il proteoma ed il metaboloma cellulare, nonché sulle modificazioni epigenetiche ed i profili di espressione genica associati. In particolare, l'integrazione di dati epigenetici e trascrizionali nel cuore normale o patologico rappresenta un approccio promettente per identificare le reti molecolari attivate dalle malattie cardiovascolari. Tali metodiche, seppur promettenti ed innovative, possono presentare numerose limitazioni tecniche ed analitiche. In questo lavoro saranno evidenziati brevemente tali aspetti e le possibili strategie per ottimizzare la ricerca di nuovi bersagli terapeutici per le patologie cardiovascolari nell'era post-genomica.

Parole chiave: epigenetica, trascrizione, scompenso cardiaco, malattie cardiovascolari, omics.

ABSTRACT. LIGHTS AND SHADOWS OF COMBINED EPIGENOMIC AND TRANSCRIPTOMIC PROFILING TO IDENTIFY NOVEL DIAGNOSTIC, PROGNOSTIC OR THERAPEUTIC TARGETS FOR CARDIOVASCULAR DISEASES. Cardiovascular diseases are the major cause of morbidity and mortality worldwide. Given the complex pathophysiology of cardiovascular diseases, an experimental approach capable of identifying multiple signaling networks activated in the heart upon pathological conditions could be particularly effective to identify new diagnostic, prognostic or therapeutic targets. Latest generation techniques now allow high-resolution investigations of the entire genome, the proteome and the cellular metabolome, as well as epigenetic modifications and associated gene expression profiles. In particular, the integration of epigenomic and transcriptomic data in the normal or pathological heart is a promising approach to identify novel molecular targets. These methods, although promising and innovative, can present several technical and analytical pitfalls. Here we will briefly describe these aspects and possible strategies to optimize the search for new diagnostic or therapeutic targets for cardiovascular diseases in the post-genomic era.

Key words: epigenetic, transcriptomic, omics, heart failure, cardiovascular diseases.

1. Introduzione

Dopo il completamento del Progetto Genoma Umano (1) è stato compiuto un enorme sforzo attraverso gli studi di genetica, genomica e genomica funzionale per determinare come questa enorme quantità di dati potesse essere collegata a un fenotipo cardiaco sano o patologico (2). Essendo le patologie cardiovascolari multifattoriali, numerosi meccanismi addizionali relativi alla regolazione epigenetica, trascrizionale, del proteoma o del metaboloma potrebbero essere cruciali per determinare il fenotipo patologico (per un glossario dei termini, vedere Tabella I). L'utilizzo di tecniche "omics" per caratterizzare tali sistemi su ampia scala è uno strumento estremamente potente ed efficace per migliorare la comprensione dei meccanismi molecolari della progressione del cuore sano verso lo scompenso cardiaco e per migliorare la prognosi di questi pazienti.

Rispetto ad un tradizionale metodo scientifico di tipo riduzionistico, secondo cui i complessi fenomeni biologici possono essere studiati semplificando al massimo il sistema e focalizzando l'attenzione su specifici aspetti molecolari, secondo il metodo olistico adottato con l'utilizzo delle tecnologie su ampia scala, è possibile sondare contemporaneamente un enorme numero di elementi nel sistema sperimentale in analisi. Pertanto, mentre nel metodo riduzionistico la ricerca scientifica viene eseguita verificando delle ipotesi formulate in precedenza (hypothesis-driven research), secondo il metodo olistico lo studio del sistema viene eseguito senza formulare alcuna ipotesi preliminare su specifici geni/RNA/proteine/metaboliti potenzialmente responsabili di uno specifico fenotipo (Figura 1). Il principale vantaggio del secondo metodo di ricerca è legato alla maggiore possibilità di identificare nuovi (ed eventualmente sconosciuti) obiettivi molecolari.

Insieme a queste brillanti prospettive, tali tecniche innovative rappresentano anche una nuova e grande sfida. La raccolta, analisi ed interpretazione dell'ampia mole di dati ottenuta (Big Data) richiede solitamente un'attenta e complessa analisi bioinformatica, attrezzature costose e l'integrazione di molteplici professionalità (medico, biologo, ingegnere, informatico, biostatistico, etc.). In particolare, l'integrazione di dati provenienti da molteplici piattaforme di studio (per esempio epigenomica ed analisi

Tabella I. *Glossario dei termini*

Termine	Definizione
Genetica	Studio di specifici geni e del loro ruolo nell'ereditarietà
Genomica	Studio di tutti i geni, delle loro funzioni e degli effetti biologici
Genomica funzionale	Studio dei cambiamenti nei prodotti genici e come questi cambiamenti mediano la funzione biologica in condizioni normali o patologiche
Genomica comparativa	Studio per confrontare i geni di un organismo con quelli di un altro
Epigenetica	Studio di processi che portano a cambiamenti ereditabili nell'espressione genica senza cambiamenti nella sequenza del DNA
Epigenomica	Studio delle modificazioni epigenetiche attraverso il genoma
Metabolomica	Studio di tutti i metaboliti in un determinato stato biologico
Proteomica	Studio del set completo di proteine all'interno di un campione biologico.
Trascrittoma	Studio del set completo di RNA che sono prodotti dal genoma
Omics	Suffisso aggiunto per indicare studi condotti su scala ampia

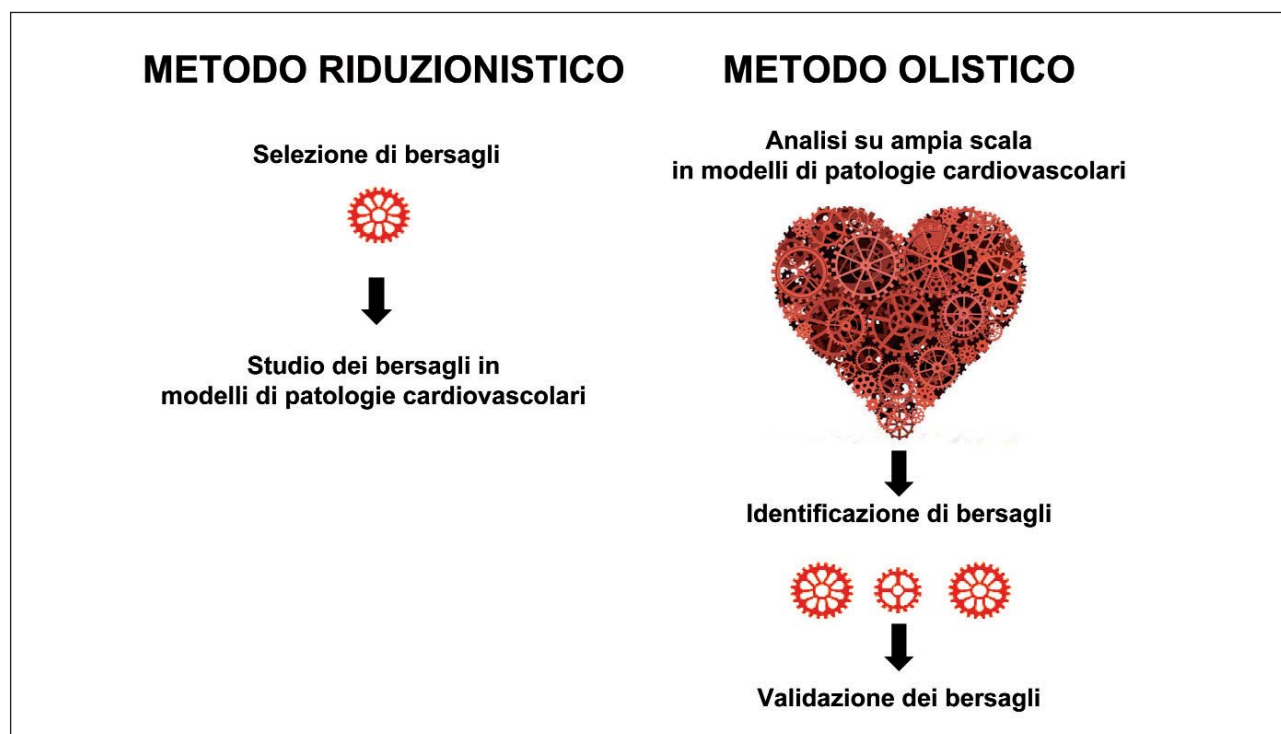


Figura 1

della trascrizione) se da un lato rafforza notevolmente il valore scientifico dei dati ottenuti, d'altro canto presenta delle notevoli difficoltà metodologiche ed analitiche (3). In questo articolo saranno brevemente discussi i vantaggi e gli svantaggi dell'esecuzione di tali studi in ambito cardiovascolare e le potenziali ricadute cliniche di tali applicazioni.

2. Importanza dello studio della trascrizione nel cuore

Con l'introduzione e la diffusione delle tecniche di sequenziamento di ultima generazione, è stato possibile effettuare numerosi studi della trascrizione su ampia scala in campioni cardiaci. Per esempio, gli studi di trascrittomica

in modelli animali di ischemia e riperfusione del miocardio ed insufficienza cardiaca ischemica hanno chiaramente dimostrato l'importanza dell'espressione alterata di geni coinvolti nel metabolismo cardiaco, nella crescita e sopravvivenza cellulare, nell'infiammazione, nella struttura del citoscheletro e nel rimodellamento della matrice extracellulare (4). Questi risultati sono stati confermati da numerosi lavori che dimostrano che il condizionamento ischemico innesca un profilo di espressione genica cardioprotettiva nel cuore a livello trascrizionale (2). In condizioni di ischemia, oltre al cambiamento trascrizionale indotto nella regione ischemica, anche il tessuto miocardico "a distanza" non ischemico può subire modifiche del profilo di espressione genica globale del cuore e tali modifiche possono essere responsabili del rimodellamento car-

diaco post-ischemico (5). L'identificazione del profilo di espressione genico globale del cuore in seguito a vari stimoli patologici può aiutare a identificare i principali segnali cardioprotettivi da usare come obiettivi terapeutici, ad es. mediante terapia genica o quelli promotori di aspetti patologici, da neutralizzare o inibire (6).

3. Ruolo dei meccanismi epigenetici nella regolazione della trascrizione nel cuore

Numerosi meccanismi molecolari contribuiscono alla regolazione dell'espressione genica, principalmente l'interazione tra proteine regolatorie (fattori trascrizionali e co-regolatori), specifici tratti del DNA in regioni del gene deputate al controllo dell'espressione e la conformazione stessa della cromatina. Nel corso degli ultimi decenni è apparso evidente come le modifiche epigenetiche possano contribuire in modo determinante alla regolazione dell'espressione genica. Inizialmente, Conrad H. Waddington definì l'epigenetica come qualcosa "al sopra o in aggiunta alla genetica" per spiegare la differenziazione cellulare. Successivamente, l'epigenetica è stata definita come un insieme di modifiche ereditabili dell'espressione genica in assenza di differenze della sequenza del DNA. Tali effetti possono essere indotti da vari meccanismi, tra cui: a) modifiche degli istoni; b) modifiche del DNA; c) regolazione della conformazione della cromatina; d) effetti di RNA non codificanti. L'analisi combinata su ampia scala delle modifiche epigenetiche e del profilo trascrizionale fornisce la possibilità di analizzare in dettaglio i meccanismi responsabili dell'espressione genica in condizioni normali e patologiche, identificando snodi molecolari cruciali a scopo diagnostico o terapeutico.

Numerose modifiche post-traduzionali degli istoni sono state descritte in letteratura, con effetti diversi sulla trascrizione. Utilizzando una combinazione di immunoprecipitazione della cromatina e sequenziamento dell'intero del trascrittoma, è stato recentemente dimostrato che il sovraccarico di pressione nel topo promuove l'attivazione di alcuni geni e la repressione di altri e che tali modifiche trascrizionali sono frequentemente associate ad uno specifico assetto epigenetico di modifiche istoniche che promuovono o inibiscono la trascrizione (7,8). Questi ed altri studi dimostrano che, piuttosto che un singolo segnale molecolare, la combinazione di diverse modifiche istoniche contribuisce alla creazione di un codice epigenetico che facilita o inibisce la trascrizione del gene.

La metilazione del DNA è stata la prima modificazione epigenetica del DNA identificata ed anche una delle più studiate. Il processo consiste nel legame di un gruppo metile alla citosina (5mC) quando quest'ultima è seguita da una guanina nel dinucleotide CpG. A differenza delle modifiche istoniche, la metilazione del DNA è costantemente associata a silenziamento genico e, nel cuore, è un processo altamente dinamico nella crescita post-natale dei cardiomiociti e nell'adattamento al sovraccarico patologico (9). Studi recenti hanno inoltre dimostrato che un prodotto di ossidazione della 5mC, la 5-idrossimetilcitosina (5-hmC) controlla l'espressione dei cardiomiociti nel

corso della sviluppo embrionale ed in risposta a sovraccarichi patologici (10).

In campioni cardiaci di pazienti con scompenso cardiaco allo stadio terminale, sono stati identificate differenze nella metilazione del DNA e profili distinti di metilazione dell'istone H3 (11,12). In campioni di pazienti con cardiomiopatia dilatativa idiopatica sono state identificate differenze di metilazione in diversi geni correlati a malattie cardiache o con funzione sconosciuta (13,14). Inoltre, elementi ripetuti di DNA satellite sono stati trovati significativamente ipo-metilati nei cuori cardiomiopatici allo stadio terminale rispetto ai normali controlli sani (15). Queste evidenze suggeriscono un ruolo importante delle modificazioni epigenetiche nello scompenso cardiaco umano. Tuttavia, non è ancora chiaro se ed in che successione temporale tali modificazioni epigenetiche possano essere coinvolte nello sviluppo e nella progressione della disfunzione cardiaca e se la loro modulazione potrebbe migliorare il fenotipo.

4. Influenza dei fattori di rischio, comorbidità e del loro trattamento farmacologico

Diversi fattori di rischio, comorbidità e trattamenti farmacologici dei pazienti affetti da malattie cardiovascolari possono modulare il profilo di espressione genica del cuore. Per esempio, l'espressione di numerosi geni è stata alterata in cuori di ratto sottoposti ad una dieta ricca di colesterolo per 2 mesi (16), in topi sottoposti a dieta grassa (17) e in cani dopo 9 settimane di dieta ad alto contenuto di grassi. Nei cani alimentati con un cibo ricco di grassi per 9-24 settimane, è stata rilevata una diminuzione nel tempo dell'espressione di diversi geni implicati nelle patologie cardiache legate all'obesità, come ipertrofia e fibrosi (18). Sfortunatamente non sono disponibili dati umani rilevanti sull'effetto dei fattori di rischio cardiovascolare o delle varie comorbidità sui profili di espressione genica globale del cuore normale o patologico. Sebbene uno studio abbia dimostrato che il pattern di espressione genica dell'atrio umano è significativamente alterato nell'obesità (19), finora non sono disponibili dati su campioni ventricolari. Allo stesso modo, numerosi farmaci attualmente usati per trattare le comorbidità delle patologie cardiovascolari potrebbero modificare la risposta del cuore allo stress attraverso diversi meccanismi, incluso il cambiamento nel pattern di espressione genica cardiaca (20). L'identificazione di specifici profili epigenetici e trascrizionali associati a particolari condizioni potrebbe avere importanti futuri risvolti diagnostici, prognostici e terapeutici.

5. Prospettive e limitazioni degli studi epigenetici e trascrittomici su ampia scala

5.1 Prospettive

La caratterizzazione su ampia scala dell'epigenoma e del trascrittoma fornisce informazioni quantitative sui

cambiamenti epigenetici, sull'espressione genica e sulle varianti di splicing, consente di studiare tali variazioni nel cuore durante la progressione della malattia e in risposta a cambiamenti ambientali o trattamenti. Tali approcci forniscono grandi quantità di dati che possono essere usati per la valutazione imparziale dei processi fisiopatologici senza assunzioni a priori. L'analisi di questi dati ottenuta mediante complessi processi bioinformatici rappresenta una grande opportunità per i ricercatori per ottenere nuove importanti informazioni sui meccanismi alla base della risposta del cuore agli insulti e della progressione verso lo scompenso cardiaco. In contrasto con altri approcci mirati a identificare un singolo obiettivo molecolare, questa strategia consente di identificare molteplici obiettivi, a volte sconosciuti. Una volta identificate le reti cruciali, analisi più mirate su specifici meccanismi e bersagli possono offrire il potenziale per una diagnosi e prognosi rapida, test di sicurezza dei farmaci, selezione dei pazienti e stratificazione per le sperimentazioni cliniche. Oltre alle esperienze dei singoli centri, sono stati sviluppati consorzi internazionali per condividere i set di dati, risorse e protocolli, fornendo una grande quantità di informazioni, liberamente disponibili, che potrebbero aumentare in modo esponenziale nel prossimo futuro (21).

5.2 Limitazioni tecniche e sperimentali

I principali problemi tecnici legati all'utilizzo di queste metodiche sono l'eterogeneità dei campioni biologici, la qualità dell'RNA e del DNA (integrità e contaminazione) e l'insufficiente disponibilità di campioni cardiaci umani, in particolare da donatori sani. Data la relativa inaccessibilità del tessuto cardiaco umano, sangue intero o globuli bianchi sono stati considerati come possibili fonti alternative. La logica che supporta l'uso di questi campioni è quella che le cellule cardiache possano rilasciare RNA o DNA epigeneticamente modificato, o che le cellule del sangue potrebbero aver subito cambiamenti simili a quelli dei cardiomiociti (22). Per tali motivi, i modelli animali sono estremamente utili e preziosi, in quanto consentono lo studio dei meccanismi molecolari attivati dal sovraccarico patologico del cuore e la caratterizzazione del ruolo dei diversi tipi cellulari coinvolti. Tuttavia, differenze di espressione specie-specifiche sono state descritte in precedenza (23), ed anche in presenza di elevata omologia tra le specie, potrebbero esserci piccole ma significative differenze nelle vie intracellulari di trasduzione del segnale (24). Qualunque sia l'uso del metodo sperimentale, sarebbe ideale mettere a fuoco specifici tipi cellulari, piuttosto che tutto il tessuto, poiché i cambiamenti potrebbero essere piccoli e diluiti dalla presenza di cellule non colpite primariamente. A questo proposito, sarebbe fondamentale definire il bersaglio cellulare e descrivere i metodi di isolamento, caratterizzazione, di coltura ed eventualmente dei trattamenti, poiché potrebbero causare cambiamenti nell'espressione di RNA e dei profili epigenetici, influenzando così l'analisi (25). La maggior parte degli studi finora ha analizzato dati statici di espressione, come istantanee in diversi stati patologici. Al contrario, un approccio dinamico che descrive i cambiamenti nei profili di espressione in diversi punti temporali durante il corso di una malattia consentirebbe di for-

mulare nuove ipotesi biologiche (26). In generale, al fine di ridurre la variabilità tra i diversi studi, dovrebbero essere sempre impiegati metodi robusti e semplici, strumentazioni gold-standard e solo protocolli ampiamente validati per ottenere campioni di partenza ottimali.

5.3 Identificazione del bersaglio: importanza della bioinformatica

Un aspetto critico nella ricerca di nuovi obiettivi nell'era post-genomica probabilmente non è più la generazione di dati, ma piuttosto l'analisi dei dati e la loro interpretazione. Ciò richiede solitamente un lavoro di squadra interdisciplinare di medici, biologi, biochimici, bioinformatici e statistici. Le attività bioinformatiche includono lo sviluppo di algoritmi e statistiche per valutare le relazioni tra i membri di queste grandi serie di dati, la capacità di analizzare e interpretare diversi tipi di sequenze, domini e strutture e capacità di sviluppare o implementare strumenti che consentano un accesso e una gestione efficienti di diversi tipi di informazioni. Quindi, combinando concetti biologici con strumenti informatici o metodi statistici è possibile ipotizzare bersagli diagnostici, prognostici o terapeutici. Nonostante l'abbondanza di dati a livello trascrittomico ed epigenomico, c'è una sorprendente carenza di strumenti statistici mirati alla loro analisi integrata. Mentre più programmi e i servizi web sono disponibili per l'analisi dei dati omics singoli, la maggior parte di questi strumenti esegue solo un'attività specifica ed in genere richiede complesse conversioni di file. Per esplorare meglio e integrare più modalità di dati omics, sarebbe necessaria una semplificazione dei metodi bioinformatici. Per tali motivi, la ricerca collaborativa è solitamente la regola in questo campo e richiede una standardizzazione del formato dei dati e accesso possibile ai dati da più utenti sul web. La sicurezza e controllo appropriato dell'accesso ai dati, la protezione della privacy, la necessità di backup, problemi etici, la disponibilità in tempo reale e infine, la mobilità dei dati rappresentano ulteriori criticità di questa tipologia di ricerca.

5.4 Validazione del bersaglio

Dopo l'identificazione di bersagli attraverso strumenti bioinformatici, è essenziale la loro validazione sperimentale mediante l'utilizzo di sistemi cellulari in vitro e di modelli in vivo di patologia cardiovascolare (2,20). I bersagli identificati con l'analisi bioinformatica dovrebbero essere sempre validati, al fine di evitare la generazione di dati puramente descrittivi e previsioni speculative.

6. Conclusioni

L'integrazione degli studi epigenetici e di trascrizione su ampia scala rappresenta una notevole opportunità scientifica per migliorare la conoscenza dei fenomeni biologici e delle reti molecolari attivate nel cuore dai sovraccarichi di tipo patologico e per identificare nuovi bersagli molecolari. Tali metodiche, seppur promettenti ed innovative, possono presentare numerose limitazioni tecniche ed analitiche che richiederanno interventi multidisciplinari,

l'utilizzo di protocolli standard condivisi, di piattaforme analitiche più facilmente accessibili e la possibilità di condividere i risultati ottenuti in modo semplice e diretto.

Bibliografia

- 1) Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822): 860-921.
- 2) Varga ZV, Giricz Z, Bencsik P, et al. Functional genomics of cardioprotection by ischemic conditioning and the influence of comorbid conditions: implications in target identification. *Curr Drug Targets Cardiovasc Res* 2015; 16(8): 904-11.
- 3) Perrino C, Barabási AL, Condorelli G, et al. Epigenomic and transcriptomic approaches in the post-genomic era: path to novel targets for diagnosis and therapy of the ischaemic heart? Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc Res* 2017; 113(7): 725-36.
- 4) Raghov R. An 'Omics' perspective on cardiomyopathies and heart failure. *Trends Mol Med* 2016; 22(9): 813-27.
- 5) Simkhovich BZ, Abdishoo S, Poizat C, et al. Gene activity changes in ischemically preconditioned rabbit heart gene: discovery array study. *Heart Dis* 2002; 4(2): 63-9.
- 6) Madonna R, Van Laake LW, Davidson SM, et al. Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: cell-based therapies for myocardial repair and regeneration in ischemic heart disease and heart failure. *Eur Heart J* 2016; 37(23): 1789-98.
- 7) Papait R, Cattaneo P, Kunderfranco P, et al. Genome-wide analysis of histone marks identifying an epigenetic signature of promoters and enhancers underlying cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(50): 20164-9.
- 8) Angrisano T, Schiattarella GG, Keller S, et al. Epigenetic switch at *atp2a2* and *myh7* gene promoters in pressure overload-induced heart failure. *PLoS One* 2014; 9(9): e106024.
- 9) Gilsbach R, Preissl S, Grüning BA, et al. Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. *Nature Communications* 2014; 5:5288.
- 10) Greco CM, Kunderfranco P, Rubino M, et al. DNA hydroxymethylation controls cardiomyocyte gene expression in development and hypertrophy. *Nature Communications* 2016; 7: 12418.
- 11) Movassagh M, Choy MK, Goddard M, et al. Differential DNA methylation correlates with differential expression of angiogenic factors in human heart failure. *PLoS One* 2010; 5(5): e8564.
- 12) Movassagh M, Choy MK, Knowles DA, et al. Distinct epigenomic features in end-stage failing human hearts. *Circulation* 2011; 124(22): 2411-22.
- 13) Meder B, Haas J, Sedaghat-Hamedani F, et al. Epigenome-Wide Association Study Identifies Cardiac Gene Patterning and a Novel Class of Biomarkers for Heart Failure. *Circulation* 2017; 136(16): 1528-44.
- 14) Haas J, Frese KS, Park YJ, et al. Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy. *EMBO Mol Med* 2013; 5(3): 413-29.
- 15) Haider S, Cordeddu L, Robinson E, et al. The landscape of DNA repeat elements in human heart failure. *Genome Biol* 2012; 13(10): R90.
- 16) Puskas LG, Nagy ZB, Giricz Z, et al. Cholesterol diet-induced hyperlipidemia influences gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. *FEBS Lett* 2004; 562(1-3): 99-104.
- 17) Georgiadi A, Boekschoten MV, Muller M, et al. Detailed transcriptomics analysis of the effect of dietary fatty acids on gene expression in the heart. *Physiol Genomics* 2012; 44(6): 352-61.
- 18) Philip-Couderc P, Smih F, Hall JE, et al. Kinetic analysis of cardiac transcriptome regulation during chronic high-fat diet in dogs. *Physiol Genomics* 2004; 19(1): 32-40.
- 19) Philip-Couderc P, Pathak A, Smih F, et al. Uncomplicated human obesity is associated with a specific cardiac transcriptome: involvement of the Wnt pathway. *FASEB J* 2004; 18(13): 1539-40.
- 20) Ferdinandy P, Hausenloy DJ, Heusch G, et al. Interaction of risk factors, comorbidities, and comediations with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol Rev* 2014; 66(4): 1142-74.
- 21) Rivera CM, Ren B. Mapping human epigenomes. *Cell* 2013; 155(1): 39-55.
- 22) Esposito G, Perrino C, Schiattarella GG, et al. Induction of mitogen-activated protein kinases is proportional to the amount of pressure overload. *Hypertension* 2010 Jan; 55(1): 137-43.
- 23) McCarroll SA, Murphy CT, Zou S, et al. Comparing genomic expression patterns across species identifies shared transcriptional profile in aging. *Nat Genet* 2004; 36(2): 197-204.
- 24) Kooij V, Venkatraman V, Tra J, et al. Sizing up models of heart failure: proteomics from flies to humans. *Proteomics Clin Appl* 2014; 8(9-10): 653-64.
- 25) DeLaughter DM, Bick AG, Wakimoto H, et al. Single-cell resolution of temporal gene expression during heart development. *Dev Cell* 2016; 39(4): 480-90.
- 26) Ferrazzi F, Bellazzi R, Engel FB. Gene network analysis: from heart development to cardiac therapy. *Thromb Haemost* 2015; 113(3): 522-31.

Corrispondenza: *Cinzia Perrino MD PhD FESC, Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate, Università Federico II, Via Pansini 5, 80131 Napoli, Italy, Tel. +39 081 746 2234, Fax +39 081 746 2223, E-mail: perrino@unina.it*