

Numero XVIII
Anno 2021



Viaggio nella Scienza

Ithaca



Fisica, Matematica e Medicina (A)

Ithaca: Viaggio nella Scienza

Una pubblicazione del Dipartimento di Matematica e Fisica “Ennio De Giorgi” dell’Università del Salento.

Registrazione presso il Tribunale di Lecce n. 6 del 30 Aprile 2013.
e-ISSN: 2282-8079

Direttore Responsabile
Luigi Spedicato.

Ideatore
Giampaolo Co’.

Comitato di Redazione
Adriano Barra,
Rocco Chirivì,
Paolo Ciafaloni,
Maria Luisa De Giorgi,
Vincenzo Flaminio,
Luigi Martina,
Giuseppe Maruccio,
Marco Mazzeo,
Francesco Paparella,
Carlo Sempi.

Segreteria di Redazione
Daniela Dell’Anna.

© 2013-2023 Dipartimento di Matematica e Fisica “*Ennio de Giorgi*”.

© 2023 per i singoli articoli dei rispettivi autori.

Il materiale di questa pubblicazione può essere riprodotto nei limiti stabiliti dalla licenza
“*Creative Commons Attribuzione – Condividi allo stesso modo 3.0 Italia*” (CC BY-SA 3.0 IT).

Per il testo della licenza: <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/it/deed.it>

Ithaca: Viaggio nella Scienza

è disponibile sul sito:

<http://ithaca.unisalento.it/>

Scriveteci all’indirizzo:

ithaca@unisalento.it

Ithaca

Viaggio nella Scienza

XVIII 2021

3 In questo numero

5 Biomolecole e circuiti elettrici: la sfida Proteotronica

Rosella Cataldo

17 Microscopia a forza atomica per lo studio delle proprietà citomeccaniche

Mariafrancesca Cascione, Valeria De Matteis, Rosaria Rinaldi

31 Reti Neurali e Medicina di Precisione

Michele Caselle

39 Morfogenesi: una sfida interdisciplinare

Silvia Grigolon

55 Il sistema immunitario attraverso la lente dell'inferenza statistica

Barbara Bravi

73 Evoluzione e probabilità

Luca Peliti

85 La frontiera tra le scienze della vita e la fisica teorica.

Mario Nicodemi

Arte e Scienza

89 Le città invisibili, guidati da Italo Calvino nell'impero della matematica con la sacca del docente

Sandra Lucente

In questo numero

L'argomento cardine di questo XVIII numero di **Ithaca** riguarda l'uso della Fisica e della Matematica in Medicina, la disciplina che studia, e cura il corpo umano.

L'attività medica può essere classificata in tre differenti categorie: ricerca, diagnostica, e terapia. La ricerca medica si sforza di capire il funzionamento del corpo umano, la diagnostica identifica le cause del malfunzionamento, e la terapia agisce per rimediarne gli effetti.

Anche gli articoli che presentiamo possono, a grandi linee, essere classificati in queste tre categorie. Come abbiamo già fatto in precedenza, dato il rilevante numero di contributi, abbiamo pensato di presentarli in due parti. In questa prima parte abbiamo riunito articoli che potremmo identificare come più legati alla ricerca medico/biologica.

L'articolo di Rosella Cataldo presenta la Proteotronics, un approccio per descrivere il funzionamento di reti bio-molecolari complesse usando, come analogia, le relazioni e le leggi fisiche dell'elettronica.

La microscopia ad alta risoluzione può essere usata per studiare proprietà meccaniche di molecole biologiche e questo permette di identificarne caratteristiche cancerogene. Questo è l'argomento trattato nell'articolo di Mariafrancesca Cascione, Valeria De Matteis e Rosaria Rinaldi.

L'articolo di Michele Caselle parla della possibilità di utilizzare la grande mole di dati riguardanti le caratteristiche biochimiche di casi patologici accumulati nelle banche dati di ospedali e laboratori di ricerca per analizzare situazioni riguardanti individualmente ogni singolo paziente; si parla di Medicina di precisione.

Silvia Grigolon presenta l'uso della Mecca-

nica Statistica per investigare i meccanismi che regolano lo sviluppo degli organismi viventi: la Morfogènesi.

L'uso delle inferenze statistiche per studiare il sistema immunitario è l'argomento trattato da Barbara Bravi.

Nel suo articolo, Luca Peliti discute dell'evoluzione dei sistemi biologici in termini probabilistici.

Infine, Mario Nicodemi presenta una riflessione riguardante la relazione tra Fisica Teorica e Scienze della vita.

Conclude questa prima parte del numero XVIII di **Ithaca** un articolo non legato all'argomento principale. L'articolo, di Sandra Lucente può essere inserito tra quelli riguardanti **Arte e Scienza** presentati nei numeri III e IV di **Ithaca**. Si tratta di una particolare analisi, fatta con una visione da matematica, del libro "Le città invisibili" di Italo Calvino.

Buona lettura,
il Comitato di Redazione

Biomolecole e circuiti elettrici: la sfida Proteotronica

Rosella Cataldo

Dipartimento di Matematica e Fisica "Ennio De Giorgi" - Università del Salento

Negli ultimi vent'anni una fiorente produzione di ricerche in campo biologico e medico ha accelerato il processo di conoscenza di molti sistemi biologici, con notevoli ricadute quali, per esempio, una più precisa discriminazione degli stati sano/malato, una descrizione dettagliata di alcune patologie, della progressione della malattia e della risposta alle terapie. Le metodologie usate in tutti questi studi hanno anche cambiato e indirizzato nuovi paradigmi d'indagine. Un tempo, infatti, il confine tra la biologia molecolare e le discipline affini, come la genetica e la biochimica, era molto chiaro, mentre oggi non è più così ben definito; soprattutto è diventato palese che le sole conoscenze biologiche non sono in grado di fornire una descrizione esaustiva dei fenomeni studiati. Si è delineata chiaramente una rivoluzione nelle modalità attraverso cui viene condotta la ricerca biomedica: all'aumento di conoscenza non possono non contribuire importanti branche della Fisica e della Matematica, che riescono a integrare e a sintetizzare diversi scenari, facendo da propulsore allo sviluppo di molteplici applicazioni.

Questo articolo presenta alcuni casi di sistemi biologici modellizzati secondo la Proteotronica, ossia come reti complesse attraverso le quali l'informazione che interessa ricavare è assimilabile a un segnale elettrico, e quindi opportunamente studiata con le leggi fisiche dell'elettronica.

Le biomolecole sono sostanze esclusive degli esseri viventi che rivestono un ruolo fondamentale nella vita e nello sviluppo dell'organismo. Esse sono composte essenzialmente da carbonio e idrogeno, cui sono spesso associati azoto, ossigeno, fosforo e zolfo che, aggregandosi, formano catene di polimeri, composti da un gran numero di monomeri. Le proteine e gli acidi nucleici (deossiribonucleico o DNA, ribonucleico o RNA) sono tra le biomolecole più studiate.

Le proteine sono una catena lineare di monomeri, detti amminoacidi, che svolgono la maggior parte delle funzioni di routine della cellula. Essi sono componenti di ormoni, enzimi e neurotrasmettitori, e partecipano alle reazioni chimiche che avvengono nel nostro corpo, accelerandole, rallentandole, favorendole oppure ostacolando a seconda delle necessità. Sono pure in grado di catalizzare reazioni biochimiche per la sintesi di nucleotidi e il loro assemblaggio in acidi nucleici, oppure possono avere un ruolo

strutturale di trasporto di sostanze nutritive o di elaborazione di informazioni. Gli acidi nucleici sono in gran parte interessati alla conservazione e alla distribuzione di informazioni genetiche e per questo motivo sono chiamati macromolecole informative.

Accanto a queste biomolecole presenti in natura, negli ultimi vent'anni sono stati sviluppati in laboratorio dei composti organici detti **attameri**, con una strategia di produzione mirata. Il termine *attameri*, dovuto a Ellington e Szostak [1], deriva dall'unione del termine latino *aptus*, che significa adatto, e di quello greco *meros*, che significa parte. La loro funzione, infatti, è quella di adattarsi nella maniera migliore al bersaglio (*target*) biologico per i quale sono stati progettati.

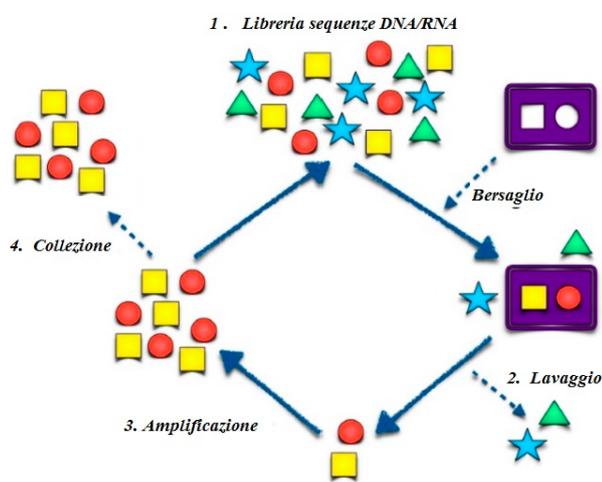


Figura 1: Schema della procedura SELEX.

Essi sono catene corte a filamento singolo di DNA o RNA, scelte usando la tecnica di selezione in vitro detta SELEX [2], mediante la quale si riesce a discriminare quelli che si adattano/legano meglio alla molecola considerata, all'interno di una grande quantità di acidi nucleici aventi sequenze diverse. SELEX è una procedura iterativa schematizzata in Figura 1, che consta di un certo numero di cicli, riassumibili in queste fasi principali:

1. costruzione di una libreria, attraverso la sintesi chimica di 10^{13} - 10^{16} sequenze di RNA o DNA, e quindi incubazione con la proteina bersaglio;
2. lavaggio degli oligonucleotidi non legati alla proteina bersaglio;

3. amplificazione delle specie selezionate fino a questo punto, tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR) che consente in maniera molto rapida la moltiplicazione di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali;

4. collezione del materiale genetico ottenuto con le fasi precedenti, tramite trascrizione in vitro o solo denaturazione (DNA). Nella trascrizione, le informazioni contenute nel DNA vengono trasferite enzimaticamente in una molecola complementare di RNA, passando dalla produzione intermedia di un RNA messaggero (mRNA) fino alla sintesi di peptidi o proteine funzionali. Nella denaturazione, l'acido deossiribonucleico a doppio filamento si svolge e si separa in due filamenti singoli, rompendo i legami d'idrogeno tra le basi appaiate.

A questo punto hanno inizio nuovi cicli, solitamente ne servono 5-10, fino ad arrivare alla sequenza che meglio si adatta al particolare bersaglio. Talvolta, il bersaglio è altamente purificato, per limitare effetti dannosi dell'attamero sulla molecola stessa, specialmente nel caso di cancro. SELEX è in costante aggiornamento, una sua evoluzione, nota come cell-SELEX, impiega cellule viventi come bersagli [3], di fatto ampliando il campo di utilizzo degli attameri.

Gli attameri costituiscono una valida alternativa agli anticorpi, tanto che spesso vengono definiti anticorpi artificiali, con il vantaggio che non è necessario conoscere la quantità o il tipo di proteina sulla superficie cellulare con la quale devono interagire, semplificando così il processo di selezione e riducendo costi e tempi, soprattutto rispetto ai loro diretti concorrenti.

Data l'alta affinità e specificità con cui possono legarsi al bersaglio, il fatto di non essere nocivi e di poter essere facilmente eliminati da reni e sangue, gli attameri sono utilizzati in un'ampia varietà di applicazioni biologiche [4], che spazia dalla progettazione di biomarcatori indicativi dell'attività di un tumore [5], al supporto alla diagnosi precoce di patologie, fino alla produzione di agenti per la diagnostica per immagini e farmaci per la terapia del cancro.

Per comprendere meglio come proteine/attameri possano essere impiegati in varie applicazioni della biologia e della medicina, bisogna partire dal fatto che le loro funzioni dipendono strettamente dalla loro struttura, che è suscettibile a stimoli esterni come variazioni di campo elettromagnetico, radiazione a microonde, temperatura, pressione e pH, aggancio a un recettore. Per questo motivo, le proteine e in generale le biomolecole trovano un valido impiego nella progettazione di dispositivi detti biosensori (aptasensori nel caso di attameri) in grado di rilevare la presenza di uno specifico **analita**, ossia della specie che deve essere determinata durante l'analisi chimica, utilizzando un elemento biologico sensibile (recettore). Il rilevamento è il risultato dell'interazione tra l'elemento sensibile e la molecola bersaglio, riprodotta da un trasduttore in un segnale fisico misurabile come: impedenza, oppure conduttanza, luce, energia termica, ecc., che può essere opportunamente elaborato (Figura 2).

L'elemento chiave di un biosensore è, quindi, l'elemento sensibile, che deve avere un'elevata capacità di legarsi al bersaglio (affinità), caratteristica che rientra nelle tipicità degli attameri cosicché gli aptasensori sembrano essere particolarmente promettenti rispetto al rilevamento rapido e senza reagenti in condizioni realisticamente complesse. In particolare, i biosensori che utilizzano trasduttori elettrici si dimostrano rapidi, convenienti e sostenibili, risultando soluzioni efficaci in molte applicazioni, principalmente per l'individuazione di malattie *point-of-care*, ossia eseguendo il test nel modo più comodo e immediato per il paziente [6].

Nel caso di biosensori elettrici, sono previste due diverse tipologie di misure: a intensità di polarizzazione fissa con frequenza variabile, ovvero una misurazione di spettroscopia di impedenza elettrochimica standard (EIS) rappresentata da spettri di impedenza [7, 8, 9], oppure a frequenza fissa e intensità di polarizzazione variabile, rappresentata dai grafici corrente (resistenza)-tensione [9]. In entrambi i casi, la variazione di impedenza o corrente serve a rilevare, con elevata specificità e selettività, la presenza di un determinato bersaglio, come pure l'intensità della variazione è anche correlata alla concentrazione del bersaglio [8].

Nei biosensori ottici, invece, si impiegano come recettori le proteine transmembrana dette **opsine**, nelle quali il cambiamento conformazionale successivo all'aggancio della biomolecola con il bersaglio è l'unico cambiamento strutturale che si può osservare. In questo caso, il bersaglio è il fotone, in grado di attivarle quando il retinale, antagonista chimico legato all'opsina e derivato dalla vitamina A, è colpito dalla luce [7, 8, 9].

Modellizzazione delle proprietà elettriche delle biomolecole

La modellizzazione del trasporto di carica nelle biomolecole è un argomento molto intrigante, dal momento che la teoria classica deve essere adattata a sistemi che, pur mostrando un alto grado di organizzazione, non hanno una struttura cristallina. In particolare, in tali sistemi di dimensioni intrinsecamente ridotte, un approccio di campo medio non è significativo, cosicché la descrizione in termini di onde di Bloch (stati estesi, ES) è parzialmente, o totalmente, sostituita introducendo onde a corto raggio (stati localizzati, LS), per riuscire a tener conto dell'organizzazione spaziale del materiale. La transizione tra due stati localizzati avviene con costo energetico mediante meccanismi di *tunneling* o *hopping*. In tal modo, a bassa polarizzazione e temperatura, il meccanismo di trasporto dominante viene eseguito da ES, mentre, aumentando il *bias* e/o la temperatura, il meccanismo di *tunneling* diventa dominante.

All'inizio degli anni '90, questo tipo di descrizione locale è stata superata da una nuova proposta [10] che introduceva il concetto di trasferimento di elettroni per vie multiple, inserendo nella visione del trasporto elettronico aspetti abbastanza macroscopici, come i motivi della struttura secondaria della proteina e l'interazione interna fra gli amminoacidi costituenti. In questa logica si inserisce un approccio innovativo, detto **Proteotronica**, ossia l'elettronica delle proteine, che riesce a descrivere la struttura 3D di una qualunque biomolecola e le interazioni tra i suoi componenti in termini di rete complessa [11].

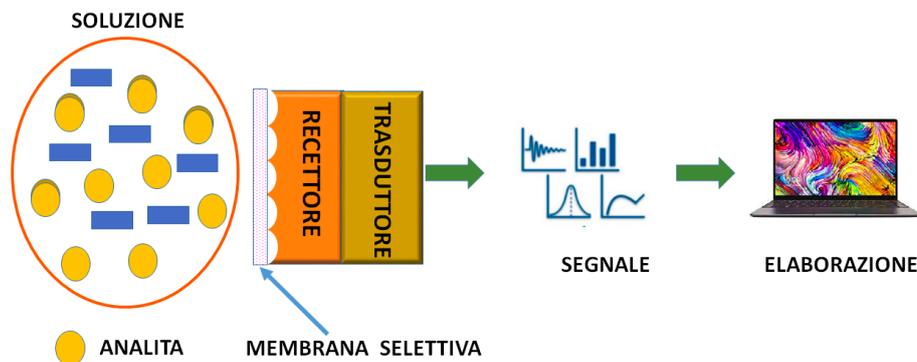


Figura 2: Schema di un biosensore.

Costruzione della rete complessa

Una biomolecola è un oggetto tridimensionale definito formalmente dalle coordinate spaziali dei suoi atomi. Questo arrangiamento spaziale è stato studiato per un gran numero di strutture proteiche attraverso metodi di cristallografia a raggi X e Risonanza Magnetica Nucleare, e depositato in una banca dati, nota come Protein Data Bank [12]. L'elenco delle strutture risolte sperimentalmente è in continuo aggiornamento, consentendo di far luce sui numerosi dubbi relativi alla stretta relazione tra struttura e funzione proteica. Sul Protein Data Bank (PDB) sono ospitate anche le strutture terziarie di un centinaio di attameri complessati con la proteina di riferimento.

Partendo dalle strutture tridimensionali delle biomolecole, è possibile ottenere la rete (grafo) nella quale le posizioni spaziali di tutti gli atomi appartenenti alla catena vengono ricostruite scegliendo come punto di riferimento quella del Carbonio- α (C_α) per la proteina, e del Carbonio-1 (C_1) per l'attamero. A questo punto, la topologia spaziale può essere ulteriormente ridotta a una topologia di contatto, che rappresenta la rete d'interazione tra i residui. Si calcolano quindi tutte le distanze euclidee tra le coppie di C_α/C_1 , creando una matrice di distanza $\Delta = \{\delta_{ij}\}$ in cui l'elemento generico δ_{ij} è la distanza euclidea nello spazio 3D tra il residuo i -esimo e il j -esimo (mantenendo l'ordine della sequenza). La topologia di contatto è pertanto calcolata come: $\delta_{i,j} = 1$ se esiste un collegamento, cioè se la distanza tra i nodi i e j è inferiore alla distanza d'interazione assegnata D ;

$\delta_{i,j} = 0$ se non esiste alcun collegamento, cioè se la distanza tra i nodi i e j è maggiore del valore assegnato. D è un parametro libero, che dipende dal grado di connessione del sistema che si vuole studiare. Al crescere della distanza d'interazione (D) cresce il numero di legami considerati e quindi la connessione del sistema, sebbene la natura del grafo, ovvero le sue proprietà topologiche, sia preservata [13]. Si suppone, inoltre, che non esistano auto-cicli (quindi $\delta_{i,i} = 0$) e nessun collegamento sovrapposto, cioè non ci possa essere più di un collegamento tra i e j e che la matrice sia simmetrica.

L'approccio Proteotronico

Il grafo topologico della biomolecola, derivato come spiegato sopra, diventa una rete di interazione, se si assume che i collegamenti siano i percorsi fisici attraverso i quali i nodi comunicano. Una coppia di contatti ideali viene utilizzata per collegare la rete a una batteria esterna, lavorando in corrente continua e in regime lineare. È quindi possibile descrivere il comportamento del complesso assimilandolo a un circuito elettrico analogico, noto come cella di Randles, in cui la cattura del bersaglio viene rilevata da una variazione di impedenza del tipo:

$$Z_{ij} = f_{ij} \frac{\rho_{ij}}{1 + i\omega\epsilon_0\epsilon_{ij}\rho_{ij}}$$

in cui f_{ij} è un fattore di forma, ω la frequenza della polarizzazione applicata, ϵ_0 la costante dielettrica nel vuoto, ϵ_{ij} e ρ_{ij} sono la resistività e le costanti dielettriche della coppia di nodi ij .

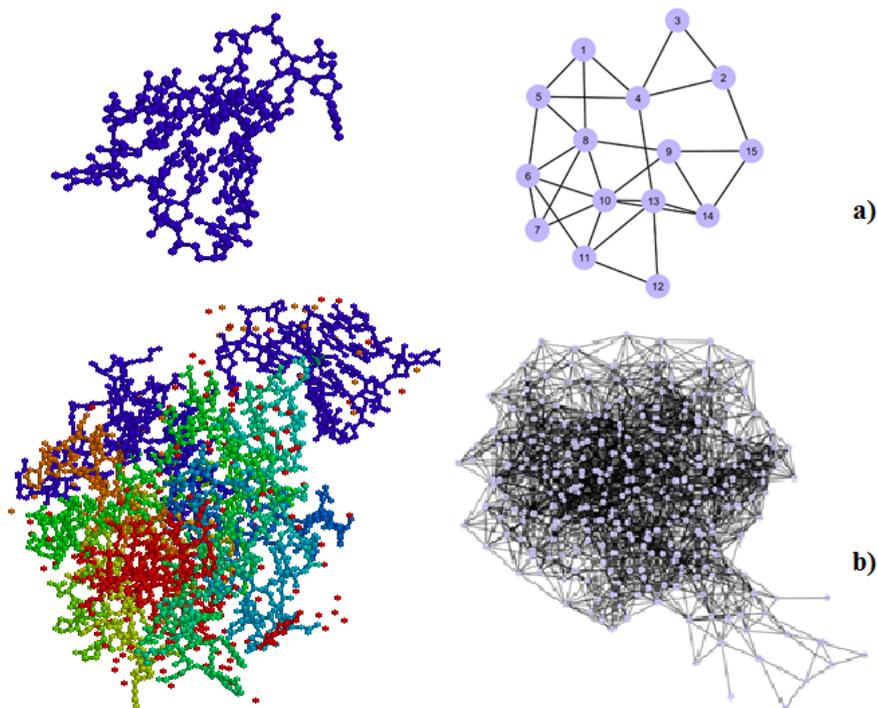


Figura 3: (a) La struttura 3D del TBA allo stato nativo (file PDB 148D) a sinistra e la rete corrispondente a destra, (b) la struttura 3D del complesso TBA+trombina (file PDB 4DII) a sinistra, e la rete corrispondente a destra. In tutti e due i casi $D=10.1 \text{ \AA}$.

Per quanto riguarda i valori di resistività e della costante dielettrica, essi descrivono la resistività media e la costante dielettrica della coppia di nodi che possono essere costituiti da soli amminoacidi, solo basi azotate, oppure un amminoacido e una base azotata (nella regione di legame). Una volta che, formalmente, la rete è collegata alla polarizzazione, l'insieme delle equazioni lineari corrispondenti può essere risolto applicando le leggi di Kirckhoff, cosicché l'impedenza totale si riduce a una semplice resistenza ρ_{ij} quando $\omega = 0$ [11, 14].

Vedremo ora alcuni casi nei quali l'approccio Proteotronico si è rivelato di successo per comprendere alcune proprietà delle biomolecole prese in considerazione, utili soprattutto nel caso di progettazione di biosensori per l'analisi di patologie legate a quelle biomolecole.

L'attamero per la trombina

La trombina è un enzima catalitico che svolge un ruolo chiave durante la coagulazione del sangue, sintetizzando la fibrina dal fibrinogeno, e che ha una vasta gamma di effetti sulla salute nel corpo

umano, preservandolo per esempio dal rischio di trombosi.

Uno degli oligonucleotidi sintetici più studiati [15] è l'attamero legante la trombina (TBA), un DNA a singolo filamento con sequenza GGTTGGTGTGGTTGG. Essendo una sequenza ricca di guanina (G), si formano quartetti che, impilandosi tra di loro, danno origine a strutture secondarie stabili, dette G-tetraedro. Tali strutture, generate attraverso legami di idrogeno tra quattro guanine, sono stabilizzate dalla presenza di un catione monovalente (solitamente il potassio) che si dispone al centro della tetraede stessa. La loro principale funzione è, probabilmente, quella di attivare o disattivare alcuni processi fisiologici attraverso la regolazione della trascrizione.

Oltre al sito attivo, la trombina è caratterizzata da altri due siti di legame, esosito I ed esosito II. L'esosito I è noto come sito di riconoscimento del fibrinogeno e l'esosito II come sito di legame con l'eparina. L'attività enzimatica della trombina è inibita quando legata al TBA, a causa del blocco del fibrinogeno, facilitando il suo potenziale ruolo di anticoagulante [16]. In Figura 3 è riportato lo schizzo del TBA da solo (a) e coniugato con la trombina (b) e la

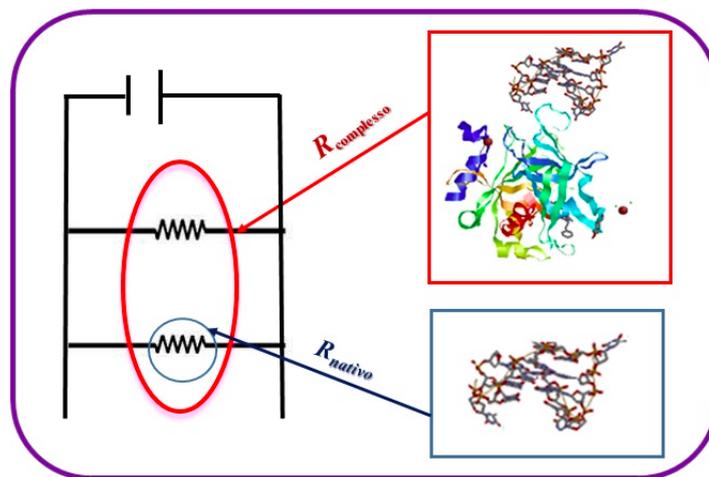


Figura 4: Circuito equivalente per il TBA e la trombina (spiegazione nel testo).

rete corrispondente per ciascuno di essi.

Una volta costruita la rete, è possibile definire il relativo circuito elettrico a scala equivalente, schematizzato in Figura 4, nella quale il ligando può essere descritto come una scala di resistenze collegata ad un'estremità alla batteria esterna; aumentando D , ossia aggiungendo nuovi rami all'estremità opposta, la resistenza totale diminuisce. Se poi si aggiunge il recettore (R_{nativo}), è come inserire un'altra scala di resistenza in parallelo alla prima, quindi la resistenza del complesso ($R_{\text{complesso}}$) è sempre minore di quella del ligando.

R_{nativo} rappresenta sia collegamenti interni che esterni al recettore e dipende dalla dimensione del recettore stesso per cui, aumentando D , il numero di collegamenti interni aumenta e la resistenza diminuisce. Allo stesso tempo, cresce anche il numero di collegamenti esterni, abbassando ulteriormente la resistenza di R_{nativo} . Infine, un recettore di grandi dimensioni può mostrare una resistenza minore rispetto a un recettore di dimensioni inferiori, cioè il suo valore asintotico di $R_{\text{complesso}}/R_{\text{nativo}}$ (per grandi valori di D) può essere molto inferiore a 1. D'altra parte, i collegamenti esterni hanno un forte effetto su $R_{\text{complesso}}/R_{\text{nativo}}$, perché riducono ulteriormente la resistenza totale. Queste considerazioni sono del tutto generali, quindi vere per tutte le reti complesse, indipendentemente dalla biomolecola studiata.

Studiando le conformazioni fondamentali del TBA in presenza di cationi di potassio e sodio

(K^+ , Na^+), entrambi capaci di rafforzare la stabilità della struttura degli attameri, ma con risultati diversi per quanto riguarda l'affinità, si è osservato che la stabilità del complesso è potenziata da cationi di potassio [15].

Questo risultato è confermato dalla risoluzione della rete di impedenza, tramite la quale è possibile calcolare lo spettro di resistenza per ogni struttura. La Figura 5a mostra il rapporto tra la resistenza del complesso e l'attamero nativo, $R_{\text{complesso}}/R_{\text{nativo}}$, a valori crescenti di D . La regione in cui la risposta è in accordo con gli esperimenti ($R_{\text{complesso}}/R_{\text{nativo}} > 1$) è ben definita, tra 8-12 Å, e al suo interno la risposta del complesso risolto in presenza di sodio è sicuramente la minore.

È interessante notare come una discriminazione tra le due strutture in presenza di cationi (K^+ , Na^+) sia confermata anche dallo studio del grafo della rete attamero+proteina con i paradigmi della Teoria dei Grafi, specialmente in termini di gerarchia e assortatività [17]. La gerarchia descrive la struttura di una rete attraverso il raggruppamento gerarchico dei suoi nodi, utile a identificare alcune proprietà comuni delle diverse reti complesse. In linea di principio, l'assortatività è direttamente correlata alla gerarchia della rete in termini di connettività. Un distacco di un nodo di alto grado (hub), o un attaccamento mirato in una rete disassortativa, lascerebbe altri nodi di alto grado connessi ai nodi periferici (resilienza). Ciò ridurrebbe al minimo la possibilità che la rete nel suo complesso si discon-

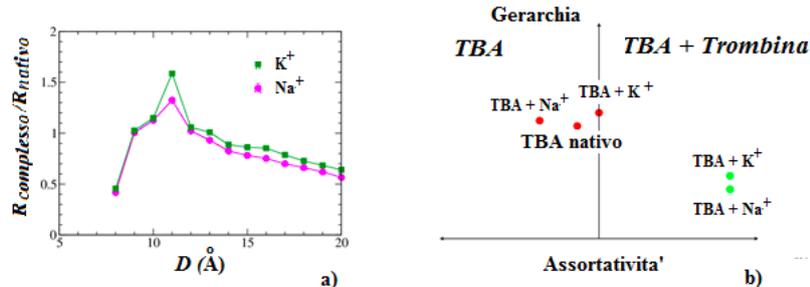


Figura 5: a) Spettri di variazione di resistenza per TBA in presenza di sodio e potassio. Il complesso TBA-proteina ha una resistenza maggiore di quella del solo TBA in un intervallo di valori D vicino a 11 Å. Nell'intero intervallo dei valori di D il rapporto di resistenza del complesso ottenuto in presenza di sodio è maggiore di quelli ottenuti in presenza di potassio. b) Grafico gerarchia-assortatività dell'attamero TBA. A sinistra il solo attamero, allo stato nativo o nella configurazione che assume quando è legato al recettore, in presenza di due diversi cationi. A destra la coppia TBA-trombina, in presenza dei cationi.

netta. In una rete assortiva, gli hub sono collegati tra loro, quindi il distacco di un nodo di alto grado avrebbe un impatto maggiore sulla connettività della rete stessa. Si è osservato che l'analogo di rete dell'attamero cambia la sua assortatività da negativa a positiva aggiungendo la trombina, ciò significa che la rete che descrive l'attamero complessato con la proteina è meno soggetta a influenze esterne, cioè è più stabile di quella che descrive l'attamero da solo.

Studiando l'attamero libero (TBA) e in presenza dei cationi, gerarchia e assortatività sono riassunte nella Figura 5b, che fornisce uno schizzo delle due misure per le reti considerate. Solo le strutture *target-free*, a destra, hanno valori positivi di assortatività, mentre le stesse strutture hanno una gerarchia più alta rispetto al complesso, cioè sono meno stabili [13]. In altri termini, l'attamero in presenza di sodio è più stabile dell'attamero in presenza di potassio, cioè ha una ridotta necessità di legare la proteina per rafforzare la stabilità (bassa affinità di legame). Questi risultati sono in perfetto accordo con quanto riportato in letteratura [15].

Le citochine

Le citochine sono una famiglia di proteine che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione del sistema immunitario e nello sviluppo di diverse malattie, dall'artrite reumatoide al cancro e, recentemente, al COVID-19 [18]. L'interleuchina 6 (IL-6) è una citochina proinfiammatoria che

regola le infiammazioni, la febbre, il sonno, l'ematopoiesi (formazione delle cellule ematiche) e la distruzione ossea [19]. Essa è sintetizzata nella fase iniziale dell'infiammazione e si sposta nel fegato attraverso il flusso sanguigno, seguita dalla rapida induzione di una vasta gamma di proteine di fase acuta come la proteina C-reattiva (CRP), l'amiloide sierica A (SAA), il fibrinogeno, l'aptoglobina e l' α_1 -antichimotripsina [20]. Alti livelli di citochina IL-6 sono stati rilevati in pazienti COVID-19, tanto che in Cina a un gruppo di pazienti affetti da questa patologia sono stati somministrati inibitori specifici di IL-6 e della Janus chinasi (JAK). Il risultato è stato un miglioramento della salute con modesti effetti collaterali, tanto da suggerire l'uso di terapia antagonista di IL-6 non solo contro il COVID-19, ma anche nel trattamento di altri virus letali [18, 21]. Sono presenti, poi, in letteratura varie ricerche che dimostrano come gli agenti antinfiammatori attenuino la crescita del tumore al seno, come pure la relazione tra l'infiammazione e vari tipi di cancro è suffragata da parecchi studi.

Come antagonista di IL-6 e per il trattamento di varie malattie immuno-mediate, una nuova strategia di contrasto ha sviluppato Tocilizumab, un farmaco derivato da anticorpi monoclonali anti-IL-6 R di classe immunoglobuline IgG1. Questo farmaco immunosoppressore era stato studiato soprattutto per il trattamento dell'artrite reumatoide e dall'artrite idiopatica giovanile sistemica, ma durante la pandemia Tocilizumab è stato impiegato con successo nella cura clinica della polmonite grave da

COVID-19. Il meccanismo di inibizione di IL-6 è stato studiato anche tramite l'anticorpo clinico Ollokizumab (OKZ), soprattutto nel caso di artrite reumatoide.

Vedremo allora come la Proteotronica possa svolgere un ruolo importante nella valutazione di quanto bene una biomolecola si adatti al suo bersaglio, dimostrando come molte utili informazioni possano essere dedotte su una vasta gamma di recettori pensati per l'interleuchina 6.

Spazieremo dal recettore gp130 complessato sia con IL-6 naturale che con una sua subunità (IL-6R) includendo la citochina complessata con alcuni anticorpi del tipo frammenti leganti l'antigene (Fab 68F2, Fab OKZ e Fab 61H7) e un attamero modificato (SOMAmer), progettato con una tecnica nota come Slow-Off-Rate (bassa dissociazione con il ligando), pensata proprio per esaltare l'associazione a ligandi solitamente abbastanza difficili da legare. Sul Protein Data Bank (PDB), sono depositate le strutture 3D di IL-6 allo stato nativo [22], cioè al minimo di energia conformazionale, che complessata anche con diversi recettori [19, 23], dell'attamero SOMAmer SL1025 (ID PDB: 4ni9 [19, 28]), dell'anticorpo umanizzato OKZ (ID PDB: 4cni [27]) e dei due anticorpi derivati dai Camelidi Fabs (ID PDB: 4o9h [29]) e (ID PDB: 4zs7 [26]).

Attraverso la rete equivalente [11] della biomolecola (recettore, ligando o loro complesso) è possibile ricavare lo spettro di resistenza $R(D)$, dove $R = R_{\text{complesso}}/R_{\text{IL-6}}$ è il rapporto tra la resistenza calcolata del complesso IL-6+recettore rispetto alla resistenza di IL-6 da solo, D è la distanza d'interazione tra i nodi del circuito, non tenendo conto delle specifiche proprietà elettroniche di ciascun nodo e assumendo invece per tutti lo stesso valore di resistività (qui $\rho = 10^{14}\Omega \text{ \AA}$) [24].

Entrando nello specifico del circuito (Figura 6e), ponendo i contatti elettrici su IL-6 (di seguito, il ligando), si ottiene una sorgente di corrente elettrica che scorre attraverso il recettore, il ligando, e i collegamenti esterni tra recettore e ligando. Il ligando può essere descritto come una scala di resistenze (L1) collegata ad un'estremità della batteria esterna che lavora in corrente continua e in regime lineare; aumentando D , vengono aggiunti nuovi rami all'estremità opposta e la resistenza totale diminuisce [17], di fatto dipenden-

do dalle dimensioni del recettore. Aggiungere il recettore equivale a inserire un'altra scala di resistenza (L2) che tiene conto dei collegamenti interni al recettore e dei collegamenti esterni. Essa è in parallelo con L1, e quindi la resistenza del complesso è sempre minore di quella del ligando. Infine, un recettore grande può mostrare una resistenza minore di un recettore piccolo, cioè il suo valore asintotico di resistenza (per grandi valori di D) può essere molto inferiore a 1. Questi comportamenti sono meglio evidenziati in Figura 6 (a - d) che illustra i valori dello spettro di resistenze per diverse configurazioni di IL-6 con tutti i recettori studiati, variando sia la distanza D d'interazione tra i nodi che la posizione dei contatti all'interno del ligando.

Diversi circuiti sono presi in considerazione.

- (a) eliche A (ingresso) - D (uscita), vicine all'N-terminale che è l'estremità di una catena di amminoacidi che termina con un gruppo amminico, a partire dalla glucina (GLU10) e chiudendo con la metionina (MET171);
- (b) eliche A (uscita) - D (ingresso), quindi con orientazione contraria ad (a), a partire dalla treonina (THR30) finendo con l'asparagina (ASN142);
- (c) eliche A (ingresso) - C (uscita) a partire dalla treonina (THR30) e finendo con l'alanina (ALA117);
- (d) ingresso/uscita solo sull'elica B, a partire da asparagina (ASN66) e finendo con serina (SER95) [24].

Ovviamente, la scelta di eliche e amminoacidi ha tenuto conto delle caratteristiche chimiche dei composti, come note dalla letteratura. La configurazione (a) rappresenta il sito I, ossia quella piccola parte (epitopo) dell'antigene che lega l'anticorpo specifico. Il sito II, configurazione (b), rappresenta la parte in cui gp130 lega IL-6. Nella configurazione (c), a causa del ruolo primario dell'elica C nel legame naturale di IL-6, una coppia di contatti viene posta anche sulle eliche A e C e, infine nella configurazione (d) si sceglie una posizione intermedia, con entrambi i contatti posti sull'elica B.

Alcuni interessanti comportamenti vengono in luce: pur essendo più piccolo di IL-6R & gp130,

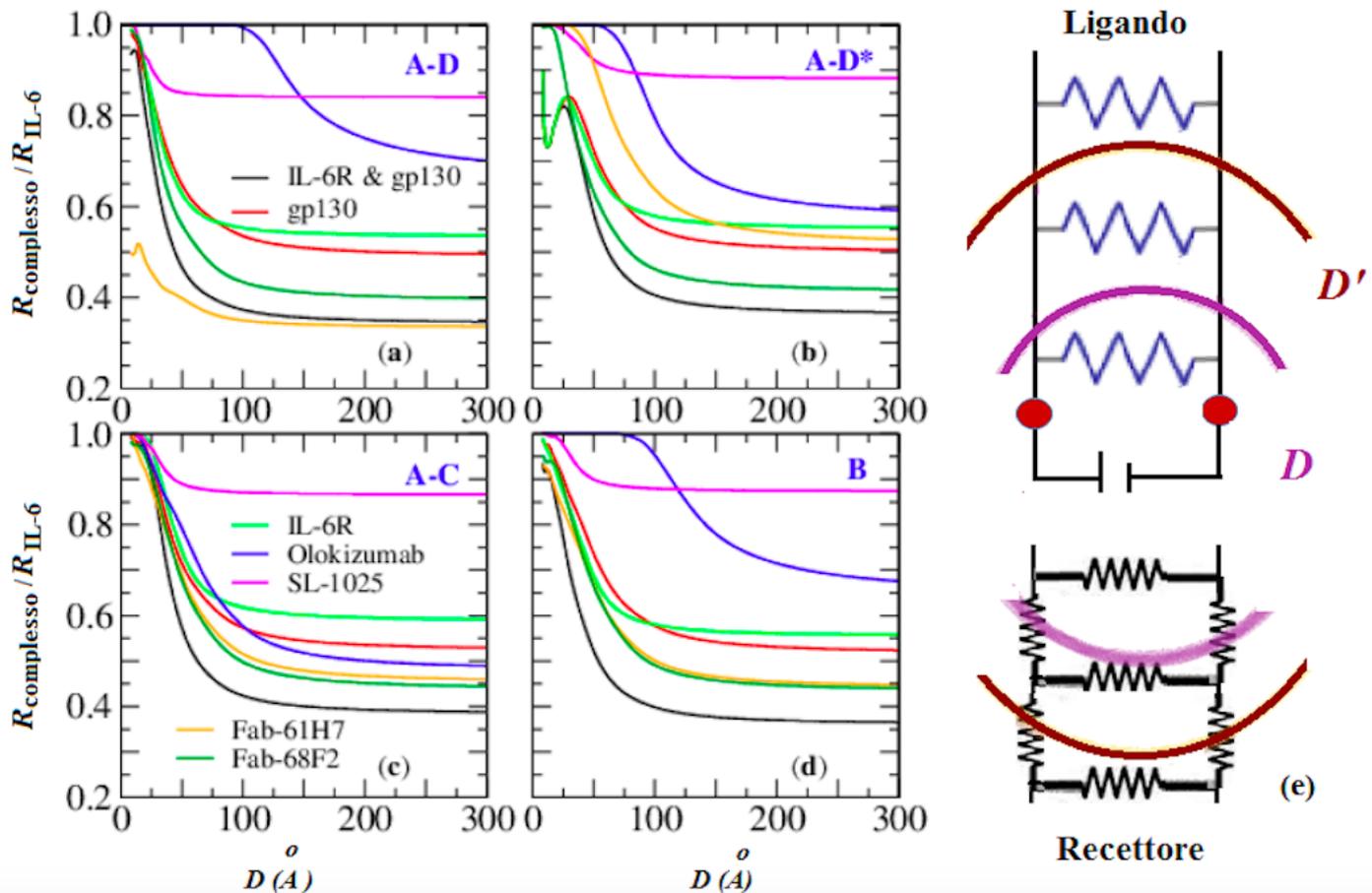


Figura 6: Grafici della resistenza relativa di IL-6 complessato con diversi recettori. I contatti elettrici ideali sono: (a) sulle eliche A – D vicine all’N-terminale, ingresso/uscita GLU10/MET171; (b) sulle eliche A – D al contrario orientamento (A – D*), ingresso/uscita THR30/ASN142; (c) sulle eliche A – C, ingresso/uscita THR30/ALA117; (d) sull’elica B, ingresso/uscita ASN66/SER95; (e) schema del circuito ideale utilizzato per descrivere le proprietà elettriche dei vari complessi (da [24]).

Fab 61H7 a Fab 61H7, di conseguenza ha un valore di R più alto, ma non così alto come potrebbe suggerire l’effetto della dimensione: in questo caso, più collegamenti esterni contribuiscono a ridurre R . Dalle evidenze raccolte, si può concludere che il valore asintotico dello spettro di resistenza è influenzato sia dalla dimensione del recettore che dal collegamento esterno.

Calcolando R per quattro diverse posizioni di contatto, in modo da tenere in conto i diversi modi in cui i recettori legano la proteina, si è osservato come il profilo di $R(D)$ dipenda dalle posizioni di contatto, talvolta con differenze molto drammatiche.

Questo è il caso del Camelide Fab 61H7 e di OKZ: Fab 61H7 lega IL-6 nel Sito I, e quindi i contatti sulla prima posizione (Figura 6a) danno un valore molto basso del massimo di R , una forte diminuzione e un basso valore asintotico

(flusso maggiore all’interno del recettore rispetto al ligando). Al contrario, quando si mettono i contatti nella seconda posizione (Figura 6b), si riscontra un valore maggiore del massimo, una diminuzione più dolce e un maggiore valore asintotico (cioè una corrente minore nel recettore). Si ottiene un risultato speculare per OKZ, che ha il Sito II come sede di legame. Infine, né i contatti sull’elica B (Figura 6d) né su quella C migliorano le risposte date dai contatti posti sulle eliche A e D (Figure 6b e 6c).

Infine, interessanti conclusioni si sono ottenute dal calcolo della superficie equivalente ToCI (Indice Topologico Complementare) del contatto ligando-recettore, definita come l’area di R sotto l’altezza sensibile (cioè la differenza tra il valore di R per ogni D e il suo valore asintotico) e sopra il range sensibile di D (cioè l’intervallo dal valore minimo di D , qui 8 Å, e il valore corri-

spondente al 90% dell'altezza massima sensibile), divisa per il rapporto tra il numero di nodi complesso/proteina. Si è dedotto, infatti, che tre dei quattro recettori: Fab 61H7 (ToCI=1.2), SOMA-mer SL1025 (ToCI=1.6), quando legato al Sito I, e OKZ (ToCI=1.9), quando legato in un sito che costringe alcuni amminoacidi della citochina a forma di spirale a deformarsi in una piccola elica che occlude il sito di legame gp130, sono pressoché equivalenti, per cui potrebbero funzionare molto bene nel rilevamento di IL-6 [24].

Questo risultato non era prevedibile considerando quanto riportato in letteratura, in cui per l'attamero SL1025 alcuni parametri chimici lo caratterizzano con adattabilità per l'interleuchina-6 consistentemente differente rispetto a quella delle altre biomolecole prese in esame.

Conclusioni

Questo articolo ha illustrato come poter studiare le caratteristiche delle biomolecole nel paradigma della Proteotronics, ossia analizzandole in termini di reti complesse assimilabili a circuiti elettrici. È stato dimostrato l'importante potenziale di questo approccio al fine di decifrare informazioni essenziali per trovare bersagli farmacologici e per progettare biosensori, da impiegare nella diagnostica e nella cura di malattie.

Uno dei risultati più sorprendenti è che, sebbene differiscano in gran parte negli elementi di base, questi sistemi condividono dinamiche collettive simili e organizzazioni strutturate che ne rendono robusto l'impianto teorico e interessanti le ricadute.

Infine, anche se non di minore importanza, è stato evidenziato come abbia senso esplorare con queste metodiche derivate dalla Fisica aree della ricerca chimica e biologica con forte impatto sulla salute.



- [1] A. D. Ellington, J. W. Szostak: *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*, Nature, 346 (1990) 818.
- [2] C. Tuerk, L. Gold: *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA*, Science, 249 (1990) 505.
- [3] Y. Lyu *et al.*: *Generating cell targeting aptamers for nanotheranostics using cell-SELEX*, Theranostics, 6 (2016) 1440.
- [4] R. Cataldo, M. Leuzzi, E. Alfinito: *Modelling and development of electrical aptasensors: a short review*, Chemosensors, 6 (2018) 20.
- [5] C. Chen, S. Zhou, Y. Cai, F. Tang: *Nucleic acid aptamer application in diagnosis and therapy of colorectal cancer based on cell-SELEX technology*, NPJ precision oncology, 1 (2017) 1.
- [6] Z. G. Yu, R. Y. Lai: *A reagentless and reusable electrochemical aptamer-based sensor for rapid detection of ampicillin in complex samples*, Talanta, 176 (2018) 619.
- [7] E. Alfinito, L. Reggiani: *Role of topology in electrical properties of bacterio-rhodopsin and rat olfactory receptor 17*, Physical Review E, 81 (2010) 032902.
- [8] E. Alfinito, J. F. Millithaler, L. Reggiani, N. Zine, N. Jaffrezic-Renault: *Human olfactory receptor 17-40 as an active part of a nanobiosensor: a microscopic investigation of its electrical properties*, Rsc Advances, 1 (2011) 123.
- [9] E. Alfinito, J. F. Millithaler, L. Reggiani: *Charge transport in purple membrane monolayers: A sequential tunneling approach*, Physical Review E, 83 (2011) 042902.
- [10] J. J. Regan, S. M. Risser, D. N. Beratan, J. N. Onuchic: *Protein electron transport: Single versus multiple pathways*, The Journal of Physical Chemistry, 97 (1993) 13083.
- [11] E. Alfinito, J. Pousset, L. Reggiani: *Proteotronics: Development of Protein-Based Electronics*, Pan Stanford Publishing, Singapore (2015).
- [12] H. M. Berman *et al.*: *The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics*, Nature structural biology, 7 (2000) 957.
- [13] R. Cataldo, E. Alfinito, L. Reggiani: *Hierarchy and assortativity as new tools for binding-affinity investigation: the case of the TBA aptamer-ligand complex*, IEEE transactions on nanobioscience, 16 (2017) 896.
- [14] E. Alfinito, L. Reggiani, R. Cataldo, G. De Nunzio, L. Giotta, M. R. Guascito: *Modeling the microscopic electrical properties of thrombin binding aptamer (TBA) for label-free biosensors*, Nanotechnology, 28 (2017) 065502.
- [15] I. Russo Krauss *et al.*: *High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity*, Nucleic acids research, 40 (2012) 8119.
- [16] A. Gosai, X. Ma, G. Balasubramanian, P. Shrotriya: *Electrical stimulus controlled binding/unbinding of human thrombin-aptamer complex*, Scientific Reports, 6 (2016) 1.
- [17] R. Albert, A. L. Barabási: *Statistical mechanics of complex networks*, Rev. Mod. Phys., 74 (2002) 47.
- [18] HLH Across Speciality Collaboration, P. Mehta *et al.*: *COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression*, Lancet, 395 (2020) 1033.
- [19] A. D. Gelinas *et al.*: *Crystal structure of interleukin-6 in complex with a modified nucleic acid ligand*, Journal of Biological Chemistry, 289 (2014) 8720.

- [20] P. C. Heinrich, J. V. Castell, T. Andus: *Interleukin-6 and the acute phase response*, *Biochemical journal*, 265 (1990) 621.
- [21] J. B. Moore, C.H June: *Cytokine release syndrome in severe COVID-19*, *Science*, 368 (2020) 473.
- [22] E. Somers, M. Stahl, J. S. Seehra: *A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling*, *The EMBO journal*, 16 (1997) 989.
- [23] B. Bonanni *et al.*: *Single molecule recognition between cytochrome C 551 and gold-immobilized azurin by force spectroscopy*, *Biophysical Jour.*, 89 (2005) 2783.
- [24] E. Alfinito, M. Beccaria, M. Ciccarese: *Biosensing cytokine IL-6: A comparative analysis of natural and synthetic receptors*, *Biosensors*, 10 (2020) 106.
- [25] M. Boulanger, D. C. Chow, E. E. Brevnova, K. C. Garcia: *Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 α -receptor/gp130 complex*, *Science*, 300 (2003) 2101.
- [26] C. Blanchetot *et al.*: *Structural mimicry of receptor interaction by antagonistic interleukin-6 (IL-6) antibodies*, *Jour. of Biological Chemistry*, 291 (2016) 13846.
- [27] S. Shaw *et al.*: *Discovery and characterization of olokizumab: a humanized antibody targeting interleukin-6 and neutralizing gp130-signaling*, In *Mabs* (Vol. 6, No. 3, pp. 773-781) Taylor & Francis, Milton Park (UK) (2014).
- [28] M. Hirota *et al.*: *Chemically modified interleukin-6 aptamer inhibits development of collagen-induced arthritis in cynomolgus monkeys*, *Nucleic acid therapeutics*, 26 (2016) 10.
- [29] A. Klarenbeek *et al.* : *Combining somatic mutations present in different *in vivo* affinity-matured antibodies isolated from immunized Lama glama yields ultra-potent antibody therapeutics*, *Protein Engineering Design and Selection*, 29 (2016) 123.



Rosella Cataldo: è ricercatrice confermata di Informatica (INF/01), Università del Salento. Collabora con gruppi di ricerca interessati allo studio di metodologie statistico-computazionali per la modellazione della risposta fisica di biomateriali, e nell'utilizzo di metodiche di analisi in immagini biomediche.

Microscopia a forza atomica per lo studio delle proprietà citomeccaniche

Mariafrancesca Cascione, Valeria De Matteis, Rosaria Rinaldi

Dipartimento di Matematica e Fisica "E. De Giorgi", Università del Salento, Lecce

1. Overview

Da numerosi decenni il legame tra Biomeccanica e Medicina è oggetto di notevole attenzione da parte della comunità scientifica al fine di stabilire una connessione tra struttura cellulare, funzione biologica, proprietà meccaniche e stato di salute/malattia.

In particolare, la meccanobiologia costituisce oggi uno tra i settori emergenti della ricerca di base; essa si focalizza prima sulla comprensione del ruolo che le forze fisiche giocano nella comunicazione e nella regolazione delle funzioni cellulari, poi sul coinvolgimento di tali forze nei processi più complessi come lo sviluppo dei tessuti e degli organi fino a comprendere l'origine e la progressione della malattia.

Le cellule costituiscono le unità fondamentali di tutti gli organismi viventi; in un uomo adulto si contano approssimativamente 10^{14} cellule eucariotiche e la loro morfologia varia a seconda della funzione biologica che esse svolgono.

L'assolvimento delle funzioni fisiologiche è

regolato da una serie di eventi intra ed extracellulari, molti dei quali coinvolgono fenomeni meccanici; infatti, le cellule sono continuamente sottoposte a stimolazioni meccaniche: forze di taglio (dovute al flusso d'aria o di sangue), forze di compressione (dovute al movimento delle cellule attraverso i tessuti), tensione (trasmessa dalle cellule aderenti o dalla matrice extracellulare).

Le cellule rispondono a queste forze regolando la loro forma, l'organizzazione interna e il comportamento, mediante l'attivazione di *pathway* biochimici che inducono a valle una serie di risposte. Tra queste, l'alterazione dell'attività delle proteine transmembrana (proteine canale) e *up-* o *down-regulation* dell'espressione genica.

La cellula eucariotica è costituita da diversi componenti cellulari; tra questi la membrana plasmatica o cellulare, il citoscheletro, organelli intracellulari (lisosomi, mitocondri, apparato del Golgi) e nucleo, i quali concorrono a determinare il comportamento meccanico dell'intera cellula, giacché ciascun componente assolve a precise

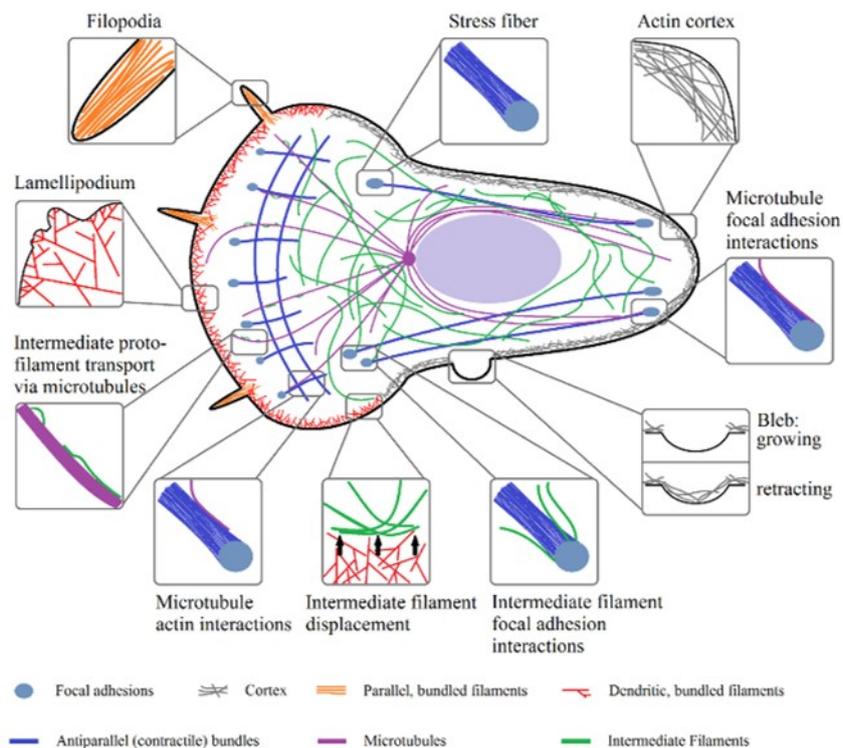


Figura 1: Rappresentazione schematica di actina, microtubuli e filamenti intermedi all'interno di una cellula e loro interazioni [1].

funzioni sia biologiche sia mecano-strutturali. In particolare, la membrana cellulare, che isola l'ambiente intracellulare dal microambiente extracellulare, non solo regola gli scambi di ioni e molecole, ma è anche in grado di trasferire le forze di carico percepite al citoscheletro. Quest'ultimo è un reticolo costituito da filamenti proteici fittamente interconnessi tra di loro i quali hanno la funzione di strutturare e organizzare il citoplasma determinando la forma della cellula.

Questi filamenti (Figura 1) sono di tre tipologie: filamenti di actina, microtubuli e filamenti intermedi. In particolare, i filamenti di actina e i microtubuli hanno un ruolo fondamentale nella generazione del movimento della cellula e degli organelli: infatti il citoscheletro può deformarsi facilitando la trasmissione dei segnali meccanici provenienti dall'ambiente extracellulare fino al nucleo e viceversa mediante la loro compressione o la trazione.

Il nucleo risente dello stimolo meccanico che si propaga all'interno della cellula grazie alla

presenza della lamina nucleare, costituita da un reticolo di filamenti intermedi presente al di sotto della membrana nucleare interna. L'impulso meccanico attiva o inibisce la trascrizione di specifici geni che conseguentemente attiveranno dei pathway biochimici tali da alterare la struttura citoscheletrica al fine di resistere alla forza percepita. Il citoscheletro, dunque, gioca un ruolo fondamentale nel processo di trasmissione del segnale fisico e nella risposta meccanica cellulare allo stimolo percepito.

Il processo mediante il quale le cellule rispondono alle forze meccaniche esterne può essere suddiviso in tre fasi: *meccanosensing*, *mechano-transduction* e *mechanoresponse*. La forza esercitata sulla superficie cellulare è percepita da recettori di membrana (*meccanosensing*) strettamente connessi alle fibre del citoscheletro; tale continuità meccanica permette alle forze di propagarsi nella cellula (*mechano-transduction*). Gli effetti della forza trasmessa sono specifici per ogni sistema; tuttavia, il processo di *meccanosensing* è lo stesso: le macromolecole sensibili allo stimolo meccanico promuovono un riarrangiamento

conformazionale per bilanciare la forza percepita. La nuova configurazione altera le funzioni specifiche associate a determinate molecole innescando altresì una cascata di eventi biochimici multipli (*mechanoresponse*).

Parallelamente la cellula, perturbata da uno stimolo di tipo chimico e/o da una mutazione genetica, può generare forze meccaniche che trasferisce al microambiente extracellulare, determinando alterazioni nell'espressione di alcune proteine mediante meccanismi di *feedback* positivi. Tale variazione può alterare le proprietà meccaniche dell'ambiente extracellulare, come l'elasticità e la viscosità, le quali verranno percepite da altre cellule vicine che, a loro volta, avvieranno una risposta meccanica di tipo adattativo.

Pertanto, la caratterizzazione del comportamento meccanico cellulare si configura come un elemento chiave per lo studio dell'insorgenza e la progressione di malattie, così come può essere utilizzata per caratterizzare la risposta citotossica all'esposizione di nanomateriali [2].

2. Tecniche di caratterizzazione

Negli ultimi anni, per quantificare le proprietà meccaniche di una singola cellula e dei principali componenti, sono state ottimizzate diverse tecniche di misurazione, le quali possono essere essenzialmente suddivise in tre categorie:

1. tecniche per misurare la deformazione indotta dall'applicazione di forze controllate su una parte o sull'intera cellula, tra cui la *magnetic twisting cytometry*, *micropipette aspiration*, *microplate manipulation*, *optical tweezers* e *atomic force microscopy*;
2. tecniche per monitorare la capacità cellulare di generare forze al suo interno che determinano una deformazione del suo microambiente, come la *traction force microscopy* e la *micropillar traction force*;
3. tecniche per quantificare le forze intracellulari, come la *multiple particle tracking microrheology*.

Ad oggi i lavori riportati in letteratura sulla caratterizzazione del comportamento citomeccanico sono principalmente stati realizzati usando

tecniche basate sullo studio della deformabilità del corpo cellulare, o analogamente della resistenza alla deformazione, valutata nel tempo, indotta da forze esterne controllate. In particolare, il microscopio a forza atomica è uno strumento di elezione giacché permette di investigare un'ampia gamma di campioni biologici, che vanno dalla singola biomolecola, alla cellula, fino ad un tessuto biologico.

2.1 Microscopia a forza atomica

Il microscopio a forza atomica appartiene alla famiglia dei microscopi a scansione di sonda (*scanning probe microscopes*, SPM), così chiamati proprio per indicare che l'osservazione della superficie del campione è ottenuta mediante l'interazione puntuale tra gli strati atomici superficiali del campione investigato e una sonda fisica che lo scansiona.

Per immaginare quello che succede durante una misura, possiamo pensare al nostro campione come un vinile e alla sonda come alla puntina di un giradischi; a seconda del tipo di interazione fisica che trasdotta elettronicamente permetterà di godere della musica che intendiamo ascoltare, potremmo distinguere diversi tipi di microscopi a scansione. In particolare, nel caso del microscopio a forza atomica (che da qui in poi indicheremo come AFM), la sonda, costituita da una punta fissata all'estremità libera di un *cantilever* flessibile, scansiona il campione ed interagisce puntualmente con la sua superficie. La forza punta-campione, che causa la deflessione del *cantilever*, è dovuta all'interazione tra gli atomi dell'estremità della punta e quelli della superficie vicino alla punta stessa. Essa può essere descritta, con buona approssimazione, dal potenziale di Lennard-Jones:

$$U(z) = U_0 \left[- \left(\frac{z_0}{z} \right)^6 + a_{12} \left(\frac{z_0}{z} \right)^{12} \right]$$

dove si è indicato con z la distanza relativa punta-campione e con z_0 la distanza di equilibrio a cui corrisponde il valore minimo del potenziale U_0 , e a_{12} è una costante.

Nell'espressione del potenziale di Lennard-Jones il primo termine descrive un'attrazione a lungo raggio portata dalle interazioni dipolo-dipolo mentre il secondo termine esprime

me una repulsione a breve distanza dovuta alla sovrapposizione degli orbitali atomici.

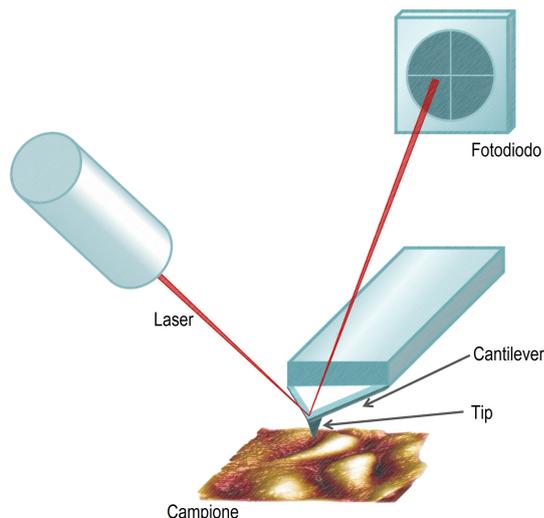


Figura 2: Set-up AFM di base. Una tip appuntita è fissata all'apice di un cantilever flessibile. Puntualmente, la forza di interazione tra punta-campione, in funzione della loro distanza relativa, è calcolata dalla deflessione subita dal cantilever. Quest'ultima è misurata sfruttando il principio della leva ottica.

La sonda di un AFM (figura 2), costituita da una tip molto appuntita (\sim pochi nm), è fissata all'estremità libera di un cantilever flessibile. Il movimento relativo della sonda rispetto alla superficie del campione è guidato da uno scanner piezoelettrico.

Quando la sonda scorre sulle superficie da investigare, il parametro z (corrispondente alla distanza relativa punta-campione) cambia puntualmente in funzione della topografia del campione stesso, a cui corrisponde una variazione della forza di interazione che induce una deflessione del cantilever. Tale deflessione è estremamente piccola da rilevare giacché le forze di interazione sono molto piccole ($<1\text{nN}$), così per quantificarla è necessario ricorrere al metodo della leva ottica, per cui sull'estremità del cantilever, in corrispondenza della punta, viene focalizzato un fascio laser: quando la flessione del cantilever cambia, l'angolo incidente del raggio laser sul cantilever viene modificato e di conseguenza anche la direzione del raggio riflesso. La posizione del raggio riflesso viene rilevata mediante un fotodiodo a due o a quattro quadranti (figura 2). In definitiva, mappando l'interazione locale tra la punta ed il campione, determinata indirettamente dalla

misura della deflessione del cantilever, sarà possibile ottenere immagini con elevata risoluzione ($\sim \text{\AA}$) della superficie investigata.

Le proprietà meccaniche locali della superficie possono essere studiate usando lo AFM in modalità spettroscopia di forza. Anche per questo caso si tratta di un'analisi puntuale in cui la forza di interazione tra la punta e il campione è legata alla loro distanza relativa.

L'indentazione, introdotta all'inizio degli anni '70 e poi ottimizzata dallo sviluppo tecnologico, è oggi una metodologia convenzionale per stimare le proprietà elastiche dei materiali a livello micro- e nanometrico ad alta risoluzione.

Questo metodo si basa su una punta in grado di penetrare nel campione e di deformarlo. La forza di interazione aumenta con la riduzione della distanza relativa punta-campione, passando da zero a un valore massimo e tornando a zero quando la punta è posizionata nuovamente nel punto di partenza.

Idealmente, le curve forza-distanza forniscono la forza percepita dalla punta e la distanza punta-campione permettendo di determinare il modulo di Young locale. Nella pratica, questi valori non sono misurati direttamente: la distanza punta-campione d si ottiene per sottrazione dello spostamento z -piezo (che muove la sonda o il campione a seconda della configurazione AFM) e la deflessione del cantilever, che deve essere calibrato per ogni esperimento. Inoltre i valori della forza sono calcolati utilizzando la legge di Hooke ad ogni deflessione del cantilever.

La misura della forza è composta da due curve corrispondenti all'avvicinamento e alla ritrazione della sonda (figura 3) [3].

Come mostrato nella figura 3, è possibile discriminare varie porzioni [4]. Il cantilever e il campione sono inizialmente lontani e non interagiscono (1). Successivamente la sonda si avvicina alla superficie del campione e percepisce forze attrattive a lungo raggio che deviano il cantilever verso il basso: queste forze sono principalmente forze di Van der Waals (dovute all'interazione intermolecolare), ma sono coinvolte anche forze elettrostatiche. Quando l'intensità del gradiente di forza attrattiva (pendenza della curva) supera il contatto elastico del cantilever k_c , la punta entra in contatto con il campione. In questo momento inizia l'indentazione e una deformazione - ela-

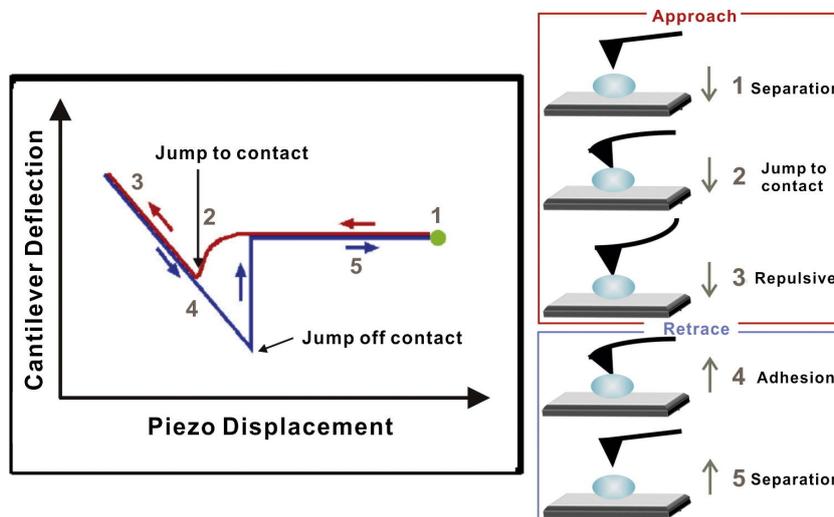


Figura 3: Rappresentazione schematica della curva forza-distanza. Le fasi di approccio e retrazione sono mostrate nella figura a destra [3].

stica, in prima approssimazione - è indotta sul campione (2-3). Non appena la forza di interazione punta-campione raggiunge il valore massimo, impostato dall'operatore, la sonda viene ritirata dal campione ma l'adesione stabilita tra punta e superficie del campione mantiene ancora il contatto (4) fino alla distanza corrispondente al punto di contatto instabile in cui la costante elastica del *cantilever* supera il gradiente della forza di interazione e la punta perde definitivamente il contatto (5).

La modalità di forza non fornisce informazioni topografiche ed in generale richiede che le superfici da caratterizzare siano pulite ed omogenee. Queste condizioni sono praticamente impossibili da soddisfare a causa dell'intrinseca eterogeneità dei campioni biologici e della presenza di una soluzione *buffer* in cui tali campioni sono mantenuti al fine di preservare l'omeostasi mimando il naturale ambiente fisiologico cellulare. Per queste ragioni è necessario raccogliere e analizzare una grande quantità di curve di forza.

Per superare questi limiti è stata introdotta la possibilità di acquisire immagini forza-volume (FV) con la quale è possibile acquisire simultaneamente dati di topografia e di interazione punta-campione su un'area specifica, creando una immagine topografica in cui ad ogni *pixel* corrisponde una curva forza-distanza (Figura 4).

Le curve forza-distanza collezionate contengono molte informazioni sulle proprietà della superficie del materiale, esse però non so-

no direttamente accessibili ma possono essere estratte analizzando opportunamente i dati di indentazione; a tal fine sono stati sviluppati diversi metodi empirici o semi-empirici basati sulla teoria della meccanica del contatto.

Quando due corpi vengono messi in contatto subiscono una deformazione che coinvolge principalmente la regione di contatto le cui dimensioni variano con la geometria delle superfici coinvolte; dunque, per ottenere informazioni sulle proprietà meccaniche di un materiale è necessario stabilire la relazione tra la forza applicata a un corpo e la sua corrispondente deformazione. In linea di principio la deformazione non è solo dovuta alla forza applicata, ma è anche influenzata dalle forze intermolecolari tra le superfici; queste sono trascurabili su macroscale, ma giocano un ruolo importante quando le dimensioni diminuiscono.

I primi studi di meccanica del contatto furono realizzati da Hertz. Egli sviluppò un modello teorico per descrivere le deformazioni locali, continue e piccole di un semispazio elastico sottoposto a un carico applicato da una sfera. Le ipotesi di partenza sono necessarie per poter sfruttare la teoria classica dell'elasticità lineare; Hertz inoltre trascurò completamente il contributo alla deformazione indotto dalle forze di attrito e di adesione. Queste ultime furono prese in considerazione nella teoria JKR, ottenuta dai contributi di Johnson, Kendall e Roberts [5], in cui si assume che le forze adesive deformino la superficie solo

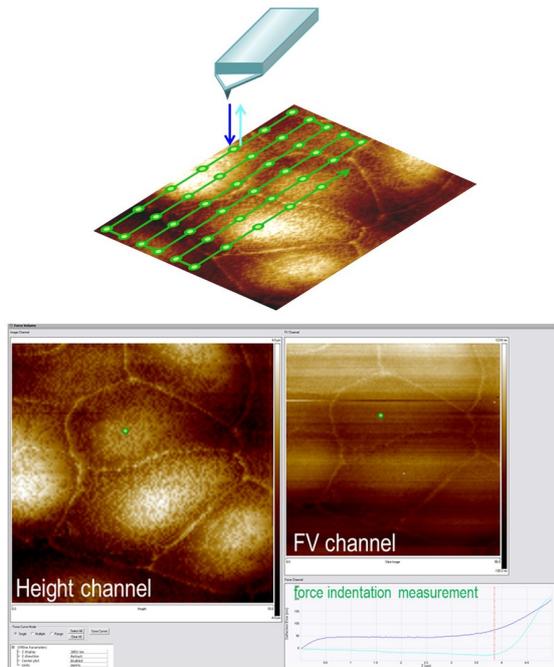


Figura 4: Rappresentazione schematica della modalità di lavoro force-volume. Nell'immagine in alto, la linea verde indica il movimento raster della sonda AFM sulla superficie del campione. Nei punti indicati la punta esegue un ciclo completo di indentazione. Nell'immagine in basso è riportato uno screen dell'interfaccia del software di acquisizione e analisi: è possibile visualizzare contemporaneamente la topografia (height channel) ed il canale force volume (FV channel). I pixel delle due immagini sono biunivocamente correlati, così ad ogni pixel del canale di topografia corrisponde una curva forza-distanza.

all'interno della regione di contatto. Al contrario Derjaguin, Muller e Toporov presentarono un modello (DMT) in cui le forze adesive agiscono solo all'esterno della regione di contatto, mentre all'interno della stessa considerarono valido il modello di Hertz [6]. Le teorie JKR e DMT possono essere assunte come casi estremi della stessa teoria e per studiare i casi tra queste condizioni limite vengono sviluppati diversi modelli. Maugis ha formulato una teoria più completa per risolvere il problema del contatto meccanico, ma la sua complessità ne limita le applicazioni [7]

Nonostante il continuo sviluppo nella modellazione delle proprietà meccaniche dei campioni biologici, la teoria del contatto di Hertz ha un ruolo fondamentale nell'analisi dell'elasticità delle singole cellule, ma risulta valida solo nel caso

di un indentatore sferico. Sneddon estese, apportando delle correzioni, il modello di Hertz a qualsiasi solido di rotazione [8]. Anche questo modello è valido per deformazioni elastiche lineari; tuttavia è possibile tener conto del contributo plastico alla deformazione introducendo dei fattori di correzione, come proposto da Oliver e Pharr [9], i quali assunsero che un recupero completamente elastico del materiale è possibile solo nella porzione iniziale della fase di scarico, mentre la fase di carico è caratterizzata da un comportamento elasto-plastico. Questo modello però continua a trascurare le forze adesive all'interfaccia.

Da questo breve e conciso excursus è palese come lo sforzo per modellizzare completamente la meccanica di contatto tra due corpi non sia un esercizio banale. Oggi si ricorre a script computazionali che calcolano in modo ricorsivo gli errori per ottenere un fit ottimale delle curve sperimentali di indentazione.

2.2 Applicazione della microscopia a forza atomica in campo biologico

Alla fine degli anni '80 la microscopia a forza atomica viene sviluppata per caratterizzare le superfici di solidi non conduttivi come polimeri, ceramiche, materiali compositi e vetro; successivamente, grazie alla possibilità di lavorare in liquido, l'applicazione dello AFM è stato esteso all'ambito biologico fino a diventare oggi uno strumento molto interessante e spendibile dal punto di vista della ricerca biomedica incentrata specialmente sulla comprensione di meccanismi specifici a livello sia cellulare sia di singola biomolecola.

Caratterizzazione meccanica della membrana cellulare come indicatore dello stato di salute della cellula

Per poter analizzare cellule vitali (*in living*) utilizzando l'AFM, è necessario che esse crescano in adesione su un substrato specifico a volte opportunamente funzionalizzato; pertanto le cellule aderenti sono maggiormente adatte per queste misure. Le linee cellulari che crescono in sospensione richiedono uno *step* di fissazione con aldeidi: questo trattamento blocca le cellule perdendo così la condizione di vitalità e non poten-

do più valutare la risposta dinamica allo stimolo indotto.

L'AFM è utilizzato per analizzare la morfologia di diversi tipi cellulari, spaziando da cellule nervose a cellule con caratteristiche completamente diverse, come le cellule renali. In particolare, nelle cellule gliali possono essere analizzati i mitocondri, i canali del calcio sul terminale nervoso presinaptico [10, 11] e anche le vescicole sinaptiche, ottenendo informazioni riguardanti la loro forma e le loro dimensioni [12]. Sulla superficie delle cellule dell'apparato gastrointestinale e del tubulo renale è possibile visualizzare anche alcuni elementi tipici della membrana apicale di questi tessuti, ossia i microvilli; in tal caso il processo di fissazione deve essere necessariamente effettuato poiché la scansione con l'AFM *in living* potrebbe deformare la struttura cellulare.

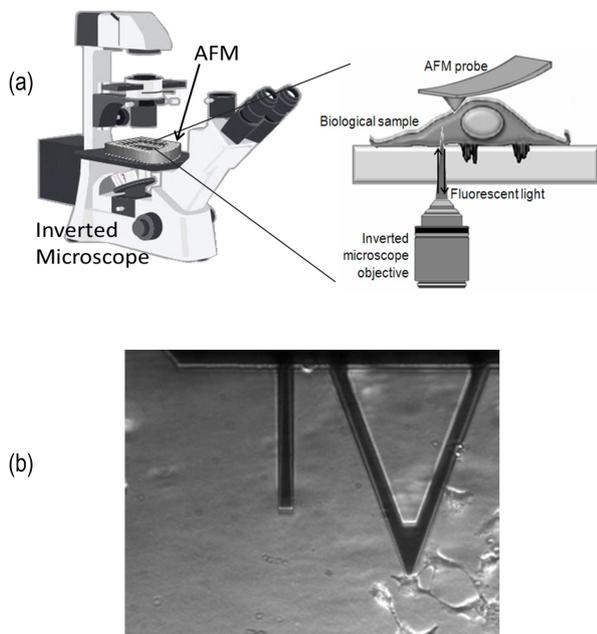


Figura 5: (a) Rappresentazione schematica di AFM assemblato su un microscopio ottico invertito. (b) Immagine ottica (obiettivo 20x) Posizionamento della punta AFM sulla superficie di una cellula [14].

Anche i meccanismi di migrazione cellulare possono essere analizzati mediante AFM grazie all'analisi di alcune sottili proiezioni citoplasmatiche, quali filopodi e lamellipodi, che si formano sul fronte di avanzamento delle cellule. Inoltre possono essere studiati i riarrangiamenti citoscheletrici, il citoplasma, i movimenti di organelli e vescicole e infine le giunzioni cellulari. È

possibile anche analizzare il rilascio di particelle virali da cellule infettate da virus.

Modificando la geometria e funzionalizzando la punta dell'AFM con opportuni gruppi chimici, è possibile eseguire una innumerevole serie di studi che possono riguardare aree molto ridotte della superficie o l'intero corpo cellulare [50]. L'applicazione della forza alla singola cellula induce una risposta che si manifesta in un rimodellamento del citoscheletro e quindi della forma cellulare; tale risposta è puntuale e dipende dalla durata e dall'intensità della forza applicata.

Negli ultimi anni, sono state studiate usando la microscopia a forza atomica le proprietà meccaniche di diverse tipologie di linee cellulari, come cellule della prostata, della vescica, dell'epitelio polmonare [13], del seno, del sangue e delle ossa. In genere non si tratta di misure assolute ma relative: si caratterizza come varia il comportamento meccanico cellulare a seguito di uno stimolo biologico, chimico o fisico.

Per comprendere la forte connessione tra i *pathways* biochimici e le risposte citomeccaniche possono essere effettuati studi sistematici sulle proprietà meccaniche delle cellule in funzione delle loro condizioni fisiologiche. Per ottenere una conoscenza più approfondita di questo argomento, i dati acquisiti dall'AFM devono essere confrontati con quelli derivati da altre tecniche, principalmente microscopia ottica e in fluorescenza.

In questa prospettiva sono stati effettuati molti studi condotti in parallelo. In alcuni casi, però, i risultati ottenuti con le diverse tecniche possono essere difficili da correlare data l'eterogeneità del campione investigato. Per superare queste problematiche sono stati sviluppati sistemi ibridi che permettono la visualizzazione del campione sia con un sistema ottico che con la microscopia a forza atomica.

In particolare, utilizzando una configurazione microscopica invertita, è possibile analizzare il campione sia dal basso, con la microscopia ottica, sia dall'alto mappando la sua superficie per mezzo della sonda AFM (Figura 5a); quindi il *set-up* ibrido è usato per registrare simultaneamente acquisizioni AFM e quelle di microscopia a luce trasmessa.

L'integrazione dell'AFM con un microscopio ottico aumenta fortemente le prestazioni di en-

trambe le tecniche. Dal punto di vista pratico, il loro accoppiamento facilita il posizionamento della sonda AFM sul campione scelto (Figura 5b): questo è fondamentale nei casi sperimentali che richiedono la funzionalizzazione della punta. Inoltre, l'aggiunta di componenti specifici al *set-up* permette molte configurazioni: tra queste, la combinazione della microscopia a fluorescenza con la quella a forza atomica permette di valutare contemporaneamente alcuni processi biologici in termini di variazioni meccaniche e morfologiche.

L'AFM può essere combinato con la microscopia a confocale (CLSM) in modo da valutare in tempo reale l'effetto dello *stress* meccanico su definite strutture cellulari opportunamente marcate con specifici fluorocromi. L'AFM può essere accoppiata con la *stimulated emission depletion microscopy* (STED), che fornisce visualizzazione a maggiore risoluzione rispetto alla fluorescenza in microscopia confocale.

Per studiare un evento biologico nella regione di contatto cellula-substrato, la microscopia TIRF è ampiamente utilizzata. La sua implementazione in un sistema ibrido con AFM permette di visualizzare le forze di trasmissione all'interno di alcune tipologie cellulari, come le cellule endoteliali, o di cellule polarizzate, permettendo la visualizzazione di membrane apicali e basali.

Il sistema integrato e le sue applicazioni sono stati analizzati nella review intitolata "Atomic Force Microscopy combined with Optical Microscopy for Cell Investigation".

Nonostante i recenti progressi della tecnica AFM, gli studi sui campioni biologici rimangono ad oggi molto complicati da eseguire ed interpretare; ciò è dovuto principalmente sia all'eterogeneità degli elementi strutturali costituenti la cellula, sia alla possibilità che ciascuna cellula si trovi in uno specifico momento del proprio ciclo vitale.

La caratterizzazione delle proprietà meccaniche della membrana cellulare risente inoltre della profondità di indentazione. Per tale ragione il protocollo sperimentale convenzionalmente usato impone che essa sia inferiore al 10-15 % rispetto all'altezza cellulare. A queste profondità la risposta meccanica cellulare è essenzialmente dovuta alla rete di filamenti di actina corticale,

i quali, essendo organizzati in modo disomogeneo, determinano una distribuzione dei valori del modulo elastico sulla membrana cellulare. Tuttavia il contributo di elementi subcellulari più profondi può fornire dati importanti per comprendere al meglio il comportamento meccanico nella progressione della malattia.

L'AFM è anche utilizzato per studiare le proprietà di adesione dei campioni biologici (cellule, specifici compartimenti cellulari, molecole). Infatti un'appropriata funzionalizzazione della punta, mediante cellule o proteine, offre la possibilità di manipolare e sondare molecole adese alla superficie cellulare (recettori, sensori e trasduttori). In questo modo si possono studiare le singole molecole misurando le forze intermolecolari e intramolecolari, quindi sviluppare nuove strategie per il rilascio controllato di farmaci.

Alcuni casi di studio:

- Progressione tumorale
Per comprendere meglio i meccanismi biofisici alla base dell'insorgenza e della progressione tumorale, sono stati realizzati numerosi studi volti a caratterizzare la variazione delle proprietà meccaniche nelle cellule tumorali primarie sia rispetto alla loro controparte benigna, sia rispetto a quella metastatica.

In linea generale è stato ampiamente osservato che le cellule tumorali sono molto più soffici rispetto alle cellule sane; ad esempio, le cellule del cancro della vescica umana posseggono una elasticità maggiore rispetto alle normali cellule epiteliali e che le cellule MCF-7 del cancro al seno umano sono più morbide delle cellule MCF-10.

Numerose evidenze sperimentali riportate in letteratura scientifica dimostrano come le cellule di adenocarcinoma metastatico (polmone, seno e cancro del pancreas), benché morfologicamente simili alle cellule sane secondo l'analisi istopatologica, presentino un comportamento meccanico profondamente diverso [13, 16]. Analoghi risultati sono stati ottenuti quantificando i valori del Modulo di Young delle cellule tumorali polmonari PC-9 [17].

Lo studio della variazione delle proprietà meccaniche cellulari può aiutare a comprendere il processo di transizione epitelio-mesenchimale. Tale fenomeno risulta alla base della progressione tumorale e della metastatizzazione [18]: le cellule diventano più soffici, perdono l'aderenza con le cellule vicine e con la matrice extracellulare, migrando nei tessuti circostanti [19]. Nel dettaglio, le cellule epiteliali, perdendo la loro polarità (apicale-basale) e la loro tipica architettura citoscheletrica, assumono un fenotipo simil-mesenchimale. Questa nuova conformazione rende le cellule più soffici, quindi capaci di penetrare nello stroma e raggiungere siti distali, viaggiando all'interno dei vasi sanguigni o linfatici.

Nel processo di metastatizzazione l'ambiente extracellulare gioca un ruolo chiave: gli stimoli meccanici trasmessi da una matrice extracellulare rigida (forza esogena) influenzano il comportamento cellulare e di conseguenza la tensione citoscheletrica (forza endogena). Questo signaling esterno attiva l'espressione di alcuni oncogeni e fattori trascrizionali; la loro deregolazione porta alla carcinogenesi, connettendo i segnali biochimici prodotti dagli oncogeni con il microambiente rigido e favorendo e sostenendo la trasformazione oncogenica.

L'adesione cellulare alla matrice extracellulare e la corrispondente risposta citomeccanica costituiscono processi fisiologici altamente correlati tra loro; pertanto la loro caratterizzazione rappresenta una strategia chiave per identificare l'impatto delle forze adesive sulla regolazione del comportamento cellulare.

- **Citotossicità indotta da esposizione a nanomateriali**
L'ultimo decennio il crescente utilizzo di nanoparticelle (NPs) in svariati prodotti commerciali e in applicazioni in campo medico ha sollevato diverse preoccupazioni circa la loro tossicità. Le proprietà chimico-fisiche delle NPs, cioè la dimensione, la forma, la carica superficiale, ecc. influenzano la loro interazione con membrana cellulare, organelli e strutture del citoscheletro,

innescando una serie di eventi che modificano le normali funzioni cellulari. Nonostante la comunità scientifica abbia rivolto molta attenzione sulle possibili conseguenze indotte dalle nanoparticelle *in vivo* ed *in vitro* dal punto di vista chimico-biologico [20], l'impatto sulla meccanica cellulare è ancora poco indagato.

Come precedentemente argomentato, L'AFM è stata ampiamente utilizzata per quantificare le alterazioni morfo-meccaniche indotte dalla progressione della malattia e/o per valutare gli effetti prodotti da farmaci specifici. Allo stesso modo questa tecnica potrebbe essere usata per capire come le NPs agiscono sulla meccanica cellulare influenzando specifiche funzioni cellulari.

In un recente lavoro sono stati infatti studiati i cambiamenti biomeccanici indotti da NPs di selenio (Se NPs) in linee cellulari di adenocarcinoma mammario (MCF-7). Tali NPs determinano l'insorgenza di alterazioni morfologiche a carico dei filamenti di actina provocando un aumento del modulo di Young. Le stesse cellule sono state utilizzate per testare NPs di argento (Ag NPs) rivestite di citrato. In questo caso le Ag NPs stimolano un'alterazione della struttura di organelli subcellulari (lisosomi e mitocondri), oltre alla riorganizzazione dell'*actina* corticale [22], che si riflette in una notevole riduzione della rigidità cellulare; tale risultato potrebbe provocare un distacco delle cellule dalla membrana basale, innescando il processo di metastatizzazione.

In altri studi è stato visto come altre tipologie di NPs possono provocare un effetto opposto sulla meccanica cellulare che però dipende anche dalla linea cellulare utilizzata. Per esempio, le NPs di ossido di silicio (Si O₂ NPs) e di ossido di titanio (Ti O₂ NPs) possono provocare alternativamente un aumento o una diminuzione dell'elasticità di membrana a seconda della linea cellulare utilizzata (adenocarcinoma del colon e adenocarcinoma alveolare) [2]. L'aumento o la diminuzione del valore del modulo di Young ha conseguenze differenti sulla meccanica cellulare. In particolare, valo-

ri molto ridotti sono associati al fenomeno della progressione tumorale indotta dalla rottura delle giunzioni cellulari e alla conseguente migrazione nel tessuto circostante. Al contrario l'aumento del valore di modulo di Young può essere deleterio per tutti quegli eventi cellulari che richiedono mobilità cellulare, come lo sviluppo embrionale e la differenziazione cellulare. Quindi diversi tipi di NPs possono alterare o inibire la mobilità cellulare.

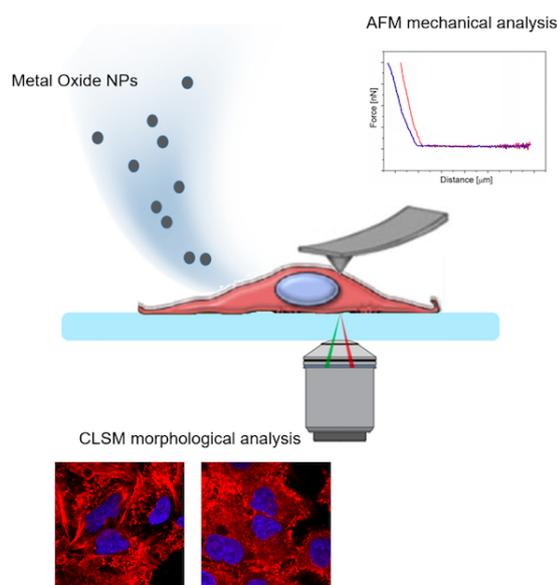


Figura 6: Studio della meccanica cellulare mediante AFM combinato con microscopia confocale per lo studio della tossicità indotta da NPs di ossido di metalli.

In questo scenario l'indagine biomeccanica (Figura 6) rappresenta un potente strumento per studiare la citotossicità delle NPs al fine di sviluppare nuovi protocolli basati sulla meccanica cellulare da abbinare ai test di tossicità standard. Il comportamento meccanico delle cellule potrebbe quindi predirne il destino e, indirettamente, anche la tipologia di patologie che potrebbero manifestarsi.

- Studi di *unfolding* proteico
L'insorgenza di malattie neurodegenerative è essenzialmente dovuta ad un'alterazione nel ripiegamento (*misfolding*) di alcune proteine presenti nella matrice extracellulare

del tessuto neuronale. L'alterato stato conformazionale, caratterizzato da una struttura a β -foglietto, rende queste proteine insolubili [93], tendendo così ad accumularsi sulla membrana cellulare e formando degli aggregati fibrillari amiloidi; la loro presenza induce una risposta citotossica e impedisce il corretto funzionamento delle cellule nervose.

Negli ultimi decenni la necessità di superare il limite di efficacia (in media del 30 %) delle attuali terapie farmacologiche in uso contro le patologie neurodegenerative, ha sollecitato lo sviluppo di approcci complementari a quelli propriamente biomedici. In particolare, nell'ultimo ventennio, sono stati condotti numerosi studi *in vitro* basati su evidenze sperimentali ottenute mediante dicroismo circolare, spettrometria di massa e spettroscopia infrarossa [96] tesi a caratterizzare la composizione e la conformazione degli aggregati amiloidi; queste tecniche, tuttavia, non riescono a risolvere le singole specie che compongono gli aggregati amiloidi.

La microscopia a forza atomica appare particolarmente utile per caratterizzare i singoli costituenti degli aggregati amiloidi su scala nanometrica, fornendo indicazioni circa le proprietà strutturali (altezza, larghezza e periodicità) e biofisiche (flessibilità, confezionamento di singoli protofilamenti all'interno di fibrille mature, citotossicità) di ciascuna specie costituente [23].

Inoltre, la recente applicazione di nuove metodologie basate su AFM, come la mappatura nanomeccanica quantitativa, rappresenta una metodologia proficua per caratterizzare il processo di *misfolding* dei monomeri e per chiarire i meccanismi molecolari del polimorfismo e della formazione dell'amiloide. Nelle misure di spettroscopia a forza atomica la sonda AFM è stata usata per allungare, comprimere e manipolare spazialmente le macromolecole di amiloide studiandone così il comportamento meccanico, tentando di quantificare le forze di interazione all'interno dei β -foglietti delle proteine amiloidi. Parallelamente, misure di nanoindentazione sono state eseguite per misurare i

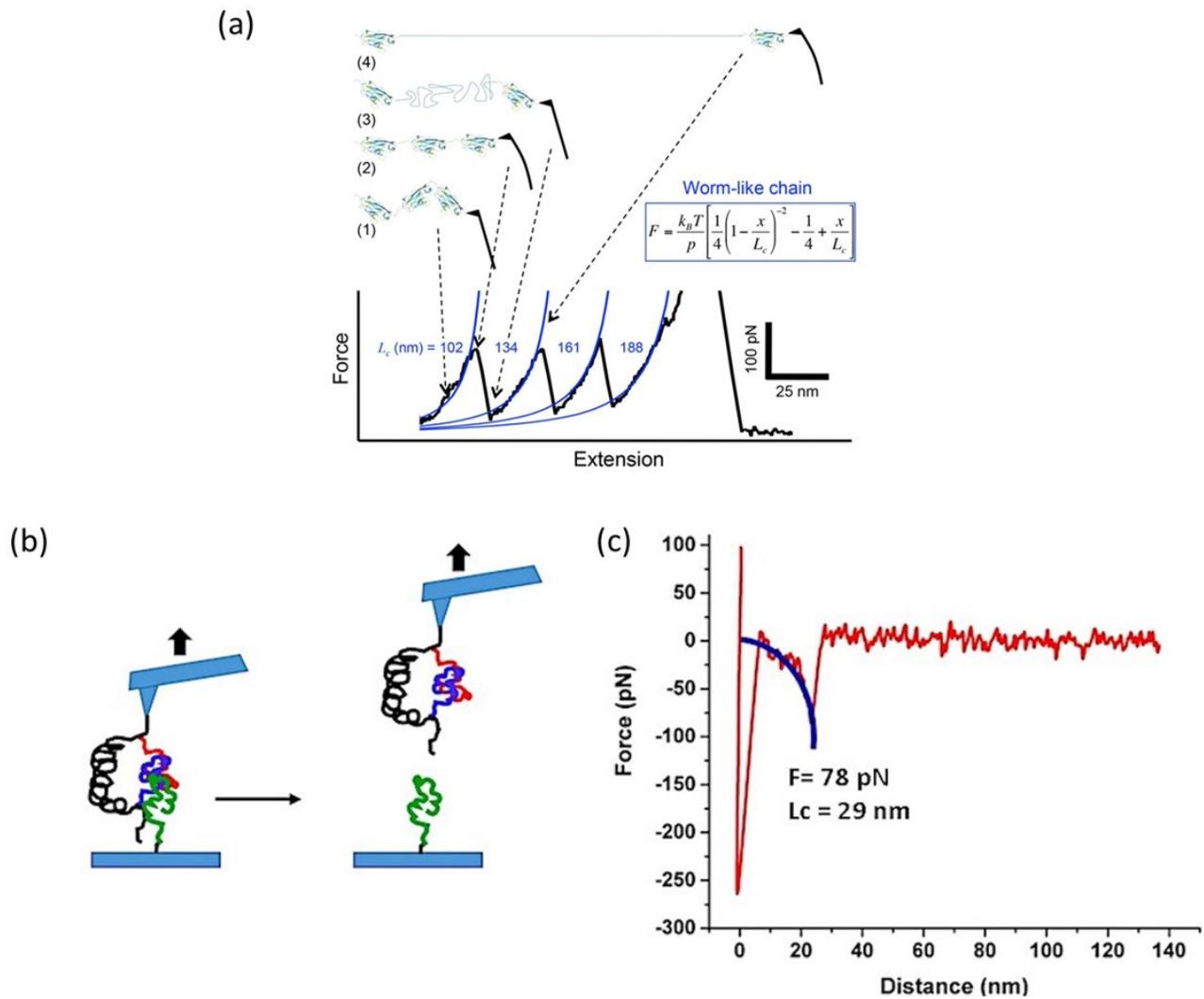


Figura 7: Schema rappresentativo dello studio di unfolding proteico mediante spettroscopia di forza (chemical force microscopy). Il regime iniziale della curva riflette l'allungamento del multimero Titina, seguito dallo spiegamento di un dominio, caratterizzato da un calo della forza. L'estensione forzata della catena polipeptidica dispiegata può essere spiegata dal modello worm like chain (WLC) [24]. (b) Rappresentazione schematica del set-up sperimentale AFM per l'analisi del trimero $A\beta_{42}$ (ciascun monomero è rappresentato da un colore diverso). (c) Tipica Curva forza-distanza; la curva blu si riferisce al WLC [25].

moduli elastici intrinseci di diverse classi di fibrille amiloidi mature (figura 8), come β -lattoglobulina, β -nucleina, $A\beta_{42}$, albumina, insulina, lisozima, e proteina Tau.

Le strategie di caratterizzazione basate sulla microscopia a forza atomica possono fornire informazioni fondamentali per comprendere il processo di aggregazione delle proteine mal ripiegate all'interno delle fibrille e delle placche amiloidi, suggerendo strategie farmacologiche innovative e altamente selettive, come la progettazione di molecole capaci di interferire le proteine mal

ripiegate impedendone l'aggregazione.



- [1] T. Hohmann, F. Deghani: *The Cytoskeleton - A Complex Interacting Meshwork.*, Cells, 8 (2019) 362.
- [2] V. De Matteis, M. Cascione, C. C. Toma, P. Pellegrino, L. Rizzello, R. Rinaldi: *Tailoring Cell Morphomechanical Perturbations Through Metal Oxide Nanoparticles*, Nanoscale Res. Lett., 14 (2019) .
- [3] S. Hsieh, T. Li, C.W. Hsieh, M.L. Kung, S.L. Hsieh, D.C. Wu, C.H. Kuo, M.H. Tai, H.M. Wang, W.J. Wu, B.W. Yeh: *Advances in cellular nanoscale force detection and manipulation*, Arab. J. Chem., 12 (2019) 3163.

- [4] B. M. Carpick, J. Bateas: *Scanning Probe Studies of Nano-scale Adhesion Between Solids in the Presence of Liquids and Monolayer Films*. Springer Handbook of Nanotechnology, Springer Handbooks. Springer, Berlin (2007).
- [5] K. L. Johnson, K. Kendall, A. D. Roberts: *Surface Energy and the Contact of Elastic Solids*, Proc. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Sci., 324 (1971) 1558.
- [6] B.V Derjaguin, V.M. Muller, Y. Toporov: *Effect of contact deformations on the adhesion of particles*, J. Colloid Interface Sci., 53 (1975) 314.
- [7] D. Maugis: *Adhesion of spheres: The JKR-DMT transition using a dugdale model*, J. Colloid Interface Sci., 150 (1992) 150.
D. Maugis: *Extension of the Johnson-Kendall-Roberts Theory of the Elastic Contact of Spheres to Large Contact Radii*, Langmuir, 11 (1995) 679.
- [8] I. N. Sneddon: *The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*, Int. J. Eng. Sci., 3 (1965) 47.
- [9] W. Oliver, G. An. Pharr: *An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments*, J. Mater. Res., 7 (1992) 1564.
- [10] E. H. V. Parpura, P.G. Haydon: *Three-dimensional imaging of living neurons and glia with the atomic force microscope*, J. Cell Sci., 104 (1993) 427.
- [11] E. H. Philip, G. Haydon, E. F. Stanley: *Localization of Individual Calcium Channels at the Release Face of a Presynaptic Nerve Terminal*, Neuron, 13 (1994) 1275.
- [12] P. G. H. V. Parpura, R. T. Doyle, T. A. Basarsky, E. Henderson: *Dynamic Imaging of Purified Individual Synaptic Vesicles*, Neuroimage, 2 (1995) 3.
- [13] S. E. Cross, Y. Jin, J. Rao, J. K. Gimzewski: *Nano-mechanical analysis of cells from cancer patients*, Nature Nanotechnology, 2 (2007) 780.
- [14] M. Cascione, V. De Matteis, R. Rinaldi, S. Leporatti: *Atomic force microscopy combined with optical microscopy for cells investigation*, Microsc. Res. Tech., 80 (2017) 109.
- [15] M. Lekka: *Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM*, BioNanoSci., 6 (2016) 65.
- [16] W. Xu, R. Mezencev, B. Kim, L. Wang, J. McDonald, T. Sulchek: *Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells*, PLoS One, 7 (2012) .
- [17] X. Deng, F. Xiong, X. Li, B. Xiang, X. Wu, C. Guo, X. Li, Y. Li, G. Li, W. Xiong, Z. Zeng: *Application of atomic force microscopy in cancer research*, J. Nanobiotech., 16 (2018) .
- [18] A. Dongre, R.A. Weinberg: *New insights into the mechanisms of epithelial - mesenchymal transition and implications for cancer*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 20 (2019) 69.
- [19] M. Cascione, S. Leporatti, F. Dituri, G. Giannelli: *Molecular Sciences Transforming Growth Factor- β Promotes Morphomechanical Effects Involved in Epithelial to Mesenchymal Transition in Living Hepatocellular Carcinoma*, Int. J. Mol. Sc., 20 (2019) 108.
- [20] V. De Matteis: *Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation*, Toxics, 5 (2017) 1.
- [21] J. Pi, F. Yang, H. Jin, X. Huang, R. Liu, P. Yang, J. Cai: *Selenium nanoparticles induced membrane bio-mechanical property changes in MCF-7 cells by disturbing membrane molecules and F-actin*, Bioorganic Med. Chem. Lett., 23 (2013) 6296.
- [22] V. De Matteis, M. Cascione, C.C. Toma, S. Leporatti: *Morphomechanical and organelle perturbation induced by silver nanoparticle exposure*, J. Nanopart. Res., 20 (2018) 273.
- [23] F.S. Ruggeri, J. Habchi, A. Cerreta, G. Dietler: *AFM-Based Single Molecule Techniques: Unraveling the Amyloid Pathogenic Species*, Curr. Pharm. Des., 22 (2016) 3950.
- [24] F. Rico, A. Rigato, L. Picas, S. Scheuring: *Mechanics of proteins with a focus on atomic force microscopy*, J. Nanobiotechnol., 11 (2013) .
- [25] S. Maity, Y.L. Lyubchenko: *AFM Probing of Amyloid-Beta 42 Dimers and Trimers*, Front. Mol. Biosci., 24 (2020) .



Mariafrancesca Cascione: è ricercatrice in Fisica della Materia presso il Dipartimento di Matematica e Fisica "E. De Giorgi" dell'Università del Salento. Si occupa di biofisica, in particolare di caratterizzazione delle proprietà morfomeccaniche cellulari in vitro, utilizzando tecniche di spettroscopia di forza combinate con indagini di fluorescenza, al fine di comprendere i meccanismi fisici sia alla base dell'insorgenza e della progressione di malattie come il cancro e le neurodegenerazione, sia quelli coinvolti nella risposta citotossica a seguito di esposizione a materiali nanostrutturati.

Valeria De Metteis: è ricercatrice presso il Dipartimento di Matematica e Fisica "E. De Giorgi" dell'Università del Salento. Nel 2020, è stata visiting researcher presso l'Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC) di Barcellona. Si occupa della sintesi e caratterizzazione di nanomateriali plasmonici e ibridi (organici/inorganici) con diverse proprietà chimico-fisiche, per studiare i meccanismi di interazione con cellule tumorali e valutare la risposta infiammatoria e meccanica, al fine di sviluppare nanosistemi responsivi a stimoli fisici per il trattamento del cancro e di altre patologie degenerative.

Rosaria Rinaldi: è professoressa di prima fascia di Struttura della Materia presso il Dipartimento di Matematica e Fisica "E. De Giorgi" dell'Università del Salento e associata all'Istituto di Microelettronica e Microsistemi del CNR. Dirige il

laboratorio di Nanobiotecnologie, Nanomedicina e Nanobioelettronica dell'Università del Salento ed è responsabile del laboratorio regionale Nabidit e del laboratorio BioOpenLab appartenente alla infrastruttura europea CERIC ERIC. È autrice di circa 330 pubblicazioni, 11 brevetti e diverse monografie.

Reti Neurali e Medicina di Precisione

Michele Caselle

*Dipartimento di Fisica - Università di Torino
Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Sez. di Torino, Torino, Italy*

La complessità e ricchezza dei dati a disposizione di biologi e medici è aumentata in modo impressionante in questi ultimi anni. Questa ricchezza di informazione rappresenta una sfida affascinante per chi fa ricerca in questo campo ed impone l'uso di metodi nuovi ed originali di analisi. In questo contributo vedremo due esempi di questi approcci innovativi, basati sull'uso delle reti neurali e di strumenti tipici della teoria delle reti e della meccanica statistica dei sistemi disordinati. Questo tipo di analisi può avere ricadute importanti in molti ambiti e soprattutto in quella che si chiama Medicina di Precisione e che è destinata a cambiare il modo di curare i pazienti e personalizzare le terapie nei prossimi anni.

Introduzione

Negli ultimi anni stiamo assistendo ad una sempre più forte integrazione tra Medicina e discipline quali Fisica, Matematica ed Informatica. Le motivazioni di questa integrazione sono essenzialmente due. La prima è che la grande quantità di dati a disposizione oggi richiede per essere analizzata metodi di inferenza che sono da sempre bagaglio dei fisici e dei matematici e strumenti informatici per manipolare questi dati che coinvolgono inevitabilmente le competenze degli informatici. La seconda è che si sta capendo

con sempre maggiore chiarezza che patologie complesse quali il cancro richiedono approcci complessi. Ad esempio, nel caso dei tumori, è ormai sempre più chiaro che ogni paziente ha un suo proprio modo di sviluppare il cancro con un insieme di alterazioni genetiche (i cosiddetti geni driver) che lo rendono in qualche modo unico. Riuscire ad identificare il più rapidamente possibile i geni driver del singolo paziente può aiutare il medico ad adattare i protocolli terapeutici e migliorare grandemente l'efficacia delle terapie. Questo nuovo approccio alle patologie complesse è noto come Medicina di Precisione¹ [1].

Parallelamente questo processo di integrazione ha permesso a fisici e matematici di allargare i loro orizzonti e scoprire nuovi ambiti in cui applicare gli strumenti di modellizzazione ed inferenza che sono il bagaglio tipico di ogni bravo fisico e matematico.

Tra i vari strumenti che i fisici hanno messo in campo in questi ultimi anni un ruolo speciale lo hanno avuto il vasto insieme di metodi ed idee che fanno uso della teoria delle reti e si appoggiano a tecniche di inferenza basate sull'intelligenza artificiale.

¹In origine si parlava a questo proposito di Medicina Personalizzata, ma si è giustamente osservato che da sempre il bravo medico è attento alle singole persone ed alle loro caratteristiche uniche ed irripetibili e la sua attività è, in questo senso, da sempre personalizzata. Si è quindi preferito il termine Medicina di Precisione che rende in modo più efficace il livello di accuratezza e, appunto, di precisione a cui sono arrivati oggi gli strumenti diagnostici

In questo contributo vorrei provare a raccontare due esempi di questi approcci che ho scelto sia per la rilevanza delle ricadute di tipo clinico che per la interdisciplinarietà dei metodi usati. Il primo si basa sull'utilizzo di una tecnica nota come *topic modelling* [2] per l'analisi di dati genomici (più precisamente, come vedremo tra poco, per l'analisi del livello di espressione dei singoli geni) in pazienti affetti da cancro. Il secondo utilizza una versione leggermente modificata di un modello molto noto in teorie delle reti, il cosiddetto *modello di Hopfield* [3], per identificare il particolare sottotipo tumorale di un dato paziente e permettere così al medico di adattare al singolo paziente la terapia. In entrambi i casi vedremo come si possa trasferire in ambito medico una conoscenza sviluppata in contesti diversi e apparentemente lontani (classificazione automatica dei testi per il *topic modelling* e studio dell'organizzazione delle memorie in una rete neurale per il *modello di Hopfield*) ma accomunati al nostro problema dall'alto livello di complessità ed eterogeneità dell'oggetto di studio.

Genoma, Trascrittoma e tipi cellulari.

Tutte le cellule del corpo umano condividono lo stesso genoma, cioè la stessa sequenza di DNA e gli stessi geni, ma le cellule dei diversi tessuti sono molto diverse tra loro. Questa differenza è dovuta al fatto che solo alcuni geni (quelli giusti!) in ogni tessuto sono espressi cioè sono tradotti in proteine, che sono i mattoni fondamentali di cui è fatta la cellula. Questo processo noto come *espressione genica* è finemente regolato ed è proprio la presenza di questa complessa rete di regolazione, che è uno dei principali oggetti di studio della moderna Biologia Molecolare, a spiegare la incredibile varietà e ricchezza di possibili tipi cellulari all'interno del corpo umano.

Il processo di espressione dei geni passa attraverso uno stadio iniziale in cui i geni (di nuovo, solo quelli giusti) vengono trascritti in una molecola, nota come RNA messaggero (mRNA), che viene successivamente tradotta nella corrispondente proteina². L'insieme degli RNA

²Il processo in realtà è molto più complesso, prevede una

serie di passaggi intermedi finemente regolati e in genere da un singolo gene è possibile produrre più proteine diverse, ma per la nostra discussione possiamo ignorare queste complicazioni.

messaggeri presenti in una cellula è noto come *Trascrittoma* e rappresenta una fotografia fedele dello stato della cellula e del tipo cellulare cioè, nel caso di tessuti sani, del tipo di tessuto a cui appartiene e, nel caso di tessuti tumorali, del particolare tipo di tumore. Grazie alle tecnologie sviluppate negli ultimi anni è oggi possibile ottenere il *Trascrittoma* di una cellula in modo abbastanza veloce ed economico e rapidamente questa tecnologia dai centri di ricerca si sta spostando in corsia. Lo studio dei livelli di espressione dei geni attraverso la quantificazione degli RNA messaggeri è destinato a diventare nel prossimo futuro il principale strumento diagnostico a disposizione dei medici ed è esattamente questo l'oggetto principale del nostro studio.

Tipicamente il risultato di un'analisi del trascrittoma si presenta come una lista di circa 20.000 numeri (quanti sono i geni che codificano le proteine nel genoma umano³) da cui vorremmo poter estrarre le informazioni che ci interessano. Ad esempio, nel nostro caso, il particolare tipo di tumore da cui è affetto il paziente che stiamo esaminando.

Per aiutare i medici in questo lavoro sono state create delle grandi banche dati dove sono raccolti molti di questi *Trascrittomi* con l'annotazione, eseguita da oncologi esperti, del particolare tipo di tumore da cui è stata estratta la biopsia e tutta una serie di altre importanti informazioni, quali il livello di gravità del tumore, le terapie a cui è stato sottoposto il paziente, quanto è sopravvissuto e così via. Il più importante di questi *database*, *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* [4], contiene più di 30.000 di questi *Trascrittomi* ed è continuamente aggiornato con nuovi dati sui pazienti e con nuove biopsie.

Il problema per il medico che ha in cura un paziente sembra a questo punto abbastanza facile: si tratta solo di capire, dato il *Trascrittoma* del paziente a quale è più simile tra quelli contenuti nel *database TCGA*. In realtà il problema è molto

serie di passaggi intermedi finemente regolati e in genere da un singolo gene è possibile produrre più proteine diverse, ma per la nostra discussione possiamo ignorare queste complicazioni.

³Negli esperimenti generalmente vengono anche valutati i livelli di espressione di tutta una serie di altri geni che non codificano per proteine ma, di nuovo, questo è un ulteriore livello di complessità che possiamo ignorare per la nostra discussione.

più complesso di quanto sembri perché questi dati sono estremamente eterogenei e bisogna cercare la risposta in uno spazio a 20.000 dimensioni (tante quanti i geni del Trascrittoma) la cui geometria ci è totalmente sconosciuta [5, 6].

Qui entrano in scena le reti neurali e diventa importante il contributo dei fisici e dei matematici abituati da tempo ad affrontare problemi di inferenza di questo livello di complessità

Il problema si può spezzare in due parti: innanzitutto una fase di analisi del database in cui si cercano le cosiddette *signatures* cioè collezioni di geni i cui livelli di espressione possano essere usati come firme (*signatures*) dei vari tipi e sottotipi tumorali e successivamente la costruzione di un classificatore che sia in grado di associare il Trascrittoma del paziente a cui siamo interessati alla più simile di queste *signatures*. Come già detto, entrambi questi passaggi sono meno semplici di quanto possa sembrare: la costruzione delle *signatures* richiede di interpretare correttamente le correlazioni esistenti tra i dati all'interno del *database*; il secondo passaggio richiede una nozione di somiglianza che dipende dalle caratteristiche dello spazio in cui questi dati sono immersi.

Esistono in letteratura moltissimi algoritmi per affrontare questi ostacoli. Come anticipato nell'introduzione, in questo contributo vorrei concentrarmi in particolare su due approcci che, oltre ad essere particolarmente efficaci, sono interessanti in sé come esempi di trasferimento di conoscenze tra ambiti diversi: l'uso del *topic modelling* per l'identificazione delle *signatures* e del modello di Hopfield per associare un dato Trascrittoma al più vicino sottotipo tumorale.

Gene signatures e topic modelling

Col termine *topic modelling* si intende quell'insieme di algoritmi che cercano di individuare in modo automatico l'argomento (*topic*) di un testo all'interno di un *corpus* testuale (ad esempio Wikipedia) a partire dalla frequenza delle parole che lo compongono [2]. L'uso di questo tipo di algoritmi per il nostro problema si basa sull'osservazione che la classificazione automa-

tica dei testi è in realtà molto simile al tipo di classificazione a cui noi siamo interessati. In questa analogia, il *corpus* di testi è rappresentato dal *database* TCGA, i testi sono i Trascrittomi dei singoli pazienti, i geni sono le parole da cui sono composti i testi e il livello di espressione di un gene in un particolare Trascrittoma sarà l'analogo della frequenza con cui una data parola appare in un dato testo. Infine, la cosa più importante, i *topic* sono le *signatures* a cui siamo interessati. Così come nell'applicazione ai testi il risultato della analisi con il *topic modelling* sarà identificare gli argomenti di cui parla un certo testo e allo stesso tempo raggruppare assieme tutti i testi che trattano dello stesso argomento, nell'applicazione al TCGA il risultato sarà associare ad ogni Trascrittoma un insieme di *signatures* che lo caratterizzano e raggruppare assieme Trascrittomi simili, caratterizzati dallo stesso insieme di *signatures* e quindi, si suppone, appartenenti allo stesso sottotipo tumorale.

Il più popolare degli algoritmi di *topic modelling* si chiama Latent Dirichlet Allocation (LDA) [7] e, come suggerisce il nome, assume come *prior* del processo di inferenza una distribuzione di Dirichlet per la probabilità dei *topic* nei testi. La scelta di questa distribuzione è particolarmente comoda per velocizzare gli algoritmi di inferenza usati, ma non ha nessuna ulteriore giustificazione. In particolare non c'è nessun motivo per cui debba essere la *prior* giusta per il problema a cui siamo interessati.

Negli ultimi anni c'è stato un interessante progresso in questo campo, che ha permesso di superare le limitazioni di LDA. In particolare si è capito che l'identificazione dei *topic* è equivalente al problema di trovare le comunità in un *network* bipartito [8] (si veda la figura 1) e si sono così potuti adattare al *topic modelling* una serie di algoritmi molto potenti elaborati negli anni scorsi nell'ambito della Teoria delle Reti [9]. In particolare uno di questi, una versione gerarchica dello Stochastic Block Modelling [10, 11], si è dimostrato lo strumento giusto per superare le limitazioni di LDA (in particolare per ricostruire i *topic* senza alcuna particolare assunzione a priori sulla loro distribuzione all'interno dei testi) e si adatta perfettamente alla applicazio-

ne a cui siamo interessati, caratterizzata da una grandissima eterogeneità dei dati [12].

L'aspetto più interessante di questo algoritmo è la sua natura probabilistica. Come risultato del processo di inferenza l'algoritmo restituisce una partizione ottimale dei geni e separatamente dei pazienti in gruppi (che chiameremo *topic* per i geni e *cluster* per i pazienti) e delle distribuzioni di probabilità $P(t|s)$ che un dato *topic* t sia associato ad un certo paziente s e la probabilità $P(g|t)$ che un dato gene g faccia parte di un *topic* t . Da queste due distribuzioni si possono ricostruire tutte le quantità di interesse ed in particolare le signatures di cui parlavamo prima [12].

Come funziona lo Stochastic Block Modelling gerarchico?

Lo Stochastic Block Modelling gerarchico (hSBM) è un algoritmo che cerca di massimizzare la probabilità che il modello θ (dove per modello si intende una particolare partizione di geni in *topic* e pazienti in *clusters*, convenzionalmente indicata con θ) descriva i dati \mathcal{A}

$$P(\theta|\mathcal{A}) = P(\mathcal{A}|\theta)P(\theta) \quad (1)$$

senza fare alcuna assunzione a priori.

Nella applicazione in cui siamo interessati \mathcal{A} , è la matrice di espressione genica i cui ingressi \mathcal{A}_{ij} rappresentano il numero (opportunitamente normalizzato) di RNA messaggeri del gene i nel paziente j . L'algoritmo si basa sul fatto che \mathcal{A} può anche essere interpretata come la matrice di adiacenza di un *network* bipartito pesato i cui nodi nei due *layer* sono rispettivamente i geni ed i pazienti ed i *link* del *network* (che essendo bipartito possono solo congiungere geni con pazienti e non geni o pazienti tra loro) hanno un peso dato proprio dal livello di espressione del gene i -esimo nel paziente j -esimo.

L'idea alla base dell'algoritmo è di associare ad ogni ingresso della matrice \mathcal{A} (che, lo ricordiamo, è un numero intero positivo che corrisponde al numero di RNA messaggeri di quel particolare gene in quel particolare paziente) un numero di legami, che chiameremo *edges* d'ora in poi, pari all'elemento di matrice.

A questo punto l'algoritmo che massimizza la probabilità è un semplice Montecarlo (cioè una catena di Markov le cui mosse sono pesate dalla

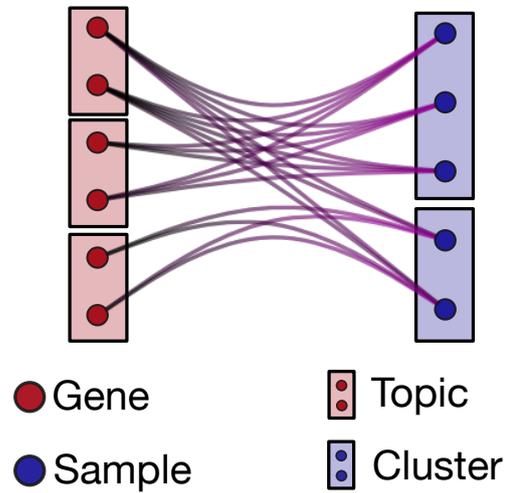


Figura 1: I dati di espressione genica di un set di pazienti possono essere rappresentati come un grafo bipartito. Nel layer di sinistra ci sono i geni, in quello di destra i pazienti ed i link che li collegano hanno un peso proporzionale al livello di espressione dei geni nei vari pazienti (ovvero gli ingressi della matrice \mathcal{A} che è interpretata come una matrice di adiacenza). Nella figura si vede anche il risultato dell'analisi con l'algoritmo di topic modelling, con i geni divisi in topics e i pazienti in clusters.

probabilità $P(\theta|\mathcal{A})$) che assume all'inizio una distribuzione casuale di geni nei *topic* e pazienti nei *cluster* e ad ogni mossa della catena sposta uno dei nodi (ad esempio un gene) da un *topic* all'altro accettando o rifiutando la mossa a seconda di come cambia la probabilità $P(\theta|\mathcal{A})$. Nell'algoritmo si studia, per comodità, non la probabilità ma il suo logaritmo cambiato di segno Σ che viene abitualmente chiamato *description length*

$$\Sigma = -\ln P(\mathcal{A}|\theta) - \ln P(\theta) .$$

L'obiettivo dell'algoritmo è minimizzare Σ , cioè trovare la configurazione di *cluster* e *topic* che descrive in modo più compatto i dati contenuti nella matrice \mathcal{A} ⁴

Ma la cosa interessante dell'algoritmo è che alla fine del processo di ottimizzazione non abbiamo semplicemente la partizione ottimale,

⁴Chi ha dimestichezza con l'entropia di Shannon riconoscerà immediatamente in questa definizione il fatto che per ogni distribuzione di probabilità P è possibile costruire un codice C tale che la lunghezza in bit di C è uguale a $-\log P$ e che il modello θ che meglio descrive i dati è sempre quello che li comprime meglio, cioè quello associato al più breve codice C .

ma possiamo anche ricavare facilmente le probabilità $P(t|s)$ e $P(g|t)$ che saranno date dalle relazioni:

$$P(t|s) = \frac{N_{t,s}}{N_s} \quad (2)$$

dove $N_{t,s}$ è il numero di half-edges (estremità degli edges) del grafo provenienti dal topic t che puntano sul paziente s e N_s è il numero totale di half-edges che puntano sul paziente s , mentre

$$P(g|t) = \frac{N_{t,g}}{N_t} \quad (3)$$

dove $N_{t,g}$ è il numero di half-edges del topic che puntano sul gene g , e N_t è il numero totale di half-edges che puntano sul topic t .

Sono queste probabilità che ci permettono di identificare i topic da associare ad un particolare gruppo (*cluster*) di pazienti (che saranno i topic con la più alta $P(t|s)$ mediata su tutti i pazienti del *cluster*) e di identificare all'interno dei topic i geni più importanti (quelli che massimizzano $P(g|t)$) che formeranno le *signatures* che stavamo cercando.

Una volta definite queste *signatures* possiamo affrontare la seconda parte del problema: costruire un classificatore che in modo affidabile ci dica qual è il particolare sottotipo tumorale del paziente che stiamo studiando.

I sottotipi tumorali come memorie di un cervello in cui i geni giocano il ruolo di neuroni

Il modello di Hopfield [3] è forse uno dei più eleganti esempi di applicazione della Meccanica Statistica alle Neuroscienze. È un modello che cerca di spiegare il funzionamento della memoria associativa cioè della capacità del cervello di ricostruire un intero ricordo partendo solo da un sottoinsieme degli elementi che lo compongono. Il modello è definito da un insieme di N variabili binarie $S_i(t) = \pm 1, i = 1...N$ che evolvono nel tempo e che interagiscono tra loro mediante una matrice di costanti di accoppiamento $J_{i,j}$ che possono prendere sia valori positivi che negativi. Il modello vuole essere una rappresentazione molto semplificata del cervello: gli S_i rappresentano i neuroni, il valore $S = +1$ indica che il neurone in quell'istante è attivo (*firing*), mentre $S = -1$

indica che il neurone è inattivo e i pesi J_{ij} rappresentano l'intensità delle connessioni sinaptiche tra i neuroni S_i e S_j che possono essere sia attivatorie (J_{ij} positivo) che inibitorie (J_{ij} negativo). In questa realizzazione le memorie che si vogliono ricordare sono opportuni *pattern* (etichettati dall'indice μ) $S_i = \xi_i^\mu$ di neuroni attivi o silenti. Nel seguito assumeremo di voler memorizzare nella rete P *pattern*, quindi $\mu = 1...P$. La configurazione dei neuroni evolve nel tempo secondo la regola:

$$S_i(t+1) = \text{sign} \left(\sum_j J_{ij} S_j(t) \right) \quad (4)$$

L'idea alla base del modello è scegliere i pesi sinaptici J_{ij} in modo che le memorie ξ_i^μ siano punti fissi della dinamica descritta dall'eq. (4). In questo modo se la configurazione iniziale è sufficientemente simile alla memoria che si vuole ricordare (e quindi è nel bacino d'attrazione del corrispondente punto fisso) dopo poche iterazioni dell'eq.(4) verrà attratta dal punto fisso. In altri termini, se un certo numero di neuroni è già allineato secondo la memoria a cui siamo interessati, la dinamica porterà anche tutti gli altri neuroni ad allinearsi nella direzione giusta e quando la configurazione memorizzata sarà raggiunta il processo si fermerà. Questo è esattamente ciò che si intende quando si parla di memoria associativa. Nelle applicazioni pratiche il numero di neuroni che devono essere allineati alla memoria nella configurazione iniziale per raggiungere il punto fisso giusto dipende da P e può essere anche molto basso.

La bellezza del modello sta nel fatto che esiste una regola molto semplice, detta regola di Hebb, che permette di far sì che i punti fissi coincidano con le memorie

$$J_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{\mu=1}^P \xi_i^\mu \xi_j^\mu \quad (5)$$

È facile rendersi conto che il modello, con poche modifiche (tre valori invece di due: +1 se il gene è molto espresso, -1 se è poco espresso, 0 se non appartiene a nessuna delle *signatures* utilizzate per classificare i tumori), si presta perfettamente al nostro scopo. Nell'applicazione come classificatore di tumori i neuroni del modello

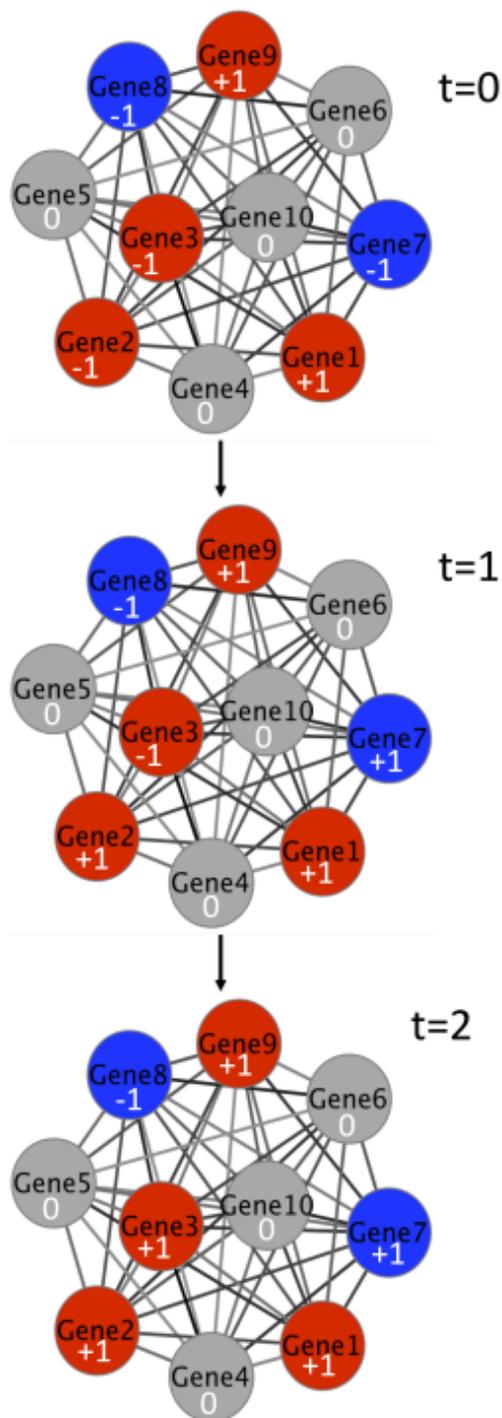


Figura 2: Evoluzione verso la configurazione di minimo del modello di Hopfield applicato alla classificazione dei tumori [13].

saranno i geni e le memorie (che definiscono le interazioni tra geni attraverso la regola di Hebb) saranno le signature dei vari tipi e sottotipi tumorali [13]. Inizializzando la rete con i valori dei livelli di espressione dei geni di un particolare paziente, la rete evolverà verso una delle sue

memorie permettendoci così di classificare rapidamente il paziente associandolo al particolare sottotipo tumorale che corrisponde alla memoria verso cui è stata attratta la configurazione iniziale [13]. Test su vari tipi diversi di tumori, con una ampia varietà di sottotipi da identificare, mostrano che l'algoritmo è veloce ed estremamente affidabile [13]. In fig.(2) si può vedere un esempio schematico del funzionamento del modello in un caso particolarmente semplice di classificazione binaria. Le memorie (signature) sono identificate dai colori rosso e blu (per semplicità abbiamo assunto memorie che non si sovrappongono). Nella parte alta della figura si vede la configurazione iniziale (definita dai valori +1 e -1) all'istante $t = 0$ e nei riquadri successivi l'evoluzione del sistema verso il minimo. Il paziente sarà associato alla signature rossa e quindi al corrispondente sottotipo tumorale.

Conclusioni

In questo contributo abbiamo visto due esempi di contaminazione tra discipline diverse. Metodi tipici dell'analisi dei testi (topic modelling) basati sulla meccanica statistica dei sistemi complessi (stochastic block modelling) e sulla teoria delle reti (ricostruzione di comunità su network binari) possono essere usati per risolvere problemi in Biologia Molecolare che sono estremamente difficili da affrontare con metodi di analisi più standard. Abbiamo anche visto come una rete neurale pensata per modellizzare la memoria associativa (il modello di Hopfield) possa essere adattata al problema di identificare in modo affidabile il particolare tipo di tumore da cui è affetto un dato paziente. Entrambi questi esempi mostrano la ricchezza e la potenza di un approccio interdisciplinare alla ricerca scientifica, approccio che è la cifra distintiva del modo di fare scienza in questo terzo millennio e che, ne sono sicuro, ci riserverà ancora bellissime sorprese nel prossimo futuro.



[1] E. A. Ashley, *Towards precision medicine*, Nature Reviews Genetics 17 (SEP, 2016) 507–522.

- [2] L. Liu, L. Tang, W. Dong, S. Yao, and W. Zhou, *An overview of topic modeling and its current applications in bioinformatics*, Springerplus 5 (SEP 20, 2016).
- [3] J. J. Hopfield. *Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities*, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 79(8) (1982) 2554.
- [4] K. Chang, C. Creighton, C. Davis, et al., *The cancer genome atlas pan-cancer analysis project*, Nature Genetics 45 (2013), no. 10 1113.
- [5] N. Andor, T. A. Graham, M. Jansen, L. C. Xia, C. A. Aktipis, C. Petritsch, H. P. Ji, and C. C. Maley, *Pan-cancer analysis of the extent and consequences of intratumor heterogeneity*, Nature Medicine 22 (JAN, 2016) 105+.
- [6] L. Ein-Dor, I. Kela, G. Getz, D. Givol, and E. Domany, *Outcome signature genes in breast cancer: is there a unique set?*, Bioinformatics 21 (JAN 15, 2005) 171–178.
- [7] D. M. Blei, A. Y. Ng, and M. I. Jordan, *Latent dirichlet allocation*, Journal of Machine Learning Research 3 (2003), no. Jan 993–1022.
- [8] M. Gerlach, T. P. Peixoto, and E. G. Altmann, *A network approach to topic models*, Science Advances 4 (2018), no. 7 eaaq1360.
- [9] S. Fortunato and D. Hric, *Community detection in networks: A user guide*, Physics Reports 659 (NOV 11, 2016) 1–44.
- [10] T. P. Peixoto, *Efficient monte carlo and greedy heuristic for the inference of stochastic block models*, Physical Review E 89 (Jan, 2014) 012804.
- [11] T. P. Peixoto, *Hierarchical block structures and high-resolution model selection in large networks*, Physical Review X 4 (Mar, 2014) 011047.
- [12] F. Valle, M. Osella, and M. Caselle, *A Topic Modeling Analysis of TCGA Breast and Lung Cancer Transcriptomic Data*, Cancers 12 (2020), no. 12 3799.
- [13] L. Cantini and M. Caselle, *Hope4Genes: a Hopfield-like class prediction algorithm for transcriptomic data*, Scientific Reports 9 (JAN 23, 2019).



Michele Caselle: è Professore di Fisica Teorica presso l'Università degli Studi di Torino. Si occupa da alcuni anni di applicazioni della Fisica dei Sistemi Complessi alla Biologia Molecolare.

Morfogenesi: una sfida interdisciplinare

Everything is made of atoms. That is the key hypothesis. The most important hypothesis in all of biology, for example, is that everything that animals do, atoms do.

In other words, there is nothing that living things do that cannot be understood from the point of view that they are made of atoms acting according to the laws of physics.

R. P. Feynman

Silvia Grigolon

Laboratoire Jean Perrin, Sorbonne Université & CNRS (UMR 8237)
4, Place Jussieu, 75005 Paris, France

Quali sono i processi e principi primi che permettono ad un organismo di assumere la sua forma funzionale per poter espletare tutte le funzioni vitali a partire da una cellula fecondata? Come questi processi interagiscono fra di loro attraverso le diverse scale biologiche, ovvero dalle cellule ai tessuti e viceversa? È possibile utilizzare le scoperte a questo riguardo per poter sviluppare terapie finalizzate a curare malformazioni e malattie dello sviluppo? In questo articolo, si illustreranno, dapprima, con una rassegna storica, la nascita dello studio dello sviluppo degli organismi da un punto di vista matematico quantitativo ed i diversi problemi da risolvere per rispondere alle domande sovraccitate; verrà poi fornita una panoramica degli approcci tecnici fisico-matematici utilizzati nella biofisica della Morfogenesi e di come questi possano integrare e siano integrati con la scienza speri-

mentale; si concluderà infine con una discussione delle sfide a lungo termine, non solo tecniche ma anche di sviluppo di una comunità interdisciplinare conscia delle potenzialità, limiti e soprattutto complementarità delle singole discipline e della sua fondamentale importanza per poter rispondere a domande fondamentali quali “Come si sviluppa la vita?”.

Introduzione

La **Morfogenesi** (dal greco *morphê*=forma e *genesis*=creazione) è l'insieme di tutti i processi che regolano lo sviluppo degli organismi viventi a partire da una cellula uovo fecondata. Per poter espletare tutte le sue funzioni vitali, l'organismo deve poter raggiungere una determinata forma ottimale. Lo sviluppo pertanto richiede l'interazione coordinata di diversi processi su diverse scale, spaziali e temporali, quali la divisione cellulare, la formazione di tessuti (insiemi di cellule) in grado di crescere, deformarsi

ma ciononostante mantenere integrità durante l'intero sviluppo, e la formazione di diversi organi, che costituiscono le macrounità funzionali fondamentali.

Come questi processi avvengono a partire da una singola cellula o da un insieme di cellule apparentemente omogenee nella loro composizione biochimica è ormai oggetto di studio da più di un secolo. I primi pionieri nello studio teorico della Morfogenesi furono D'Arcy Wentworth Thompson e Alan Turing, che con le loro intuizioni possono essere considerati i padri non solo dello studio quantitativo della biologia dello sviluppo ma soprattutto dell'odierna biofisica teorica.

Il lavoro principale dello scozzese D'Arcy Wentworth Thompson del 1917, intitolato "*On Growth and Form*" (Della crescita e della forma) [1], fu tra i primi a contrastare l'idea che l'evoluzione potesse fungere da unica forza motrice nell'acquisizione della forma funzionale da parte degli organismi, postulando l'ipotesi che anche le leggi fisiche e meccaniche giocassero un ruolo fondamentale nel governare non solo la crescita degli organismi stessi ma anche la speciazione. Nel suo lavoro notò le correlazioni presenti tra forme geometriche e forze meccaniche ed allo stesso tempo fra un problema tipicamente biologico ed un problema tipicamente fisico. Riportò infatti l'analogia tra la forma delle meduse e quella assunta da una particella liquida in un fluido viscoso o tra la struttura esagonale di un alveare e gli aggregati di bolle di sapone. Identificò le relazioni matematiche presenti in determinati fenomeni di crescita, come la fillotassi, ovvero l'ordine in cui foglie o rami nelle piante sono disposti in modo da seguire una spirale di Fibonacci, e la relazione fra superficie e volume di un organismo e la sua lunghezza.

Nonostante l'opera racchiuda in sé una quantità di esempi largamente maggiore, la selezione sovraccitata dimostra ampiamente l'intuizione formidabile, se non geniale, dell'autore, ovvero la correlazione fondamentale tra forze meccaniche e forme geometriche riproducibili e funzionali e l'esistenza di relazioni matematiche precise che regolano lo sviluppo e la crescita degli organismi.

Le innumerevoli osservazioni di D'Arcy Thompson segnarono l'inizio di quella che poi

si sviluppò come un'intera branca interdisciplinare, la biofisica, dove biologia, fisica e matematica non sono più discipline separate ma diversi approcci di studio da integrare per poter svelare i meccanismi fondamentali ed i principi primi su cui si basa il mondo naturale ed il suo funzionamento collettivo.

Tuttavia, pur non avendo pretesa di essere un testo quantitativo, l'opera di D'Arcy Thompson resta un testo descrittivo. Per poter osservare un primo studio quantitativo della Morfogenesi, bisogna aspettare un'altra opera fondamentale, ovvero l'articolo del 1952 di Alan Turing [2]. Turing fu il primo ad ipotizzare che la crescita degli organismi sia anzitutto regolata dalla distribuzione non uniforme nei tessuti di sostanze chimiche, che lui stesso denominò *morfogeni*, finalizzate a guidare il differenziamento cellulare, ovvero specificare la funzione che le diverse cellule espletano nel tessuto stesso.

Turing propose un modello inizialmente minimale, in seguito divenuto più complesso, composto principalmente da due specie soggette a diffusione e reazioni chimiche di diverso tipo, identificando le relazioni necessarie tra questi diversi fenomeni chimici per la formazione di pattern. Grazie a questo modello minimale, Turing aprì un'altra strada per lo studio dello sviluppo degli organismi viventi, ovvero quella della modellizzazione di reti molecolari su grande scala.

In parallelo, la scoperta della struttura del DNA da parte di Rosalind Franklin, James Watson e Francis Crick, gli enormi sviluppi tecnologici sul sequenziamento genico, la manipolazione e l'interferenza genetica, la microscopia ad alta risoluzione e la misura di forze *in vitro* ed *in vivo*, hanno permesso non solo di validare molte delle intuizioni di D'Arcy Thomson e Turing, ma di andare oltre analizzando sempre più in dettaglio problemi quali le intricate ed innumerevoli interazioni fra le molecole e la generazione e trasmissione di forze all'interno delle cellule e dei tessuti.

Lo scopo di questo articolo è di fornire una panoramica degli approcci teorici generali utilizzati oggi nello studio dello sviluppo dei sistemi biologici a diverse scale spazio-temporali e della loro interazione con la branca sperimentale per validazione e predizione. Pertanto, si inizia-

rà dapprima discutendo la scala microscopica della cellula, l'espressione genica e la modellizzazione delle reti molecolari, riassumendo gli approcci ed i risultati fondamentali; si proseguirà con lo studio della formazione degli organuli cellulari, ovvero della formazione di pattern a livello della cellula stessa, a cui seguirà la scala dei tessuti, dove si illustrerà come le idee di Turing vengono applicate oggi giorno alla comprensione del differenziamento cellulare; si discuterà poi la questione dell'identificazione di modelli di reti geniche ottimali e di come metodi basati su o ispirati all'intelligenza artificiale possano contribuire a risolvere questo problema.

Nella seconda parte dell'articolo, ci si concentrerà invece sull'altra faccia della medaglia, la meccanica, e si illustrerà una delle teorie maggiormente utilizzate nello studio della generazione e trasmissione di forze meccaniche e di come queste possano essere validate sperimentalmente.

In finale, si concluderà discutendo le sfide a lungo termine, riguardanti non solo le domande fondamentali ancora aperte e gli sviluppi tecnici teorici e sperimentali necessari ad uno studio completo della Morfogenesi ma anche l'importanza dello sviluppo di una vera comunità interdisciplinare in continua sinergia.

La cellula e la modellizzazione delle reti geniche e di segnale

Come discusso nell'introduzione, la morfogenesi ha inizio a partire dalla singola cellula fecondata, la quale, per poter espletare tutte le sue funzioni vitali, necessita della produzione di proteine, le macromolecole funzionali fondamentali. L'informazione necessaria alla produzione di proteine, ossia l'informazione sulla loro struttura, è contenuta nei geni, frammenti di DNA, i quali vengono espressi tramite una serie di processi i cui stadi intermedi fondamentali richiedono la produzione dell'RNA messaggero (mRNA), anche detta trascrizione, e la sua traduzione nella sequenza primaria della proteina, la quale, attraverso il processo di *folding*, assume la sua struttura finale e, se non vi sono errori, funzionale. L'insieme di tali processi è anche noto come espressione genica.

Una volta che la proteina finale è prodotta, interagisce all'interno della cellula con le altre macromolecole, espletando un'innumerabile quantità di funzioni, come ad esempio l'attivazione stessa dell'espressione genica (ovvero i fattori di trascrizione), degradazione di altre proteine (come le proteasi), costituzione del citoscheletro (ossia la struttura fondamentale che controlla forma e motilità cellulare) e costituzione della membrana cellulare per la comunicazione con l'ambiente circostante.

Nonostante ad oggi non si conosca con esattezza l'intero quadro di interazioni intracellulari e la loro stechiometria, grazie a diverse tecniche sperimentali, negli anni è stato tuttavia possibile ricostruirne una grande quantità. Ciò ha permesso di catalogare parte di queste interazioni in circuiti molecolari, ovvero reti minimali composte da un basso numero di macromolecole [3].

Per poter comprendere il funzionamento di questi circuiti da un punto di vista teorico, nel corso degli ultimi decenni, si sono sviluppati approcci basati sulla teoria delle reti complesse e sulla teoria dei sistemi dinamici. In questo contesto, le diverse specie molecolari d'interesse vengono rappresentate come i **nodi** della rete, le interazioni come i *link* della rete (Figura 1A) e la variabile primaria di interesse è la concentrazione molecolare di ogni specie presente nella rete.

Supponendo quindi di considerare N specie, si può definire il vettore delle concentrazioni delle specie molecolari al tempo t come $\underline{y}(t) = (y_1(t), \dots, y_N(t))$. Date le interazioni tra le diverse specie molecolari, è quindi possibile definire le equazioni che governano l'evoluzione temporale della rete, ovvero:

$$\frac{dy_i(t)}{dt} = f_i(\underline{y}(t), t),$$

dove $y_i(t)$ è la concentrazione della specie i al tempo t e $f_i(\underline{y}(t), t)$ è una funzione, normalmente non lineare, contenente le reazioni chimiche che coinvolgono la specie i , come ad esempio produzione ed interazione della specie i con se stessa e con le altre specie. Pertanto, tale funzione dipende anche dai parametri del modello, ovvero dalle velocità delle reazioni chimiche, dalle soglie di reazione o dagli esponenti caratterizzanti

funzioni tipicamente non lineari ¹.

Tramite questo approccio è perciò possibile studiare una serie di proprietà legate alla rete stessa come ad esempio i) l'esistenza ed unicità di uno stato stazionario e la sua stabilità rispetto a perturbazioni esterne; ii) le esatte proprietà introdotte dalla presenza di determinate reazioni chimiche all'interno della rete.

A quest'ultimo proposito, un'ampia branca della biofisica teorica si è occupata di catalogare dapprima circuiti molecolari sovrarappresentati in biologia per poi comprenderne le proprietà dinamiche e statiche. Si è studiato i) come la presenza di reazioni fortemente non lineari potesse indurre una bistabilità nel sistema e, di conseguenza, la possibilità per la cellula di assumere diversi stati in condizioni stazionarie, come nel caso del *toggle switch* (Figura 1B); ii) come reazioni di inibizione (*negative feedback*) potessero indurre un'alta resilienza (Figura 1C) o oscillazioni in risposta a perturbazioni esterne [5]; iii) come reazioni di mutua attivazione (*positive feedback*) rendano gli stati stazionari instabili o addirittura caotici [9]. Nonostante vi siano già alcuni studi [8, 9], restano tuttavia ancora da comprendere in maniera sistematica le proprietà dinamiche indotte dalla combinazione di diversi circuiti molecolari e come questi possano risultare ottimali da un punto di vista evolutivo.

Nonostante l'approccio sovracitato permetta di studiare un'elevata varietà di sistemi, resta comunque di tipo deterministico, ovvero ignora completamente la stocasticità dovuta all'interazione fra le molecole in quanto quantità discrete (rumore intrinseco) o a fluttuazioni dell'ambiente circostante la rete (rumore estrinseco). Pertanto, questo approccio limita la comprensione di una grande quantità di fenomeni cellulari, come si discuterà di seguito.

Per superare questo limite, è quindi necessario adottare una descrizione stocastica del sistema, in cui la variabile di interesse non è più il numero di molecole (o concentrazione) di una determinata specie al tempo t ma piuttosto la probabilità

¹In generale, è possibile semplificare tale descrizione introducendo al posto della concentrazione di ciascuna specie nel tempo una variabile binaria (ovvero che possa assumere due valori soltanto, ad esempio 0 e 1), che determini semplicemente lo stato di espressione o non espressione di un gene, come nel caso delle reti booleane.

di osservare un determinato numero di molecole al tempo t , ovvero $P(\underline{n}, t)$, la cui legge di evoluzione temporale è data dall'equazione maestra, ovvero:

$$\frac{dP(\underline{n}, t)}{dt} = \sum_{\underline{n}' \neq \underline{n}} \{T(\underline{n}|\underline{n}')P(\underline{n}', t) - T(\underline{n}'|\underline{n})P(\underline{n}, t)\},$$

dove $T(\underline{n}'|\underline{n})$ rappresentano le frequenze di transizione dallo stato $\underline{n} = (n_1, \dots, n_N)$ allo stato $\underline{n}' = (n'_1, \dots, n'_N)$ e viceversa e sono definite dalle reazioni chimiche presenti nella rete.

La risoluzione di tale equazione è perciò uno strumento fondamentale per studiare il comportamento stocastico del sistema e, di conseguenza, per capire il ruolo giocato dalle diverse interazioni molecolari nel determinare il tipo di distribuzioni di probabilità caratterizzanti le specie presenti nel sistema. Tuttavia, nella maggior parte dei casi che vengono considerati, risolvere l'equazione maestra resta un compito arduo. Pertanto negli anni si è ricorso a diverse approssimazioni, tra cui una delle più celebri denominata di van Kampen (o in inglese anche *system-size expansion*) [6].

In tale espansione, nel caso di rumore lineare, si assume che il numero di molecole di una determinata specie i al tempo t , n_i , possa essere approssimato come:

$$n_i = V\phi_i + V^{1/2}\xi_i,$$

dove V è il volume del sistema, ϕ_i è la concentrazione di molecole della specie i nel caso deterministico e ξ_i è il termine di rumore.

Espandendo in termini di potenze del volume V e fermandosi al secondo ordine dell'espansione, è possibile riscrivere l'equazione maestra nella forma di un'equazione di diffusione per la distribuzione di probabilità, l'equazione di Fokker-Planck, più facilmente trattabile analiticamente.

Questo approccio di conseguenza permette il calcolo dei momenti della distribuzione delle diverse specie molecolari e la loro evoluzione temporale, ovvero media (corrispondente al caso senza rumore), varianza e correlazioni. Bisogna tenere a mente, però, che in tale regime e quadro specifico, si assume a priori che le distribuzio-

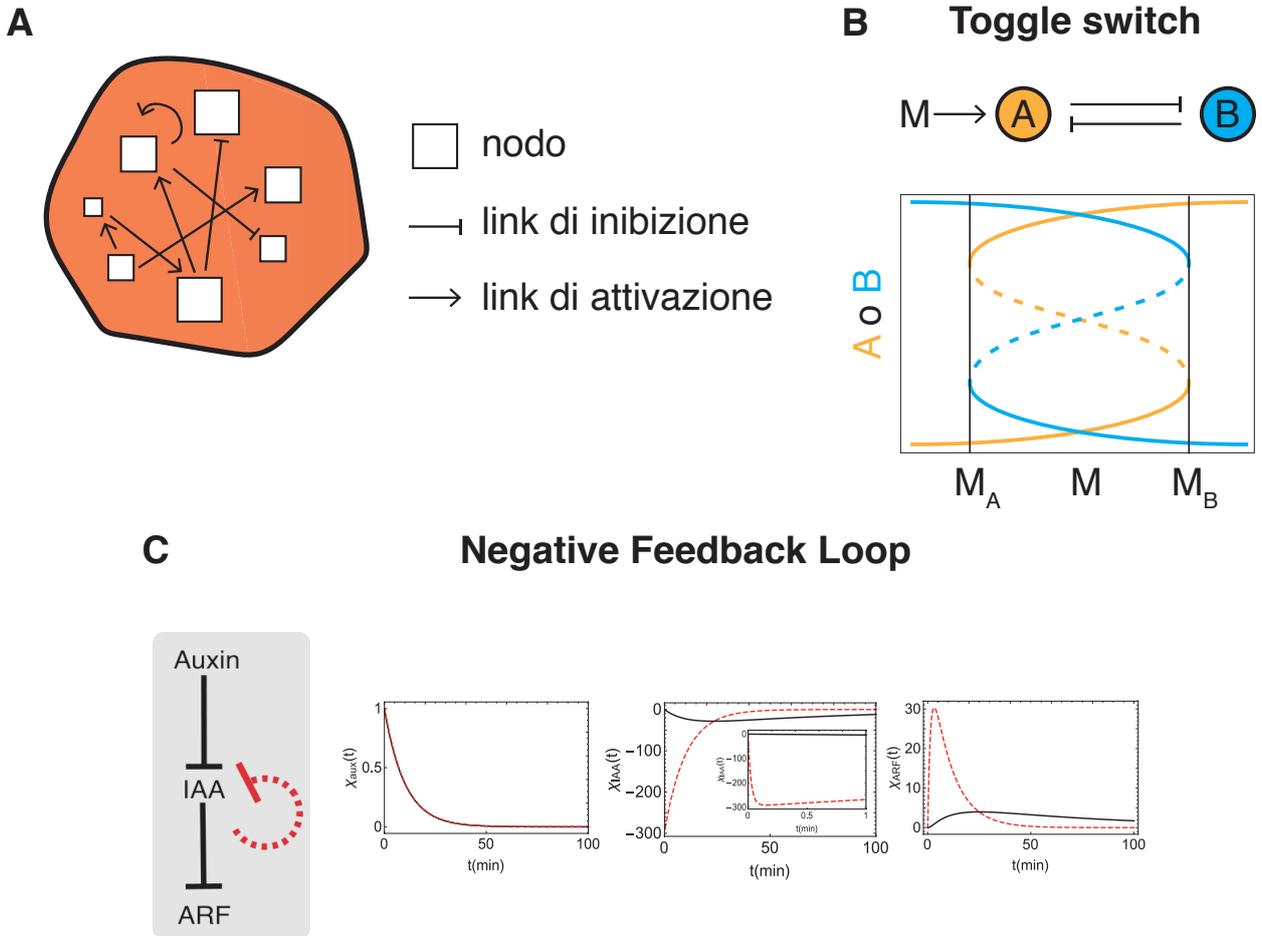


Figura 1: A) Schematizzazione della cellula con al suo interno un esempio di rete molecolare. I quadrati rappresentano i nodi della rete, ovvero le molecole coinvolte, mentre le frecce rappresentano le reazioni, descritte in maggiore dettaglio nel pannello laterale. B) Pannello in alto: esempio di toggle switch, comprendente due diversi nodi corrispondenti al gene A e gene B, due reazioni di mutua inibizione e un attivatore M. Pannello in basso: esempio di comportamento di stato stazionario per il gene A ed il gene B in funzione della concentrazione dell'attivatore M. Linee continue rappresentano gli stati stabili mentre le linee tratteggiate rappresentano gli stati instabili. M_A ed M_B rappresentano le soglie di concentrazione per l'attivatore M a cui si osserva l'apparizione degli stati stazionari instabili. Figura riadattata da [4]. C) Esempio di Negative Feedback Loop. Pannello di sinistra: circuito comprendente tre specie, Auxin, IAA e ARF, proteine regolatrici dello sviluppo della pianta A. *Thaliana* e 3 reazioni di inibizione. Pannello di destra: risposta temporale per le tre diverse specie indicate a sinistra a seguito di una perturbazione rispetto allo stato stazionario indotta da Auxin. Le linee continue nere rappresentano il caso senza il negative feedback indicato in rosso a sinistra; le linee rosse tratteggiate rappresentano il caso con il negative feedback. Si noti come la presenza del negative feedback effettivamente permette di osservare una risposta maggiore ma anche un'alta resilienza rispetto allo stato stazionario. Figura presa da [5].

ni di probabilità siano gaussiane e non vi siano termini di memoria all'interno del sistema.

A questo riguardo, è bene quindi, oltre che verificare i regimi di validità dell'approssimazione, comprendere se sia necessario tenere conto degli ordini superiori nell'approssimazione o dei termini di memoria o anche direttamente tentare di sviluppare tecniche analitiche più raffinate

(come ad esempio quelle basate sulla teoria dei campi [7]).

Tuttavia, vi sono vari esempi in cui questo studio si è rivelato potente per comprendere i) il ruolo delle interazioni chimiche o anche ii) il ruolo del rumore estrinseco nel determinare le distribuzioni di probabilità delle molecole. In questo contesto è importante ricordare il caso dei microRNA ed il loro ruolo nei circuiti molecola-

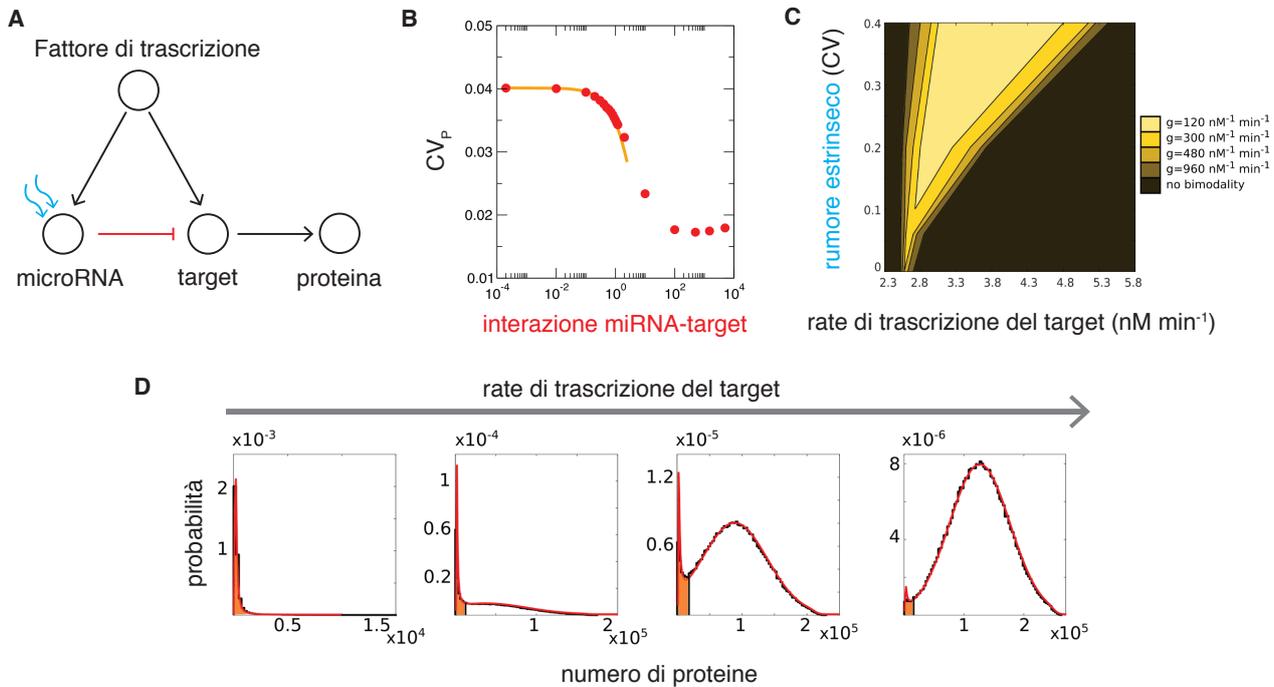


Figura 2: A) Schematizzazione di un circuito a *microRNA* composto da 4 nodi, ovvero un fattore di trascrizione che attiva l'espressione del *microRNA* e del suo mRNA target, che a sua volta codifica per la proteina. Le frecce nere indicano le reazioni di attivazione, mentre la freccia rossa indica l'inibizione. Le frecce azzurre ondulate sul *microRNA* indicano la trascrizione con rumore estrinseco del *microRNA*. B) Coefficiente di variazione della proteina come funzione del parametro di interazione fra *microRNA* e mRNA target. I punti rossi corrispondono ai risultati delle simulazioni mentre la linea arancione al risultato dell'espansione di van Kampen in questo circuito. Figura presa e riadattata da [12]. C) Diagramma di fase per l'emergenza di distribuzioni bimodali in presenza di rumore estrinseco sul *microRNA* in funzione del rate di trascrizione dell'mRNA target e del coefficiente di variazione del rumore estrinseco sul *microRNA*. Il parametro g rappresenta la costante di accoppiamento fra il *microRNA* e l'mRNA target. D) Esempio di emergenza di distribuzioni bimodali per le proteine a fissato coefficiente di variazione per il rumore estrinseco sul *microRNA*, variando il rate di trascrizione dell'mRNA target. Gli istogrammi vengono dal risultato delle simulazioni mentre le linee rosse continue dall'approssimazione di van Kampen modificata in presenza di rumore estrinseco. Figura presa e riadattata da [15].

ri. I **microRNA** sono piccole molecole di RNA scoperte negli anni '90 in *C. Elegans* [10], un verme nematode, codificate in regioni del genoma note per non contenere alcuna informazione sulla produzione di proteine (regioni non codificanti).

I *microRNA* agiscono legando gli RNA messaggeri *target* (mRNA) ed eventualmente degradandoli, portando in prima istanza ad una diminuzione del numero di proteine relative tradotte (Figura 2A). L'intera mappa di interazione tra i diversi *microRNA*, che risultano ad oggi essere più di 2000 solo nella specie umana, ed i loro *target* non è ancora completamente nota ma, dati i numeri, è chiaro che si tratti di una rete complessa coinvolta in svariati contesti, dallo sviluppo alla carcinogenesi.

L'uso delle tecniche teoriche sovraccitate in que-

sto caso ha quindi permesso di comprendere ulteriori proprietà caratterizzanti queste reti ed in particolare dell'azione dei *microRNA*, quali: i) la capacità dei *microRNA* di non diminuire unicamente il numero di molecole relative ad una certa proteina ma anche di diminuirne la varianza (Figura 2B), rendendo pertanto la rete più robusta a perturbazioni esterne [11, 12]; ii) in presenza di più *target*, l'azione dei *microRNA* può portare ad una varietà di effetti regolatori diversi e di conseguenza modulare le correlazioni fra mRNA *target* senza che vi sia una diretta interazione fra di loro [13, 14]; iii) la presenza di rumore estrinseco sui *microRNA*, ad esempio dovuto ad intermittenza nella trascrizione (*burst trascrizionali*), può rafforzare la bimodalità indotta dalla stocasticità delle reazioni delle distribuzioni delle proteine codificate dagli mRNA *target* [15] (Figura 2C-D).

Quest'ultimo punto è estremamente importante per due motivi: i) la presenza di rumore estrinseco, ovvero esterno alla rete, intuitivamente dannoso, può in realtà indurre una varietà di distribuzioni comunque ben definite all'interno della rete stessa; ii) la multimodalità indotta dal rumore può in principio risultare benefica nel caso della differenziazione cellulare. Infatti, la presenza di più picchi nella distribuzione di probabilità corrisponde alla presenza di più stati caratterizzati da un diverso numero di proteine, quindi possibilmente relativi a diversi stati di differenziamento della cellula.

Normalmente, l'ipotesi più accreditata per il differenziamento cellulare si basa sulla presenza di reazioni chimiche tali che permettano di ottenere più stati stazionari stabili. Ricordando il *toggle switch* sovraccitato, la presenza del rumore in questo caso permette al sistema di saltare da uno stato stazionario all'altro naturalmente, dove il tempo tipico di questo salto dipende dalla differenza in stabilità dello stato stazionario stesso.

In termini fisici, come anche proposto da Conrad Waddington durante il secolo scorso, definendo una funzione energia a partire dalle equazioni deterministiche, ove possibile, gli stati stazionari sono rappresentati come i minimi di questa funzione, la cui differenza regola quindi il tempo tipico di salto (legge di Arrhenius). Nel caso invece considerato per il microRNA, il sistema di per sé non contiene alcuna reazione chimica che definisca nel caso senza rumore una multistabilità del sistema e pertanto la multimodalità è unicamente indotta dalla combinazione fra struttura circuitale monostabile e presenza di rumore estrinseco.

Gli approcci teorici qui citati sono degli esempi di come i modelli matematici hanno permesso di svelare proprietà intrinseche di queste reti molecolari non accessibili sperimentalmente.

Tuttavia, grazie agli sviluppi tecnologici, ed in particolare grazie alla possibilità di costruire circuiti sintetici o tracciare finemente determinate molecole nel tempo, è possibile validare i modelli e le loro predizioni con esperimenti *ad hoc*, come effettuato nel caso sovraccitato dei microRNA [16, 17] o anche in altri contesti, come quello dei circuiti della pianta *A. Thaliana* [18]. Questo permette quindi di studiare quantitativamente le

proprietà dettagliate di un'enorme varietà di cellule, dalle cellule staminali, vegetali ed animali, fino alle cellule tumorali.

Formazione di pattern cellulari: la separazione di fase

Negli approcci sovraccitati si assume a priori che il sistema in considerazione sia *well mixed*, ovvero che il numero di molecole presenti nel sistema sia talmente elevato da permettere alle molecole di interagire omogeneamente fra di loro indipendentemente da dove si trovino nella cellula: la nozione di spazio diventa pertanto irrilevante. Quest'ipotesi è ovviamente plausibile in molti casi, ma non in tutti.

A livello cellulare, infatti, la nozione di spazio può ad esempio essere di fondamentale importanza per la corretta formazione di strutture agglomerate, come gli organuli e, soprattutto, gli agglomerati privi di membrana, necessari per il mantenimento delle funzioni vitali della cellula.

Esempi di questo tipo possono essere trovati in diversi tipi di cellule come nella linea cellulare immortalizzata HeLa, nell'ovocita della rana o nell'embrione del verme nematode. Tra questi si possono ricordare i nucleoli, ovvero i siti di biogenesi dei ribosomi, i corpi di Cajal, importanti nel metabolismo degli RNA, ed i granuli germinali, tra cui i granuli P nel verme nematode, i granuli polari nel moscerino della frutta, o anche i granuli di stress. In tutti questi casi, è necessario che le molecole dapprima si aggregino e poi diffondano all'interno dell'aggregato affinché possano interagire fra di loro chimicamente. Ma quali sono i principi che permettono a tali molecole di aggregarsi e come? Come possono queste molecole passare da una fase disordinata in cui sono perfettamente mescolate con le molecole del mezzo circostante ad una in cui sono localizzate?

Per rispondere a questa domanda, è necessario prima di tutto ricordare gli ultimi studi riguardo i granuli P nel verme nematode (Figura 3A). Infatti, è stato recentemente osservato che dal punto di vista reologico i granuli P si comportano come liquidi, ovvero fondono nel

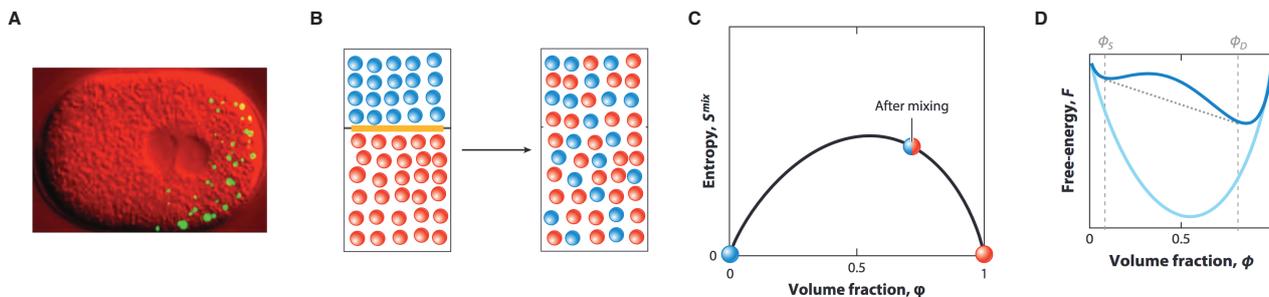


Figura 3: A) Visualizzazione dei granuli P (in verde) all'interno dell'embrione del verme nematode *C. Elegans*. Figura presa da [20]. B) Esempio di mixing in un sistema formato da due specie molecolari, rappresentate dai cerchi blu e rossi rispettivamente. Nel momento in cui si rimuove la barriera fra le due specie, l'aumento di entropia per diffusione porta al mescolamento spontaneo delle due specie. C) Entropia di mixing in funzione della frazione volumica ϕ . D) Energia libera come funzione della frazione volumica ϕ , in assenza di interazioni (linea continua azzurra) ed in presenza di interazioni (linea continua blu). I pannelli B, C e D sono stati presi da [19].

momento in cui interagiscono fra di loro assumendo poi una forma sferica, tipica di un liquido sottoposto a tensione superficiale, le loro deformazioni sotto *stress* sono simili a quelle di gocce liquide, e riassumono una forma sferica dopo deformazioni/perturbazioni [19].

Pertanto tali proprietà hanno naturalmente rievocato nella mente dei fisici il problema della separazione di fase, in particolare nei casi sovraccaricati fra due sostanze liquide, la cosiddetta separazione di fase liquido-liquido. Come spiegato in dettaglio in [19], nella separazione di fase liquido-liquido si definisce un sistema contenuto in un certo volume V formato da due specie differenti, A e B , definite dal loro numero di molecole nello spazio e nel tempo, n_A e n_B , e la loro rispettiva frazione di volume occupato, v_A e v_B (Figura 3B). Pertanto, la concentrazione delle due diverse specie sarà rispettivamente, $c_A = \phi/v_A$ e $c_B = (1 - \phi)/v_B$, dove $\phi = n_A/V$.

Date queste definizioni, è possibile introdurre la cosiddetta **entropia di mixing per unità di volume**, S_{mix}/V , ovvero la quantità che misura il disordine nel sistema, data da:

$$\frac{S_{mix}}{V} = -k_B \frac{\phi}{v_A} \log\left(\frac{\phi}{v_A}\right) - k_B \frac{1-\phi}{v_B} \log\left(\frac{1-\phi}{v_B}\right),$$

dove k_B è la costante di Boltzmann.

Tale entropia ha la proprietà di essere uguale a 0 nello stato cosiddetto *unmixed*, ovvero quando solo una specie è presente nel sistema (Figura 3C). In tutti gli altri casi, invece, è diversa da

zero e positiva e tiene conto di tutte le possibili configurazioni in cui le particelle appartenenti alle diverse specie possono trovarsi.

In particolare, la positività dell'entropia, in accordo con il secondo principio della termodinamica, implica che il processo di *mixing*, ovvero di trasporto, avviene spontaneamente (Figura 3B). Tipicamente tali processi di trasporto spontanei avvengono via diffusione, il cui tasso di trasporto è dato da

$$J \propto -\frac{d\mu}{dx},$$

dove μ è il potenziale chimico. Il potenziale chimico è a sua volta definito come

$$\mu = \frac{v_A}{V} \frac{dF}{d\phi},$$

dove F è l'energia libera del sistema, $F = E - TS_{mix}$, E è l'energia interna che tiene conto delle interazioni fra le particelle e T è la temperatura del sistema.

Considerando il limite di interazioni deboli o trascurabili rispetto all'energia termica tipica del sistema, si ottiene che il potenziale chimico è uguale a

$$\mu = -T \frac{v_A}{V} \frac{dS_{mix}}{d\phi},$$

ovvero

$$-\frac{d\mu}{dx} = T \frac{v_A}{V} \frac{d^2 S_{mix}}{d\phi^2} \frac{d\phi}{dx}.$$

Dato che l'entropia di *mixing* è concava, si ottiene che la corrente di diffusione è direttamente proporzionale al gradiente di concentrazione secondo un coefficiente che è proprio la costante di diffusione D delle molecole. Pertanto ciò mostra

come, unendo due compartimenti occupati da diverse specie molecolari miscibili, via sola diffusione, sia possibile raggiungere spontaneamente uno stato caratterizzato da una concentrazione omogenea.

Tuttavia, a questo punto, sorge spontanea la domanda: come invece è possibile ottenere dei pattern non banali per le due specie molecolari e quindi mantenere uno stato *unmixed*?

In questo caso, bisogna tenere in considerazione invece le interazioni microscopiche fra le molecole e pertanto il contributo dell'energia interna E all'energia libera $F = E - TS_{mix}$.

Uno dei casi più semplici da considerare è quello in cui l'energia interna favorisca configurazioni in cui molecole della stessa specie siano vicine nello spazio. Una tale energia interna può essere scritta come:

$$E = \alpha V \phi(1 - \phi),$$

dove $\alpha > 0$ è un parametro che quantifica l'interazione tra le diverse specie molecolari.

Tale energia ammette due minimi, uno a $\phi = 0$ ed un altro a $\phi = 1$, che corrispondono al *packing* di una sola specie. Pertanto la presenza di interazioni favorisce il cosiddetto *demixing* e può rendere l'energia libera concava in determinate regioni dello spazio delle concentrazioni, ovvero portare all'esistenza di due minimi, come nella teoria delle transizioni di fase (Figura 3D).

Da ciò, in generale, ci si potrebbe domandare perché diverse fasi con composizioni diverse possano coesistere senza che flussi diffusivi tendano ad omogeneizzarne le concentrazioni. Ciò è dovuto principalmente al fatto che i flussi diffusivi, come suddetto, sono guidati dapprima da gradienti di potenziale chimico.

Nel caso della separazione di fase, due diverse frazioni volumiche possono essere possibili, ovvero una per il soluto, ϕ_D , ed una per il solvente, ϕ_S , che corrispondono ai due minimi dell'energia libera F del sistema, con valori uguali di potenziale chimico, e rendono il potenziale chimico stesso non monotono.

Essendo tuttavia il potenziale chimico uguale in corrispondenza di questi due valori, all'equilibrio all'interno del sistema non possono generarsi flussi diffusivi che possano portare ad un mixing delle due fasi. In particolare, si posso-

no ricordare due diversi casi in cui il potenziale chimico è costante spazialmente: i) il caso di una goccia in un solvente; ii) il caso di due fasi omogenee separate da un'interfaccia.

La differenza fra i due casi risiede nel comportamento della pressione, che mentre nel primo caso è uniforme, nel secondo presenta un salto, in particolare la differenza fra la pressione interna alla goccia e la pressione esterna, ΔP , è data dalla legge di Laplace, ovvero:

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{R},$$

dove γ è la tensione superficiale della goccia stessa ed R il suo raggio, che segue dal bilancio delle forze normali all'interfaccia. Pertanto, il potenziale chimico, oltre che dipendere dall'interazione molecolare all'interno di una certa fase, dipende anche dalla pressione interna della fase stessa. Questo implica che il potenziale chimico nella goccia a raggio minore sarà più elevato che in quella a raggio maggiore. Da ciò segue che il trasporto diffusivo avverrà in direzione della goccia a raggio maggiore a spese di quella a raggio minore, fenomeno anche chiamato *Ostwald ripening*.

Ovviamente, nel caso di sistemi biologici, tale fenomeno è limitato dal numero di molecole delle diverse specie presenti nel sistema, che risulta pertanto essere anche un fattore di controllo per la taglia degli aggregati che possono formarsi all'interno delle cellule.

L'intero quadro qui descritto, tuttavia, resta una descrizione all'equilibrio per sistemi fortemente fuori equilibrio, dove vi sono reazioni chimiche che permettono la formazione e rottura di legami molecolari, introducendo quindi flussi molecolari costanti che rendono il sistema attivo (il cui significato completo sarà chiarito nei prossimi paragrafi). Pertanto, questo tipo di sistemi viene più generalmente studiato definendo un'equazione di conservazione della materia per il soluto la cui dinamica è regolata dalle reazioni chimiche presenti nel sistema e da un'energia libera contenente i termini di energia interna ed entropia di mixing sovradescritti ed un termine di tensione superficiale atto a mimare l'effetto della differenza tra la pressione interna ed esterna (ossia generalizzando la teoria di Cahn-Hilliard combinata

con l'energia libera di Flory-Huggins).

Varianti e semplificazioni di tale tipo di sistema vengono studiate per comprendere le condizioni precise per cui si possa osservare la separazione di fase, la forma della soluzione allo stato stazionario, la legge dinamica con cui crescono i domini di separazione e le condizioni per cui si possa osservare il suddetto Ostwald ripening. Tra le applicazioni alla biologia, tra i numerosi esempi si possono ricordare appunto la comprensione della formazione dei granuli P nel verme nematode [21] e della separazione di fase come meccanismo per ridurre il rumore all'interno delle cellule [22].

La separazione di fase, in particolare in fluidi attivi, risulta essere quindi una sfida non solo dal punto di vista teorico, per poter costruire un quadro tecnico consistente in grado di descrivere la fisica fuori equilibrio di questo tipo di sistemi, ma anche dal punto di vista biologico per poter comprendere la formazione di pattern e strutture all'interno delle cellule.

I tessuti e la formazione di pattern per la specificazione degli organi

Analogamente alla formazione di *pattern* cellulari finalizzati a strutturare l'interno della cellula, a livello dei tessuti possono essere osservate concentrazioni disomogenee nell'espressione delle proteine tra le diverse cellule. I principi di formazione di tali *pattern* sono alla base dell'iniziazione degli organi, le macrounità funzionali degli organismi.

Uno dei primi a postulare l'ipotesi che tali *pattern* potessero essere generati spontaneamente da fenomeni di trasporto all'interno dei tessuti fu Alan Turing nel suo articolo del 1952 intitolato "The Chemical Basis of Morphogenesis" [2]. In tale articolo, Turing postula l'esistenza di sostanze, definite **morfogeni**, i cui profili di concentrazione non omogenei inducono l'iniziazione degli organi in determinate regioni spaziali ed in determinate finestre temporali.

Il modello di Turing più minimale prende in considerazione due morfogeni, un attivatore ed un inibitore, diffusivi ed interagenti fra di loro. Analizzando tali equazioni, è possibile effetti-

vamente mostrare che, in presenza di reazioni non lineari fra i due morfogeni e una diffusività maggiore dell'inibitore rispetto all'attivatore, lo stato omogeneo diventa instabile sotto perturbazioni, contrariamente a quanto ci si aspetterebbe intuitivamente dalla classica teoria della diffusione. In queste condizioni lo stato stabile è effettivamente dato da profili di concentrazione non omogenei, normalmente periodici, per i due morfogeni (Figura 4A), i cui dettagli strutturali dipendono dai parametri del sistema. Tale modello fornì le basi per lo studio di sistemi oggi chiamati reazione-diffusione oltre che introdurre una prima definizione di morfogeno come un segnale chimico diffusivo che permette la comunicazione intercellulare e la differenziazione stessa delle cellule.

Al contempo, intorno agli anni '60 dello scorso secolo, Lewis Wolpert introdusse invece un altro modello, conosciuto come French Flag Model (Figura 4B). Nel French Flag Model, la definizione di morfogeno è quella di una sostanza chimica che funge come segnale intercellulare e che permette di indurre determinate risposte cellulari a seconda della sua stessa concentrazione.

Osservando l'esempio della Figura 4B, un determinato morfogeno presente in alta concentrazione pertanto attiverà la risposta del 'gene blu, in media concentrazione del gene bianco ed in bassa concentrazione del gene rosso o di nessun gene. Nel French Flag Model la presenza del pattern del morfogeno fornisce alle cellule un'informazione posizionale che ne permette quindi il differenziamento.

I due meccanismi di Turing e Wolpert sono a priori profondamente differenti se non addirittura contrastanti. Il primo caso, infatti, richiede la presenza di due sostanze, chimicamente interagenti e con proprietà di trasporto profondamente diverse: in questo caso il *pattern* necessario per il differenziamento emerge spontaneamente e risulta essere periodico.

Il secondo caso prevede, invece, la combinazione di un solo gradiente di concentrazione, prestabilito all'interno dell'organismo (*prepattern*) o semplicemente indotto dalla presenza di una sorgente di morfogeno sottoposto a diffusione e degradazione, e di meccanismi a soglia nell'attivazione dell'espressione genica cellulare.

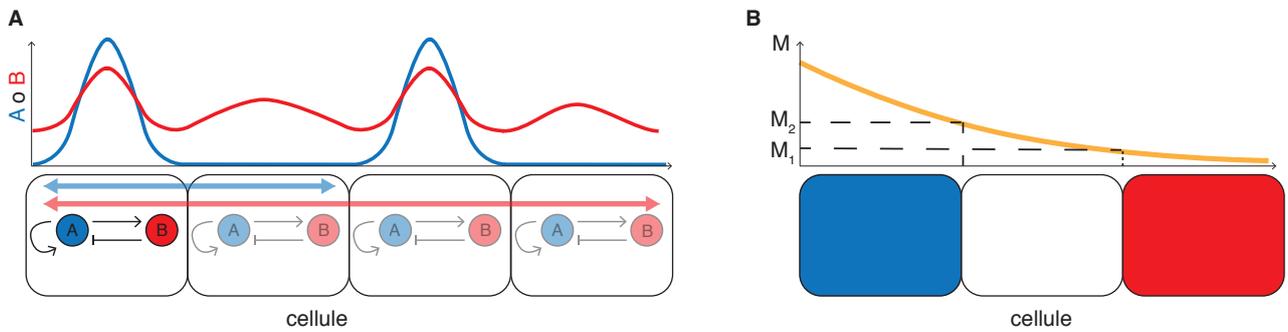


Figura 4: A) Schematizzazione del meccanismo à la Turing per la formazione di pattern spontanei. In ogni cellula è definito un circuito formato da un attivatore A ed un inibitore B rispettivamente segnali a corto e lungo raggio. Una soluzione tipica è quella ad onda, la cui lunghezza d'onda tipica dipende dai parametri del sistema. B) Schematizzazione del modello French flag. La presenza di un gradiente di morfogeno M nel tessuto (curva arancione) attiva diversi geni nelle cellule a seconda della sua stessa concentrazione. Le soglie di attivazione per i diversi geni sono indicate con M_1 ed M_2 rispettivamente.

Oggi giorno, grazie agli avanzamenti tecnologici nell'ambito della microscopia e nello studio del trasporto molecolare, si inizia a comprendere che i due modelli possono entrambi essere presenti, se non addirittura in combinazione. Esempi possono essere trovati nella coppia Nodal/Lefty presente nello zebrafish, nella rana e nel topo, che permette all'organismo di stabilire l'asimmetria sinistra/destra, nella coppia Dpp/Notch e EGF, fondamentale per la formazione delle vene nell'ala del moscerino della frutta o Wnt e Dkk per la rigenerazione in Hydra.

Moltissimi altri esempi sono presenti in letteratura [23, 24] e molti altri sono ancora da scoprire. Fra le domande fondamentali, tuttavia, bisogna ancora comprendere nella maggior parte dei casi quali siano le specie molecolari determinanti per la formazione degli organi nei diversi organismi, fino a che punto i meccanismi sovracitati possano effettivamente giocare un ruolo in maniera esclusiva nella formazione di pattern, come tali pattern si riorganizzano in maniera così precisa nel tempo e nello spazio nonostante la presenza di sorgenti di rumore e come altri processi possano contribuire alla formazione di *pattern*.

Infatti, i due meccanismi di Wolpert e Turing prevedono principalmente una sola forma di trasporto, la diffusione. In alcuni casi, come nelle piante, il trasporto di morfogeni può avvenire attivamente ovvero per azione di recettori di membrana dedicati a mediare il flusso uscente o entrante; nel caso animale, invece, la presenza di movimenti macroscopici morfogenetici può indurre nello spazio intercellulare fenomeni quali

l'avvezione, ovvero trasporto di molecole all'interno di un fluido a causa del movimento del fluido stesso. Comprendere quali siano effettivamente i diversi fenomeni di trasporto in gioco e capire come questi partecipino esattamente al differenziamento cellulare resta quindi un'altra delle grandi domande a cui rispondere.

Selezione del modello e inferenza di reti geniche e di segnale

I quadri teorici ed i modelli illustrati finora sono semplificazioni dei fenomeni naturali il cui fine è quello di isolare porzioni dei sistemi di interesse per carpirne le proprietà intrinseche di funzionamento. Tuttavia, vista la complessità di tali sistemi, una domanda sorge spontanea: il modello che viene definito è davvero il modello migliore per poter studiare le proprietà di interesse del sistema sotto osservazione? Ovvero le variabili prese in considerazione *a priori* sono effettivamente le variabili più rilevanti per uno studio ottimale del sistema di interesse o per rispondere alla domanda che ci si è posti? Quali sono le interazioni fra tali variabili?

Chiaramente, vista l'enorme quantità di macromolecole, non si conosce a tutt'oggi l'intero quadro di interazioni intra- ed inter- cellulari né tantomeno il loro ruolo nell'espletare le diverse funzioni vitali. Tuttavia, l'identificazione delle variabili rilevanti e delle loro interazioni in un determinato contesto biologico costituisce un pun-

to fondamentale da chiarire per poter formulare modelli coerenti ed esaustivi.

A tal proposito, nel caso della ricostruzione delle reti molecolari, gli enormi progressi nel sequenziamento genico nel corso degli ultimi decenni hanno permesso di avviare un'intera branca di sviluppo di metodi finalizzati ad identificare la struttura di diverse reti biologiche, tra cui le reti geniche e di segnale. L'idea fondamentale dietro questi metodi è quella di identificare le osservabili maggiormente correlate in un certo insieme di dati ed estrarre, o meglio inferire, le interazioni fra tali osservabili in modo da riprodurre le correlazioni osservate. Vista la numerosa quantità di tecniche disponibili, i dati a disposizione in questo caso sono moltissimi e normalmente corrispondono a quantificazioni di trascritti e proteine in svariate cellule.

Per analizzare questo tipo di dati ed estrarre la struttura della rete genica sottostante, si è dapprima partiti con l'analisi delle componenti principali (PCA), già applicata in precedenza a svariati altri ambiti, dai mercati finanziari alle neuroscienze per citare alcuni esempi. Tale tecnica si basa sullo studio delle proprietà spettrali della matrice di correlazione a due punti ed è pertanto limitante nel contesto di interazioni a molti corpi.

A questo riguardo, sono state sviluppate ed applicate altre tecniche più raffinate, che tengono conto delle forti non linearità delle interazioni all'interno di questi sistemi e ricadono per l'appunto nella classe dei metodi non lineari di inferenza, come ad esempio:

- **Diffusion map:** è un metodo che modella i dati come il risultato di un cammino aleatorio markoviano (ogni *step* del cammino dipende unicamente dallo *step* precedente) e, tramite decomposizione spettrale, permette di ridurre la dimensionalità dei dati e risulta essere un equivalente non lineare di PCA. Tale metodo è stato ad esempio applicato per comprendere le traiettorie di differenziazione delle cellule staminali embrionali nel topo e in dati ottenuti da embrioni umani nella fase di pre-impianto [25]. Inoltre, recentemente, una variante di questo metodo è stata implementata nel contesto dell'algoritmo MAGIC (acronimo di Markov Affinity-based

Graph Imputation of Cells) ed applicata a diverse cellule tra cui quelle della corteccia cerebrale, dell'ippocampo e del midollo osseo nel topo [26], risultando più performante della precedente nel ricostruire le interazioni tra i geni.

- **t-Stochastic Neighbour Embedding (t-SNE):** introdotto da [27] e finalizzato anch'esso a ridurre la dimensionalità del sistema, t-SNE è un metodo che minimizza la distanza di Kullback-Leibler fra le due distribuzioni di probabilità p_{ij} e q_{ij} (dove i e j corrispondono agli indici delle variabili osservate), rispettivamente costruite nello spazio completo di partenza ed in quello ridotto di arrivo. Tale metodo è stato applicato ad esempio nello studio delle differenze fra cellule cancerogene e sane del midollo osseo [28].
- **Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP):** è un metodo che costruisce a partire dai dati un grafo di partenza definito su una varietà riemanniana, per definizione corrispondente ad uno spazio n -dimensionale curvo, e minimizza l'entropia incrociata fra lo spazio di partenza ad alta dimensionalità e quello ridotto a bassa dimensionalità. In [29] ad esempio, UMAP è stato utilizzato per ricostruire le traiettorie di differenziazione cellulare nel verme nematode a partire dalla sua espressione genica.

Nonostante questi metodi si siano già dimostrati essere un ottimo punto di partenza per ricostruire la mappa delle interazioni geniche, presentano delle limitazioni a causa di una serie di problematiche, come ad esempio la struttura intrinseca ed ancora non perfettamente sotto controllo dei dati utilizzati.

Un esempio è quello dei dati di RNA-seq, i quali rappresentano le letture di determinati RNA (precursori delle proteine) all'interno di determinate cellule. Tali dati normalmente appaiono in forma tabulare dove le righe della tabella rappresentano le diverse cellule campionate, le colonne rappresentano i diversi RNA letti dall'apparato sperimentale e ciascuno elemento della tabella è il numero di letture di un dato RNA in una data cellula.

Tuttavia, a causa dell'enorme quantità e varietà di RNA all'interno delle cellule e delle limitazioni sperimentali, questo tipo di dati possono essere inficiati da una serie di fattori quali: i) *undersampling*, dato che il numero di RNA campionati è normalmente molto maggiore del numero di cellule osservate; ii) *overdispersion*, a causa dell'alta variabilità nell'espressione dei diversi trascritti; iii) *zero inflation*, ovvero una sovrarappresentazione di entrate nulle a causa di mancate letture ed di eventi trascrizionali intermittenti (anche detti *transcriptional bursts*); iv) gli effetti di *hidden variables*, ossia di agenti che influenzano il comportamento del sistema ma che non vengono osservati o non è possibile osservare.

Questi ultimi effetti possono risultare in pratica da livelli della rete di cui il dataset in considerazione non tiene conto, come ad esempio il proteoma nel caso dei dati di RNA-seq. Tale punto richiede quindi lo sviluppo di metodi che possano integrare diversi livelli di complessità e strutturali all'interno delle cellule.

Di conseguenza, prima di poter applicare un qualsiasi metodo di inferenza, è opportuno comprendere la struttura dei dati di interesse ed il loro processo generativo sottostante, come ad esempio è stato recentemente proposto in [30].

Inoltre, lo sviluppo recente dei metodi di *deep learning* può permettere di controllare alcuni dei fattori sovraelencati ed in particolare di tenere conto delle forti non linearità presenti all'interno di questi sistemi.

Recentemente tali metodi sono infatti stati applicati con successo allo studio e predizione della struttura 3D delle proteine a partire dalla loro sequenza primaria, come in [31], ed in via di sviluppo, insieme ad altri metodi, nel caso dei repertori immunitari (cfr. "Il sistema immunitario attraverso la lente dell'inferenza statistica" di Barbara Bravi in questo numero di Ithaca).

Questi risultati, insieme al continuo e rapido sviluppo dell'intelligenza artificiale, aprono numerose nuove strade e possibilità nella comprensione della struttura delle macrounità che regolano il corretto funzionamento e perciò la vita delle nostre cellule.

L'altro lato della medaglia: generazione e trasmissione di forze meccaniche

Finora si è parlato della Morfogenesi in termini principalmente biochimici, ovvero di reazioni chimiche a livello cellulare e di tessuto. Tuttavia, per poter espletare le funzioni vitali, gli organismi devono al contempo crescere.

La crescita di un organismo prevede chiaramente replicazione e, nella maggior parte dei casi, riorganizzazione cellulare che di conseguenza inducono deformazioni cellulari all'interno dei tessuti.

Questo tipo di fenomeni richiede pertanto la generazione e trasmissione di forze meccaniche a livello microscopico della cellula e macroscopico dei tessuti che permettano alle singole cellule di cambiare forma per riadattarsi all'ambiente circostante o modificarlo.

Dopo circa un secolo di esperimenti, sappiamo oggi che le proprietà meccaniche delle cellule sono regolate da una struttura biopolimerica detta **citochescheletro**, composta da diversi tipi di proteine filamentose, ovvero: i) i filamenti intermedi; ii) i microtubuli; iii) i filamenti di actina.

Mentre i filamenti intermedi si pensa entrino in gioco principalmente nelle deformazioni su grande scala spaziale e temporale e contribuiscono passivamente alle proprietà meccaniche della cellula, i microtubuli ed i filamenti di actina sono strutturalmente e, di conseguenza, meccanicamente, profondamente diversi. Essi infatti sono strutture semi-rigide lineari, polari e che pertanto definiscono una direzionalità per i processi attivi che avvengono su di essi, come ad esempio l'idrolisi dell'adenosina trifosfato, il trasporto di proteine che trasducono energia in lavoro meccanico come le miosine e chinesine ed il *treadmilling*, ovvero la polimerizzazione ad un estremo e depolimerizzazione all'altro estremo del filamento. Pertanto risultano essere strutture fortemente fuori equilibrio.

La maggior parte delle proprietà meccaniche delle cellule animali² è regolata da una sottile

²Nelle piante, una struttura molto più rigida e pertanto meno deformabile è presente, la parete cellulare. Le deformazioni vegetali quindi risultano essere profondamente differenti rispetto a quelle animali. Normalmente

rete formata dalle proteine sovraelencate e chiamata corteccia cellulare, che, essendo formata da un reticolo di polimerico immerso nel citoplasma cellulare, dal punto di vista meccanico si comporta come un gel, ovvero come un solido su scale di tempo brevi (ordine di secondi) e come un fluido su scale di tempo lunghe (ordine di minuti).

Tuttavia, tale gel è fortemente fuori equilibrio a causa delle proprietà elencate precedentemente che lo rendono in grado di trasdurre energia chimica in lavoro meccanico. Pertanto, bisogna introdurre una descrizione reologica fuori equilibrio, come la teoria dei gel attivi [32].

Una volta identificate le variabili rilevanti e le quantità conservate (come massa e quantità di moto), diversi approcci possono essere utilizzati per ottenere le equazioni costitutive del materiale, tra cui quello di perturbare il sistema dallo stato di equilibrio ed utilizzare il formalismo della termodinamica fuori equilibrio oppure costruire una teoria microscopica che tenga conto di tutte le scale di tempo e spaziali coinvolte in questi sistemi.

Ad ogni modo, lo scopo finale è di ottenere la relazione fra lo *stress* nel gel e le forze generalizzate. In questo tipo di sistemi, tale relazione è modificata da un termine che non deriva da alcun potenziale e denominato effettivamente *stress* attivo, che tiene conto della capacità di questi sistemi di trasdurre energia chimica in lavoro meccanico e pertanto autopropulsione. Identificando con v_i la componente della velocità del centro di massa nella direzione i , le relazioni costitutive per il tensore *stress*, σ_{ij} , in tale fluido attivo risultano pertanto essere date da:

$$(1 + \tau_M \frac{D}{Dt}) (\sigma_{ij} - \sigma_{ij}^a) = 2\eta (\partial_i v_j + \partial_j v_i - \frac{2}{3} \partial_k v_k \delta_{ij}) + \bar{\eta} \partial_k v_k \delta_{ij},$$

dove:

vengono infatti descritte come deformazioni elastiche principalmente governate da differenze di pressione indotte da flussi di acqua (pressione di turgore) e seguite da riorganizzazioni cellulari minime o completamente assenti. Di conseguenza, la descrizione meccanica per le piante prevede semplicemente delle modificazioni delle equazioni costitutive del materiale rispetto al caso animale.

- τ_M è il cosiddetto tempo di Maxwell, ovvero il tempo tipico di rilassamento elastico. Pertanto tale termine domina nel regime di tempi brevi;
- η e $\bar{\eta}$ sono rispettivamente la viscosità di *shear* e di *bulk* del fluido (ovvero associate allo sforzo di taglio ed allo sforzo normale). Tali termini dominano nel regime di lunghi tempi. La viscosità di *bulk*, in particolare, è associata alla conservazione del volume che a sua volta determina la pressione all'interno del fluido;
- σ_{ij}^a è la parte attiva del tensore *stress*, che modella i fenomeni di trasduzione di energia chimica in lavoro meccanico. Tale parte attiva può essere di diversa forma a seconda del sistema in considerazione e del livello di dettaglio della descrizione e può in generale contenere un termine isotropo (tensione superficiale, autopropulsione cellulare, ecc.) ed uno o più termini anisotropi a seconda delle proprietà del sistema (nematico, polare o chirale).

Tali equazioni sono il punto di partenza per imporre il bilancio delle forze nel sistema, ovvero l'equilibrio meccanico fra forze interne e forze esterne (come ad esempio l'attrito con il mezzo circostante). Corredando tale sistema di equazioni con la conservazione della materia, si ottengono le leggi finali che regolano la meccanica di tali materiali attivi viscoelastici.

Grazie alla teoria dei gel attivi e la sua comparazione con esperimenti combinanti misure meccaniche *in vivo* ed *in vitro* (come ad esempio *laser cuts*, *micropipette aspiration*, *atomic force microscopy*), manipolazioni genetiche e microscopia ad alta risoluzione [35], nel corso dell'ultimo decennio, è stato possibile ricostruire il diagramma di forze che determina la dinamica e la statica della divisione cellulare e dei movimenti morfogenetici nello sviluppo iniziale dello zebrafish, per citare alcuni esempi.

Ovviamente tale descrizione continua e basata sull'assunzione di gel attivo è motivata dal dettaglio di interesse e dalle osservazioni reologiche sull'organismo (o più in generale sul materiale) in considerazione. Nei casi in cui, ad esempio, si è interessati a comprendere anche

fenomeni di riorganizzazione cellulare collettiva e direzionale, bisogna utilizzare altri approcci, come ad esempio la teoria dei cristalli liquidi [33], o passare ad una descrizione discreta, come nel caso del *Vertex Model* [34], tra le cui numerose applicazioni appaiono per l'appunto lo studio delle proprietà dinamiche di riorganizzazione cellulare dei tessuti e meccaniche dei movimenti morfogenetici.

Tra le sfide attuali vi sono la necessità di ottenere una teoria consistente che possa permettere di relazionare i parametri macroscopici delle equazioni costitutive ai meccanismi microscopici di interazione cellulare, comprendere la dipendenza della parte attiva dello stress dai processi chimici sottostanti e pertanto adottare descrizioni che includano una dipendenza dei parametri meccanici dallo spazio, dal tempo o dalle deformazioni stesse del materiale (come nel caso di materiali non-newtoniani) [36] e riuscire a misurare le differenti forze che agiscono in questi sistemi singolarmente.

Conclusioni

Grazie alla cooperazione fra diverse discipline, è stato possibile nel corso dell'ultimo secolo aprire una nuova strada per una comprensione quantitativa di fenomeni naturali come la Morfogenesi.

Nel corso di questo articolo, si è visto come la complessità di tale processo coinvolga meccanismi a diverse scale temporali e spaziali nonché branche della fisica e della matematica normalmente studiate in maniera separata. La comprensione profonda di tali meccanismi, pertanto, non richiede soltanto lo sviluppo di nuovi strumenti o metodi, ma di un intero quadro teorico che possa essere in grado di descrivere consistentemente dei sistemi fortemente fuori equilibrio e multiscala. I sistemi biologici quindi diventano un naturale laboratorio di sperimentazione e validazione per tali teorie.

Grazie ai recenti sviluppi sperimentali, illustrati nell'articolo in ciascun paragrafo, al giorno d'oggi si ha accesso ad una serie di misurazioni e manipolazioni biofisiche, biochimiche e genetiche ad altissima risoluzione rispetto al secolo scorso che permettono di investigare più in dettaglio i meccanismi fondamentali alla ba-

se dello sviluppo degli organismi e soprattutto rappresentano un'ispirazione e motivazione per mettere in discussione le teorie già esistenti e formularne di nuove.

Da questa panoramica generale si può evincere quindi come lo studio di fenomeni considerati normalmente oggetto di interesse unicamente per la biologia e per la medicina possa essere fonte di grande interesse anche per la fisica e per la matematica e necessiti di queste discipline per poter assumere un carattere non solo quantitativo ma anche predittivo. In quest'ottica, le diverse discipline si devono fondere per adempiere al fine ultimo di comprendere in dettaglio i fenomeni naturali, ovvero la fisica, secondo il metodo scientifico.

Ringraziamenti

L'autrice ringrazia Ada Altieri, Barbara Bravi, Ulisse Ferrari, Raimondo Grigolon e Valentina Ros per la loro lettura attenta e critica del manoscritto.



- [1] D'Arcy Wentworth Thompson, *On Growth and Form*, Cambridge University Press, 1917.
- [2] A. M. Turing, *The Chemical Basis of Morphogenesis*, Phil. Trans. R. Soc. London B, 237 (1952) 641.
- [3] R. Milo et al., *Network Motifs: Simple Building Blocks of Complex Networks*, Science, 298 (2002) 824-827.
- [4] R. Perez-Carrasco, P. Guerrero, J. Briscoe, K. M. Page, *Intrinsic noise profoundly alters the dynamics and steady state of morphogen-controlled bistable genetic switches*, PLoS Computational Biology, 12 (2016) 10, e1005154.
- [5] S. Grigolon, B. Bravi, O. C. Martin, *Responses to auxin signals: an operating principle for dynamical sensitivity yet high resilience*, Royal Society Open Science, 5 (2018) 1, 172098.
- [6] N. G. van Kampen, *Stochastic processes in physics and chemistry*, North-Holland Personal Library, 1981.
- [7] U. C. Täuber, M. Howard, and B. P. Vollmayr-Lee, *Applications of field-theoretic renormalization group methods to reaction-diffusion problems*, Journal of Physics A: Mathematical and General, 38 (2005), 17, R79.
- [8] P. François & V. Hakim, *Design of genetic networks with specified functions by evolution in silico*, PNAS, 101(2004) 2, 580.
- [9] E. Azpeitia et al., *The combination of the functionalities of feedback circuits is determinant for the attractors? number and size in pathway-like Boolean networks*, Scientific Reports, 7(2017) 42023.

- [10] R.C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*, Cell, 75 (1993), 843-854.
- [11] M. Osella, C. Bosia, D. Corà, M. Caselle, *The Role of Incoherent microRNA-Mediated Feedforward Loops in Noise Buffering*, PLoS Computational Biology, 7 (2011), 3, e1001101.
- [12] S. Grigolon, F. Di Patti, A. De Martino, E. Marinari, *Noise processing by microRNA-mediated circuits: the incoherent feed-forward loop, revisited*, Heliyon, 2 (2016), 4, e00095.
- [13] C. Bosia, A. Pagnani, R. Zecchina, *Modelling competing endogenous RNA networks*, PLoS One, 8 (2013), 6, e66609.
- [14] M. Figliuzzi, A. De Martino, E. Marinari, *microRNAs as a selective channel of communication between competing RNAs: a steady-state theory*, Biophysical Journal, 104, (2013), 5, 1203-1213.
- [15] M. Del Giudice, S. Bo, S. Grigolon, C. Bosia, *On the role of extrinsic noise in microRNA-mediated bimodal gene expression*, PLoS Computational Biology, 14 (2018), 4, 1-26.
- [16] V. Siciliano et al., *MiRNAs confer phenotypic robustness to gene networks by suppressing biological noise*, Nature Communications, 4 (2013), 1, 1-7.
- [17] C. Bosia et al., *RNAs competing for microRNAs mutually influence their fluctuations in a highly non-linear microRNA-dependent manner in single cells*, Genome Biology, 18 (2019), 1, 1-14.
- [18] L. R. Band et al., *Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism*, PNAS, 109 (2012), 12, 4668-4673.
- [19] A. A. Hyman, C. A. Weber, F. Jülicher, *Liquid-liquid phase separation in biology*, Annual Review of Cell and Developmental Biology, 30 (2014), 39-58.
- [20] C. P. Brangwynne et al., *Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation*, Science, 324 (2009), 5935, 1729-1732.
- [21] C. F. Lee et al., *Spatial Organization of the Cell Cytoplasm by Position-Dependent Phase Separation*, Physical Review Letters, 111 (2013), 088101.
- [22] A. Klosin et al., *Phase separation provides a mechanism to reduce noise in cells*, Science, 367 (2020), 6476, 464-468.
- [23] A. D. Lander, *Pattern, growth and control*, Cell, 144 (2011), 955.
- [24] S. Kondo & T. Miura, *Reaction-Diffusion Model as a Framework for Understanding Biological Pattern Formation*, Science, 239 (2010), 1616.
- [25] L. Haghverdi, F. Buettner, F. J. Theis, *Diffusion maps for high-dimensional single-cell analysis of differentiation data*, Bioinformatics, 31 (2015), 18, 2989-2998.
- [26] D. van Dijk et al., *Recovering Gene Interactions from Single-Cell Data Using Data Diffusion*, Cell, 174 (2018), 716-729.
- [27] L. Van der Maaten & G. Hinton, *Visualizing Data using t-SNE*, Journal of Machine Learning Research, 9 (2008), 2579-2605.
- [28] E. D. Amir et al., *viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia*, Nature Biotechnology, 31 (2013), 545-552.
- [29] J. S. Packer et al., *A lineage-resolved molecular atlas of C. elegans embryogenesis at single-cell resolution*, Science, 365 (2019), 6459.
- [30] G. Durif et al., *Probabilistic count matrix factorization for single cell expression data analysis*, Bioinformatics, 35 (2019) 20.
- [31] A. W. Senior et al., *Improved protein structure prediction using potentials from deep learning*, Nature, 577 (2020), 706-710.
- [32] J. Prost, F. Jülicher, J.-J. Joanny, *Active gel physics*, Nature Physics, 11 (2015), 111-117.
- [33] P.-G. de Gennes & J. Prost, *The physics of liquid crystals*, Oxford Science Publications (1974).
- [34] S. Alt, P. Ganguly, G. Salbreux, *Vertex models: from cell mechanics to tissue morphogenesis*, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B., 19 (2017), 372(1720):20150520.
- [35] N. Mishra & C.-P. Heisenberg, *Dissecting Organismal Morphogenesis by Bridging Genetics and Biophysics*, Annual Review of Genetics, 55 (2021).
- [36] E. Hannezo & C.-P. Heisenberg, *Mechanochemical Feedback Loops in Development and Disease*, Cell, 178 (2019), 12-25.



Silvia Grigolon: si è laureata in Fisica Teorica a Sapienza Università di Roma. In seguito, ha ottenuto il dottorato in Fisica Teorica presso il Laboratoire de Physique Théorique et Modèles Statistiques dell'Université Paris-Saclay per poi proseguire con un postdottorato, dapprima al Francis Crick Institute di Londra ed in seguito al Laboratoire Jean Perrin presso la Sorbona a Parigi. Dal 2021, è ricercatrice al CNRS presso il Laboratoire Jean Perrin (Campus Jussieu) alla Sorbona. I suoi interessi di ricerca spaziano dallo sviluppo di metodi di inferenza alla modellizzazione mecano-chimica di sistemi biologici, in particolare delle prime fasi dello sviluppo embrionale animale e vegetale, in costante sinergia con gli sperimentali.

Il sistema immunitario attraverso la lente dell'inferenza statistica

The men of experiment are like the ant, they only collect and use; the reasoners resemble spiders, who make cobwebs out of their own substance. But the bee takes a middle course: it gathers its material from the flowers of the garden and of the field, but transforms and digests it by a power of its own.

F. Bacon

Barbara Bravi

Department of Mathematics, Imperial College London, London, United Kingdom

Il sistema immunitario è capace di mettere in campo risposte estremamente specifiche che, a livello molecolare, si fondano sul riconoscimento degli agenti patogeni esterni. A seguito del recente *boom* nelle tecniche di sequenziamento, è divenuto possibile repertoriare nel dettaglio gli insiemi di proteine coinvolte in tale riconoscimento, producendo così risorse senza precedenti per caratterizzarne quantitativamente le proprietà ed il funzionamento. L'obiettivo di questo articolo è tracciare una panoramica di alcuni approcci di modellizzazione del sistema immunitario che sono basati sui dati di sequenziamento e che uniscono, al potere esplorativo e predittivo dell'apprendimento statistico, l'interpretabilità dei modelli di meccanica statistica. Se da un lato il fine primario di questi approcci è stabilire un quadro di com-

preensione teorica dei meccanismi di risposta immunitaria a livello microscopico, dall'altro le loro predizioni dimostrano importanti risvolti applicativi nello sviluppo dei vaccini e dell'immunoterapia.

La risposta immunitaria

Il nostro sistema immunitario comprende un insieme di cellule, mediatori biochimici ed organi nel loro complesso adibiti all'individuazione e all'eliminazione di tutti quegli agenti che possono causare malattie.

Per iniziare, vorrei descrivere alcune dinamiche fondamentali tramite cui questa azione viene dispiegata, concentrandomi sui linfociti T, ed in particolare sui linfociti T di tipo killer, e rimandando per una trattazione più dettagliata

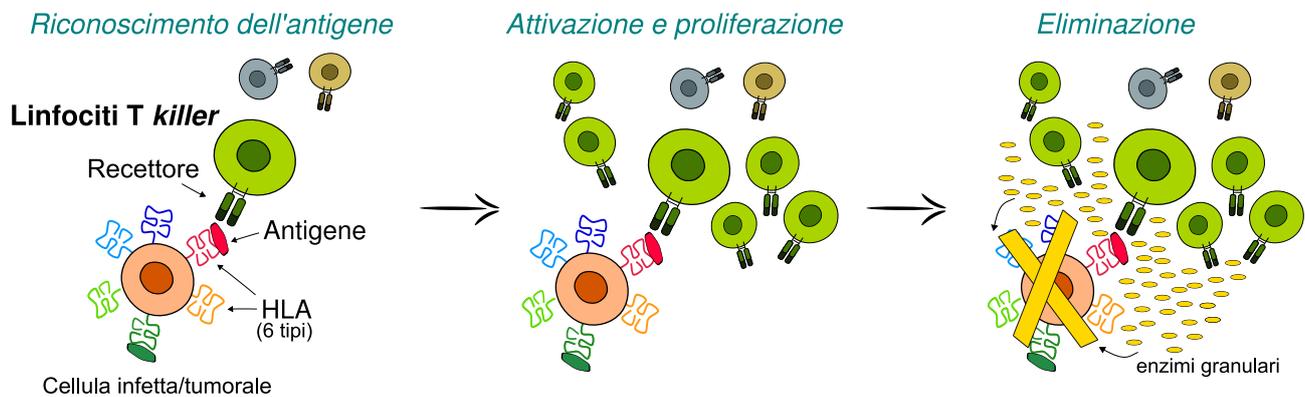


Figura 1: Meccanismi di dispiegamento della risposta immunitaria da parte dei linfociti T di tipo killer.

ed istruttiva sul sistema immunitario a testi come [1].

I linfociti T, assieme ai linfociti B, sono le cellule centrali del sistema immunitario **adattativo**, cioè la parte del sistema immunitario che, diversamente dalla parte cosiddetta innata, è presente solo nei vertebrati ed è capace di risposte molecolari specifiche. Un meccanismo essenziale sotteso a queste risposte molecolari specifiche è innanzitutto il riconoscimento a livello molecolare di un agente patogeno o di una massa tumorale.

Il riconoscimento specifico

Il riconoscimento specifico di un patogeno da parte dei linfociti T *killer* viene iniziato da un legame biochimico fra i recettori di membrana dei linfociti T e l'antigene (Fig. 1). Per antigene si intende una porzione di proteina, per esempio delle proteine di un virus che può avere infettato una cellula, oppure delle proteine contenenti alcune delle mutazioni che distinguono una cellula tumorale da una normale; questi frammenti vengono prodotti all'interno delle cellule nel normale processo metabolico di degradazione delle proteine.

Tuttavia gli antigeni non sono tutte le possibili porzioni di una proteina, ma sono solo quelle che hanno un'alta affinità di legame con dei complessi proteici delle cellule umane chiamati complessi HLA di classe I (dall'inglese *Human Leukocyte Antigen*), specializzati nella cosiddetta **presentazione** dell'antigene. La presentazione dell'antigene consiste nell'esporsi sulla superficie cellulare affinché possa essere visibile e riconoscibile dai linfociti T,

i quali si sono evoluti in modo da discriminare, attraverso i propri recettori di membrana, gli antigeni che provengono da proteine naturali dell'organismo e quelli di origine virale, batterica o tumorale (a cui soli si legano).

Il legame biochimico antigene-recettore innesca delle reazioni biochimiche che promuovono l'attivazione e la proliferazione (per divisione cellulare) di quei linfociti che possiedono un recettore capace del riconoscimento specifico di un certo antigene (Fig. 1). In questo modo il riconoscimento dà luogo alla cosiddetta espansione di una popolazione di linfociti T specifici, la quale andrà a presiedere all'eliminazione delle cellule infette o tumorali attraverso la secrezione di sostanze biochimiche (degli enzimi granulari) che ne inducono l'apoptosi (si veda ancora Fig. 1).

Esistono varie tipologie di linfociti T, i quali svolgono ruoli altamente specifici e fra loro complementari; per esempio, esistono anche i linfociti T di tipo *helper*, i quali attraverso il recettore riconoscono gli antigeni presentati non da cellule infette o maligne bensì da altre cellule del sistema immunitario (come le cellule dendritiche) capaci di intercettare agenti patogeni presenti nell'organismo. Sono denominate *helper* perché producono delle molecole (citochine) che stimolano l'attivazione dei linfociti T *killer* o degli altri linfociti centrali del sistema adattativo, i linfociti B (ossia quei linfociti dotati di recettori che circolano nell'organismo anche in forma solubile, i ben noti anticorpi).

Il meccanismo illustrato per i linfociti T, nella sua organizzazione generale, è in realtà quello attraverso cui, a tutt'oggi, si cerca di comprendere la risposta immunitaria messa in atto

dall'intero sistema adattativo e che fu proposto da Frank Macfarlane Burnet nel 1957: la cosiddetta teoria della selezione clonale [2]. Il quadro esplicativo di questa teoria si articola in 4 assunzioni ampiamente condivise dalla comunità scientifica: i linfociti T e B attuano un riconoscimento specifico degli antigeni attraverso i propri recettori di membrana, questo riconoscimento seleziona un clone (una popolazione di linfociti con lo stesso recettore) che, ingrandendosi per divisione cellulare, è in grado di rimuovere le cellule infette e permanere a lungo nell'organismo costituendo la memoria immunitaria.

Complessivamente, si può dire che il funzionamento del sistema immunitario coinvolge diverse scale spaziali e temporali e necessita, quindi, anche di diversi livelli di descrizione matematica, come ampiamente discusso per esempio in [3] e nelle referenze lì citate. In breve, si spazia dal livello dell'interazione molecolare, cioè della formazione di legami fra proteine (recettori e antigeni), alle reazioni biochimiche di *signaling* che innescano l'attivazione e proliferazione dei linfociti, alla comunicazione inter-cellulare, mediata da molecole secrete come le citochine e che interviene a coordinare un comportamento collettivo di risposta. Vi si aggiunge poi la scala globale della popolazione umana, che intrattiene una dinamica di interazione con agenti patogeni come i virus, in cui questi ultimi mutano continuamente per evadere la pressione del sistema immunitario umano.

Ciò che è affascinante è che una risposta così specifica e precisamente orchestrata abbia però, come condizione di possibilità, un'enorme diversità di base, che è la diversità, sia a livello intra- sia a livello inter-individuale, dei cosiddetti **repertori immunitari**.

I repertori immunitari e la loro diversità

Per **repertorio immunitario** si intende l'insieme dei recettori di tutti i linfociti per esempio in un individuo, il cui numero è impressionante. Si stima che il repertorio immunitario individuale per i linfociti T consista in $\sim 10^8$ recettori unici, in gran parte **privati** dell'individuo, ovvero non condivisi a livello di popolazione. Questo numero è impressionante specialmente se messo

a confronto con il numero totale di geni nell'essere umano ($\sim 2 \cdot 10^4$): non è quindi possibile pensare alla formazione dei recettori puramente secondo il dogma centrale della biologia, per cui un gene ha tutta l'informazione per determinare univocamente una proteina. Se così fosse, servirebbero così tanti geni da non poter essere contenuti nel nucleo della cellula!

La generazione di questa diversità è il risultato di un processo stocastico, noto come ricombinazione $V(D)J$, che avviene durante lo sviluppo dei linfociti sia T che B [1].

In estrema sintesi, il genoma contiene dei segmenti genici chiamati V, D e J (rispettivamente *Variable, Diversity e Joining* in inglese), per ciascuno dei quali esistono più varianti (Fig. 2A). Durante la sintesi dei recettori (o, più precisamente, di ciascuna delle due catene costitutive, denotate con α e β per il linfociti T, Fig. 2A), una delle varianti per ciascuno di questi segmenti viene scelta a caso e combinata a formare il gene da cui sarà prodotto il recettore. Come ulteriore azione di diversificazione, vengono rimossi (delezioni) o inseriti (inserzioni) dei nucleotidi alle giunzioni fra questi segmenti, ancora una volta in modo aleatorio. Da questo gene ricombinato e modificato in maniera aleatoria viene tradotta la composizione in aminoacidi dei recettori, che è resa così estremamente variabile fra un recettore e l'altro, soprattutto nella regione di giunzione fra segmenti. Questa regione, detta CDR3 (dall'inglese *Complementarity-Determining Region 3*), è proprio la regione del recettore che stabilisce il legame con gli antigeni. Si tratta dunque di un'estrema variabilità giustificata in un'ottica funzionale: la diversità accresce il potenziale di riconoscimento del repertorio, ovvero la sua capacità di intercettare una vasta gamma di possibili antigeni presentati al sistema immunitario.

A seguito della ricombinazione $V(D)J$, i recettori dei linfociti T generati vengono sottoposti ad un processo di selezione sulla base delle proprietà biochimiche di legame, la quale avviene nel timo (selezione timica). In questo processo, i linfociti T sono messi alla prova a confronto con degli antigeni provenienti dalle proteine naturali dell'organismo, andandoli a scartare ogni qualvolta il legame instaurato con l'antigene è troppo forte (poiché rischiereb-

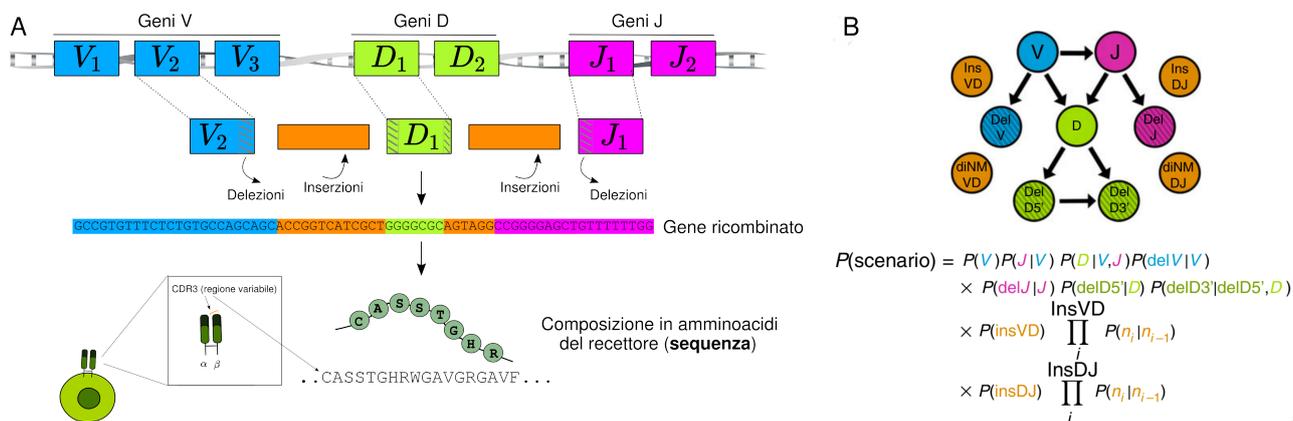


Figura 2: A: Il processo di ricombinazione V(D)J responsabile della generazione dei recettori dei linfociti, qui illustrato per la catena β dei linfociti T (la catena α è prodotta da una ricombinazione che coinvolge solo segmenti di tipo V e J). B: Codifica dei meccanismi di ricombinazione (scelta dei segmenti VDJ, inserzioni e delezioni) nella formula per la probabilità di generazione utilizzata in [7, 8, 9]; la figura B è presa da [8].

bero di riconoscere come estranee anche le proteine proprie dell'organismo, provocando così sindromi autoimmuni) o troppo debole (indice del fatto che potrebbero poi non legarsi ad alcun antigene patogeno), si veda Fig. 3A.

In maniera speculare, anche gli antigeni presentabili al sistema immunitario formano un insieme di una diversità imponente (stimata attorno a 10^{10} sequenze [4]). A loro volta poi, i geni HLA sono altamente polimorfici, con migliaia di varianti distinte esistenti nella popolazione umana. Le cellule di ogni individuo possiedono 6 tipi di proteine HLA potenzialmente diversi (Fig. 1), 2 codificati dai geni HLA-A (ciascuno ereditato da un genitore), 2 dai geni HLA-B e 2 dai geni HLA-C. La combinazione di diversi tipi HLA contribuisce ad ampliare lo spettro di antigeni presentabili a livello individuale, mentre il polimorfismo dei geni HLA implica una notevole variabilità fra individui in termini di antigeni presentati: in altre parole, individui diversi tenderanno a presentare porzioni diverse del proteoma di un virus. Questo, congiuntamente al fatto che una grossa porzione dei recettori sono privati, rende ancora più radicale la diversità inter-individuale della risposta immunitaria a livello microscopico, pur nella straordinaria convergenza e stabilità dei suoi esiti.

Dati di sequenziamento

La caratterizzazione quantitativa dei processi di generazione e selezione (nonché della diversità

dei repertori risultanti) è stata resa possibile dai progressi tecnologici nella produzione di dati di sequenziamento, ovvero *set* di dati che, a partire dalla catena di nucleotidi, forniscono la composizione in amminoacidi (la **sequenza**) sia dei recettori del repertorio immunitario sia delle migliaia di antigeni presentati dalle cellule in campioni biologici prelevati da sangue o tessuti.

Grazie anche alla raccolta sistematica di queste sequenze in banche dati specializzate, è possibile quindi iniziare a studiare insiemi di antigeni presentati dallo stesso HLA o repertori di recettori da diversi individui specifici verso lo stesso antigene, in numeri grandi a sufficienza da consentire un'analisi di tipo statistico. E proprio a livello statistico, emergono motivi ricorrenti fra sequenze, *pattern*, che riflettono dei vincoli, in termini di composizione in amminoacidi, imposti dalla conformazione strutturale e dalle affinità di legame (quantità, queste, per cui tuttavia la scala di disponibilità di dati sperimentali è ridotta rispetto alle sequenze).

Siccome produrre dati di sequenziamento in grandi quantità è divenuto sempre più efficiente e allo stesso tempo economico, si pone la necessità, nell'ambito dell'immunologia così come negli altri ambiti impattati da questo avanzamento tecnologico, di sviluppare approcci computazionali che permettano di sfruttare al massimo quest'informazione statistica per caratterizzare il comportamento del sistema immunitario e formulare predizioni a riguardo, ad esempio per scopi clinici.

Partire da osservazioni statistiche per svolger-

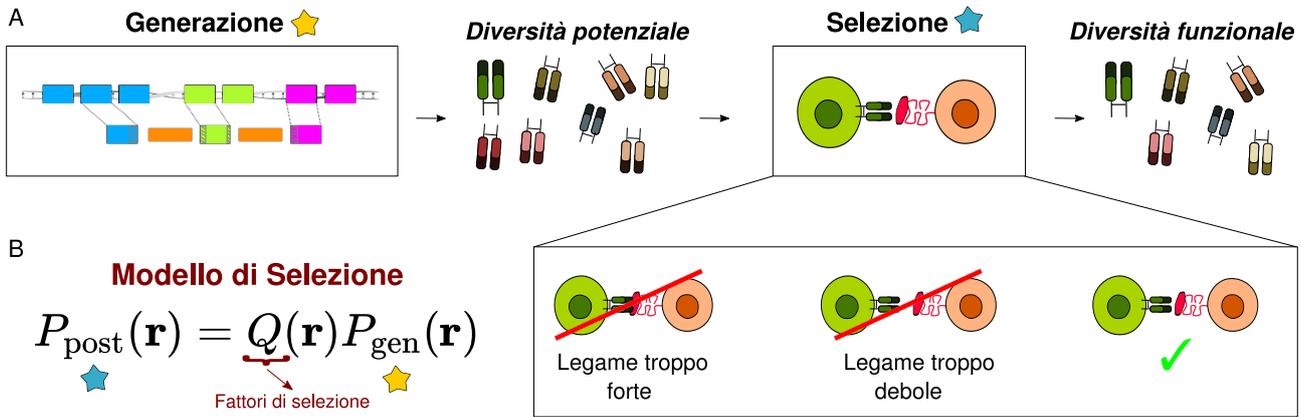


Figura 3: A: Il processo di selezione timica agisce sui recettori generati dalla ricombinazione $V(D)J$, scartando quelli che non hanno proprietà di legame con gli antigeni idonee ad essere funzionali e riducendo così la diversità del repertorio risultante dal processo di generazione. B: Formula per la distribuzione di probabilità per il repertorio dei recettori post-selezione che specifica il modello di selezione proposto in [10, 11].

ne un'analisi predittiva, la quale sostanzialmente richiede una componente di modellizzazione dei dati, costituisce un esempio di ciò che, in meccanica statistica, si chiama risolvere un **problema inverso**.

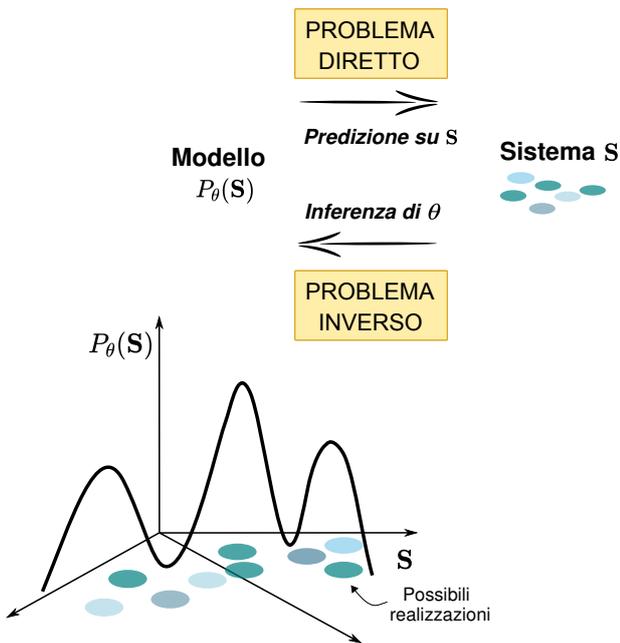


Figura 4: Il problema inverso in meccanica statistica. In relazione alla modellizzazione della risposta immunitaria, le diverse realizzazioni del sistema sono i set di antigeni e di recettori dei linfociti T messi a disposizione dalle tecniche di sequenziamento high-throughput.

La modellizzazione

Il problema inverso in meccanica statistica

In fisica, il problema diretto consiste nella predizione dello stato o della dinamica del sistema a partire da un modello che ne descrive il comportamento fisico in dipendenza di certi parametri noti (e fissati per esempio attraverso delle misure: dei tempi tipici di vita di una specie molecolare, delle energie libere di reazione, delle costanti di diffusione etc.).

Il problema inverso, invece, consiste nell'inferenza del valore di questi parametri una volta che sono date delle osservazioni empiriche (Fig. 4).

La logica di funzionamento del problema diretto e di quello inverso è di per sé generale in fisica; quando si parla di problema inverso in meccanica statistica, il modello è specificato da una distribuzione di probabilità (che assegna un valore di probabilità a ogni realizzazione del sistema), le predizioni sono formulate in termini di osservabili macroscopiche, statistiche, come possono essere la media e le correlazioni, e l'inferenza stessa parte da osservabili statistiche stimate su un insieme di realizzazioni del sistema che ne rappresentano un campionamento statistico.

Nel quadro della modellizzazione della risposta immunitaria, sono i repertori dei recettori o il complesso degli antigeni a poter essere pensati come degli insiemi delle molteplici realizzazioni possibili esplorate dal mondo vivente di uno stesso tipo di molecola biologica. È dunque

come se questo tipo di dati di sequenziamento desse accesso agli spazi di possibilità di quelle molecole, spazi dove però la naturale variabilità è vincolata, o meglio incanalata (per usare un termine chiave nella teorizzazione del vivente [5]), da pressioni evolutive, selettive e funzionali.

In questo contesto, il problema inverso è equivalente a dedurre la distribuzione di probabilità in questo spazio, una distribuzione che rispecchia i vincoli funzionali che hanno contribuito a plasmarlo (come quei vincoli di composizione che favoriscono alte affinità di legame biochimico).

A seconda del *set* di dati considerato come campionamento statistico dello spazio di interesse, si potranno ricostruire le distribuzioni di vari processi che regolano l'attività del sistema immunitario, per esempio la distribuzione di probabilità di presentazione di un antigene o del suo riconoscimento, da vedere essenzialmente come strumenti che quantificano la propensione di una sequenza verso le interazioni molecolari responsabili di questi processi.

La ricostruzione di una distribuzione di probabilità è un problema all'intersezione con la statistica, e che in particolare interpella nozioni e tecniche di inferenza statistica (o apprendimento statistico, ereditando un linguaggio più proprio dell'informatica). Il problema si riconduce infatti ad un compito tipico di inferenza statistica, in cui si assume la forma parametrica di un modello (qui, un modello specificato da una distribuzione di probabilità) ed i valori dei parametri vengono inferiti (appresi) nella maniera che meglio aderisce al dato empirico.

L'apprendimento consiste, a livello matematico, nell'aggiustare i parametri del modello, solitamente attraverso algoritmi iterativi, affinché i valori dei parametri appresi soddisfino qualche determinato criterio; nel caso dell'apprendimento di una distribuzione di probabilità, un criterio standard è la massimizzazione della probabilità specificata da quei parametri stimata sui dati. Questo criterio è noto come *maximum likelihood* ed, in altre parole, equivale alla prescrizione che i parametri appresi devono essere quelli che rendono massima l'evidenza del dato empirico sotto il modello statistico ipotizzato. Si tratta di un criterio di per sé attinto dall'ambito della statistica, ma di cui le tecniche sempre più avanzate

di apprendimento statistico e automatico, anche di interesse per la fisica statistica, potenziano la messa in pratica.

Un vantaggio particolare dei modelli espressi da una distribuzione probabilità, specialmente nell'ottica della loro applicazione alle molecole biologiche, è la caratteristica di essere **generativi**, ovvero la capacità di generare, tramite campionamento Monte Carlo a partire dalla distribuzione inferita, dei dati sintetici che possiedono le stesse proprietà statistiche dei dati di partenza. La generazione così intesa, infatti, è strumentale sia all'esplorazione quantitativa di questi spazi (permettendo per esempio di stimarne l'entropia) sia al *design* di molecole artificiali con caratteristiche funzionali (una volta combinata con test sperimentali serrati).

Si noti che la stessa idea è al centro di approcci come *Direct Coupling Analysis*, basato sull'inferenza di una distribuzione di probabilità alla Potts (ovvero, la distribuzione di un modello di fisica statistica con interazioni a due corpi) per descrivere le famiglie di proteine¹. Vari lavori negli ultimi dieci anni hanno dimostrato come questo approccio sia in grado di sfruttare l'informazione nelle correlazioni statistiche che emergono durante l'evoluzione per identificare i siti della sequenza che sono a contatto nella struttura tridimensionale e per predire interazioni specifiche fra proteine (si veda [6] per una rassegna).

Modelli di apprendimento statistico

È possibile allora mettere in moto l'ingranaggio del problema inverso sui dati di sequenziamento per studiare la risposta immunitaria?

Qualche paragrafo fa si è accennato a quattro processi fondamentali per la funzionalità del sistema immunitario adattativo: la generazione dei recettori attraverso la ricombinazione $V(D)J$, la selezione timica, la presentazione dell'antigene ed il suo riconoscimento. Per ciascuno di questi processi, descriverò ora alcuni modelli di recente pubblicazione incentrati sull'idea di risolvere un problema inverso di meccanica statistica attraverso tecniche di apprendimento statistico.

¹Per famiglia qui si intende l'insieme delle varianti della stessa proteina in diverse specie legate dal punto di vista evolutivo.

Generazione dei recettori

Il modello di generazione dei recettori, dapprima proposto in [7] ed in seguito implementato in pacchetti software in [8, 9], si prefigge di ricostruire la distribuzione di probabilità degli eventi di ricombinazione V(D)J, in maniera tale che, dato un generico recettore, gli si possa assegnare un valore di probabilità di essere generato attraverso questi eventi.

A livello matematico, il modello si basa sul tradurre in un linguaggio probabilistico l'insieme di meccanismi stocastici in cui si articola la ricombinazione (ovvero la scelta dei segmenti VDJ, inserzioni e delezioni alle giunzioni) per definire la probabilità di un determinato scenario di ricombinazione (la $P(\text{scenario})$ riportata in Fig. 2B). Siccome vari scenari di ricombinazione possono dare luogo ad uno stesso recettore finale, la probabilità di un recettore di sequenza r di essere generato, $P_{\text{gen}}(r)$, può essere stimata come:

$$P_{\text{gen}}(r) = \sum_{\text{scenari}} P(\text{scenario}),$$

dove la somma è intesa sugli scenari di ricombinazione passibili di aver generato la sequenza r .

Il punto di partenza per l'apprendimento *data-driven* del modello sono dei *set* di sequenze che rappresentano il risultato puramente del processo di ricombinazione². I parametri che specificano $P(\text{scenario})$ vengono appresi da *set* di dati di questo tipo attraverso un algoritmo iterativo di massimizzazione della *likelihood* del modello noto come *Expectation-Maximization*.

In questo contesto un modello probabilistico è uno strumento estremamente utile per quantificare la diversità risultante dal processo di generazione. Un primo indicatore di questa diversità è dato dall'entropia della distribuzione di proba-

bilità inferita: per esempio, si è stimato [9] che lo spazio dei recettori dei linfociti T (catena β) abbia un'entropia di ~ 44 bits, la quale corrisponde a una dimensione effettiva (ossia come se la distribuzione fosse uniforme) di $\sim 10^{13}$ sequenze diverse.

Inoltre, l'inferenza di un modello relativamente semplice, che prevede dei termini di probabilità fattorizzati per i vari meccanismi coinvolti nella generazione (Fig. 2B), consente di sezionarne i contributi alla diversità risultante. Per esempio, essendo le possibili combinazioni dei segmenti VDJ solo un migliaio, il maggiore contributo ad un processo di diversificazione che dà luogo a milioni di recettori deriva da inserzioni e delezioni; secondo le stime riportate in [7], questo contributo equivale circa all'83% dell'entropia degli eventi di ricombinazione.

Selezione dei recettori

La diversità risultante dal processo di generazione può essere considerata come la diversità potenziale dei recettori [3] ed il processo successivo di selezione timica ne comporta una netta riduzione, come quantificabile attraverso un modello probabilistico per tale selezione.

Il modello discusso negli articoli [10, 11] serve a descrivere la distribuzione statistica P_{post} delle sequenze post-selezione, ovvero delle sequenze che superano la selezione timica e che quindi si trovano, di fatto, nel repertorio immunitario individuale in condizioni normali.

Esempi di *set* di dati da cui può essere inferito provengono dal sequenziamento dei recettori contenuti in campioni di sangue. La scrittura del modello (vedi anche Fig. 3B) si basa sulla definizione di fattori di selezione $Q(r)$ tali che:

$$P_{\text{post}}(r) = Q(r)P_{\text{gen}}(r), \quad (1)$$

ovvero tali da incorporare gli effetti della selezione che agiscono, a livello statistico, sulla composizione di un recettore r in aggiunta ai vincoli di composizione imposti dal processo di generazione (e riassunti da P_{gen}).

Come per il modello di generazione, i parametri (qui i fattori Q) sono inferiti dai dati seguendo

²Dati di questo tipo sono forniti dalle cosiddette sequenze *out-of-frame*, ossia ricombinazioni del materiale genetico che risulterebbero in recettori non-funzionali. Tipicamente in questi casi la ricombinazione viene ripetuta a partire dal secondo cromosoma per produrre un recettore funzionale, ma il DNA del linfocita conserva comunque la sequenza ricombinata *out-of-frame*. In quanto non espresse come recettori, le sequenze *out-of-frame* non sono sottoposte ad alcuna selezione, restituendo un ritratto fedele del solo processo di generazione.

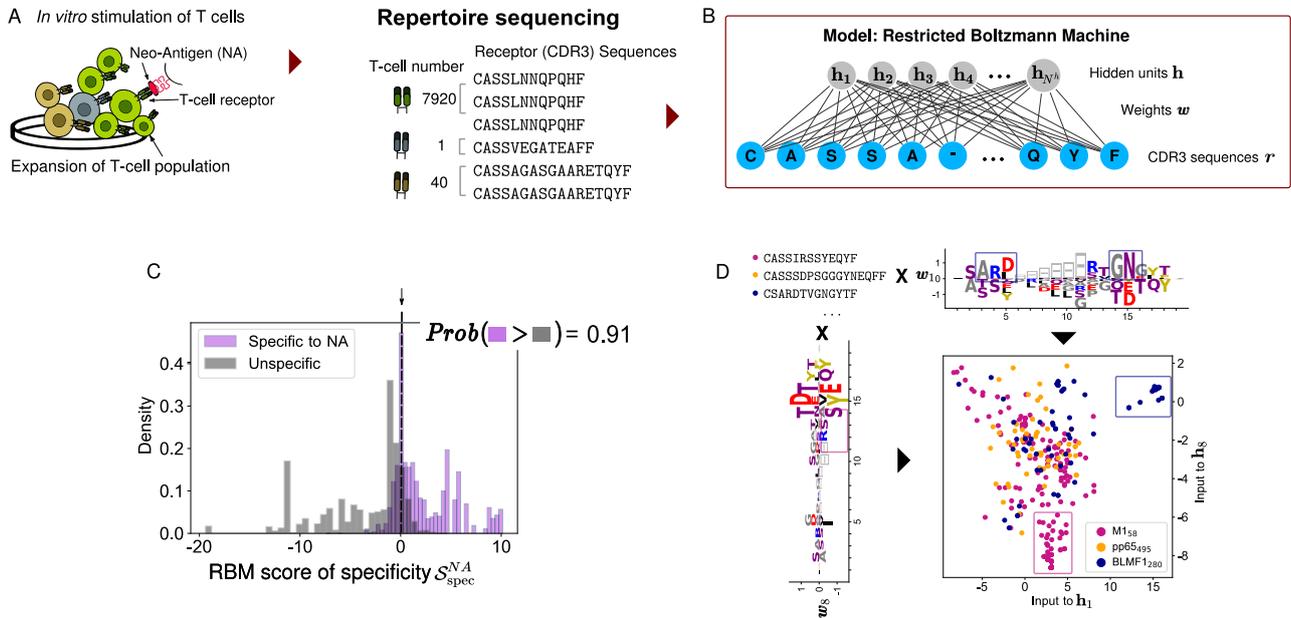


Figura 5: Esperimenti di stimolazione *in vitro* dei linfociti T con neoantigeni specifici del paziente (effettuati da [16]) restituiscono set di dati in cui le abbondanze dei recettori sono rappresentative del grado di reattività dei linfociti corrispondenti (A) e da cui si può apprendere, attraverso la RBM (B), la probabilità di risposta ad un certo neoantigene NA, $P^{NA}(\mathbf{r})$. C: Abbiamo definito uno score di specificità di risposta al neoantigene NA come $S_{spec}^{NA}(\mathbf{r}) = \log P^{NA}(\mathbf{r}) - \max_a \log P^a(\mathbf{r})$ (dove a nel secondo termine varia fra le stimolazioni antigeniche testate nello stesso paziente). I valori S_{spec}^{NA} consentono di discriminare i recettori che rispondono specificamente al neoantigene NA (valori positivi) da quelli che non vi sono specifici, come testimoniato dalla stima della probabilità (0.91) che il modello assegni uno score più alto ai recettori che effettivamente appartengono a popolazioni di linfociti T espanse. D: Modello RBM di riconoscimento appreso da un repertorio che raccoglie recettori dagli esperimenti di [18] specifici ad antigeni virali comuni (M1₅₈: virus dell'influenza, pp65₄₉₅: citomegalovirus, BLMF1₂₈₀: virus Epstein-Barr). Ogni input ad una unità nascosta raggruppa i dati in base a proprietà globali catturate dai pesi che comunicano con quella unità: qui ogni input riunisce in un cluster (indicato dal quadrato magenta o blu) i recettori che possiedono il gruppo funzionale di amminoacidi, anch'esso indicato da un quadrato magenta o blu, ravvisabile nei pesi corrispondenti visualizzati (ogni lettera sta per un amminoacido e la sua altezza per il valore del peso associato). I due diversi gruppi funzionali caratterizzano recettori che riconoscono due virus diversi (come segnalato dal colore). La figura è adattata da [12].

il criterio di *maximum likelihood*, il quale è anche equivalente a richiedere che la probabilità del modello P_{post} riproduca nel modo migliore possibile la distribuzione statistica degli amminoacidi alle singole posizioni del ricettore osservata nei dati.

L'entropia associata alla distribuzione inferita, P_{post} , consente di stimare quantitativamente che la riduzione di diversità legata alla selezione porta dai ~ 44 bits menzionati per il processo di generazione a ~ 38 bits [10], corrispondente a una dimensione effettiva dello spazio dei recettori post-selezione di $\sim 10^{11}$ sequenze. Si tratta qui della diversità compatibile con la funzionalità dei recettori, una diversità esponenzialmente grande seppur notevolmente diminuita rispetto alla diversità potenziale messa in atto

dalla generazione: la selezione delle sequenze funzionali corrisponde infatti all'eliminazione, principalmente, delle sequenze rare, cioè delle sequenze che hanno più bassa probabilità di essere generate ma che, per questa ragione, contribuiscono maggiormente alla diversità potenziale. Grosso modo, possiamo pensare al repertorio individuale di $\sim 10^8$ recettori come una porzione, estratta in maniera aleatoria, di questo spazio della diversità funzionale.

I fattori di selezione Q , inoltre, possono essere facilmente visualizzati, rilevando così le posizioni e/o i tipi di amminoacidi maggiormente affetti dal processo di selezione.

L'aspetto di visualizzazione è particolarmente vantaggioso quando si scelgono, come possibili set di dati di partenza, dei repertori di recettori

sottoposti a certi stimoli antigenici, dove i fattori di selezione contribuiscono ad identificare un arricchimento mirato di certi motivi di sequenza statisticamente associati alla risposta immunitaria a quell'antigene. Questo è uno dei risultati che mostriamo in [12], dove abbiamo utilizzato un modello con la struttura dell'eq. (1) alla stregua di quello che potremmo piuttosto chiamare un modello del riconoscimento specifico dell'antigene.

Riconoscimento specifico dell'antigene

È possibile mettere a punto dei modelli statistici dei repertori immunitari anche per predire la probabilità di riconoscimento specifico da parte dei linfociti T di antigeni di origine virale o tumorali, riconoscimento che avviene attraverso l'instaurazione di un legame biochimico specifico fra questi ultimi e i recettori di membrana dei linfociti T.

Nel lavoro [12] abbiamo sviluppato modelli di questo tipo non solo convertendo il modello di selezione a questo scopo (vedi sopra), bensì soprattutto ricorrendo ad un altro approccio, ideato nella comunità dell'apprendimento automatico [13, 14] e noto come *Restricted Boltzmann Machines* (che d'ora in poi indicherò con l'acronimo RBM). Tale approccio, fra l'altro, è stato già egregiamente presentato su questa rivista sia da Daniele Tantari che da Aurélien Decelle [15].

L'architettura di una RBM è riportata in Fig. 5B: per riassumerla brevemente, i singoli siti delle sequenze osservate che si intendono modellizzare (qui le sequenze del recettore \mathbf{r}) sono accoppiati ad un livello di unità nascoste \mathbf{h} tramite un insieme di connessioni chiamate pesi.

A livello matematico, il modello è dunque specificato dalla distribuzione di probabilità congiunta $P(\mathbf{r}, \mathbf{h})$ fra le sequenze osservate \mathbf{r} e le unità nascoste \mathbf{h} di cui la distribuzione di probabilità dei dati $P(\mathbf{r})$ è la distribuzione marginalizzata sulle unità nascoste:

$$P(\mathbf{r}) = \int \prod_{\mu} dh_{\mu} P(\mathbf{r}, \mathbf{h}), \quad P(\mathbf{r}, \mathbf{h}) \sim e^{-\mathcal{E}(\mathbf{r}, \mathbf{h})},$$

$$\mathcal{E}(\mathbf{r}, \mathbf{h}) = - \underbrace{\sum_i g_i(r_i)}_{\text{Campi locali}} + \underbrace{\sum_{\mu} \mathcal{U}_{\mu}(h_{\mu})}_{\text{Potenziali nascosti}} - \underbrace{\sum_{i, \mu} h_{\mu} w_{i\mu}(r_i)}_{\text{Termine con i pesi}}. \quad (2)$$

In quest'ultima espressione l'indice i denota le unità osservate mentre l'indice μ le unità nascoste.

Il vantaggio legato all'introduzione di un livello di unità nascoste (che a buon diritto può essere visto un po' come un artificio, una convenzione del modello) è quello di rendere il modello particolarmente espressivo, pur mantenendolo trattabile dal punto di vista analitico: riscrivere una distribuzione $P(\mathbf{r})$ in termini di una distribuzione congiunta consente infatti di includere delle correlazioni fra i siti delle sequenze \mathbf{r} anche di ordine superiore al secondo, senza una proliferazione di termini di interazione a molti corpi e dei parametri associati.

In maniera analoga ai modelli di generazione e selezione discussi finora, tutti i parametri del modello scritti nell'eq. (2) (i pesi, i campi locali sulle unità osservate, i parametri che specificano i potenziali sulle unità nascoste) vengono appresi a partire dai dati ottemperando al criterio di *maximum likelihood*.

I dati utili a costruire il modello RBM di riconoscimento provengono dal sequenziamento dei recettori in campioni di sangue dove una risposta dei linfociti viene stimolata *in vitro* attraverso l'esposizione di un antigene selezionato. Repertori di recettori ottenuti in questo modo possono essere visti come un campionamento del processo di espansione delle popolazioni di linfociti T che segue al riconoscimento dell'antigene (Fig. 1): i diversi recettori vi compaiono dunque con abbondanze diverse, e le abbondanze maggiori sostanzialmente segnalano le popolazioni più espanse che dominano la risposta immunitaria (Fig. 5A).

Da *set* di dati con questa struttura, abbiamo appreso attraverso la RBM una distribuzione di probabilità $P(\mathbf{r})$ interpretabile come la probabilità che il linfocita col recettore \mathbf{r} riconosca l'antigene considerato nell'esperimento.

Muniti di queste probabilità per diversi antigeni testati in diversi individui, le possiamo confrontare al fine di identificare quali recettori sono reattivi specificamente ad un

Che cos'è l'immunoterapia?

Per **immunoterapia** si intendono tutti quei trattamenti oncologici mirati a stimolare nel paziente una risposta immunitaria contro il tumore. Possono essere suddivisi in tre macro-tipologie:

- *Immune Checkpoint Inhibitors*: farmaci che inibiscono le molecole impegnate a frenare i linfociti T, sbloccandone così l'azione anti-tumorale. La loro scoperta è valse il Nobel per la Medicina 2018, assegnato congiuntamente a James P. Allison e Tasuku Honjo.
- Terapie basate sulle cellule CAR-T (dall'inglese *Chimeric Antigen Receptor T cell*): approccio in cui linfociti T sono direttamente prelevati dal paziente, modificati in laboratorio per accrescerne la specificità di riconoscimento delle cellule tumorali e ri-trasferiti al paziente.
- Vaccini anti-cancro: terapie basate sulla somministrazione di neoantigeni (antigeni contenenti mutazioni acquisite durante la progressione tumorale) in maniera da allenare una risposta immunitaria contro le cellule tumorali che li presentano.

In parte queste terapie sono approvate per l'impiego nella prassi clinica per alcuni tipi di tumore (come il melanoma), in parte sono in fase di sperimentazione. Per una descrizione più dettagliata si rimanda a [17].

determinato antigene e non ad altri (Fig. 5C). In particolare, ci siamo concentrati sulla modellizzazione quantitativa del riconoscimento dei cosiddetti neoantigeni, ovvero antigeni provenienti da proteine proprie dell'organismo umano ma riconoscibili come estranei in quanto contengono mutazioni occorse durante la progressione tumorale; i dati sperimentali a nostra disposizione (dal lavoro [16]) descrivono la risposta in pazienti affetti da tumore al pancreas.

Lo studio delle reazioni immunitarie ai neoantigeni si inserisce in un contesto di ricerca più ampio, che mira a costruire un quadro di comprensione della risposta immunitaria contro le cellule tumorali messa in campo dai linfociti T ed in parallelo a supportarne il trasferimento nell'ambito clinico dell'immunoterapia (vedi riquadro).

A livello di predizioni del modello, è possibile osservare che i parametri inferiti dell'RBM (in particolare i pesi) rilevano dei motivi di sequenza potenzialmente funzionali, ed in generale è ragionevole ipotizzare che tali motivi identifichino certi gruppi di amminoacidi che contribuiscono a stabilire il legame biochimico con l'antigene, fornendo così degli input precisi per dei test sperimentali. Un'evidenza preliminare: i motivi di sequenza indicati in Fig. 5D, ottenuti apprendendo un modello RBM di riconoscimento su *set* di

recettori specifici ad antigeni virali estremamente comuni come l'influenza, sono validabili in questa interpretazione funzionale a partire dalle strutture del complesso antigene-recettore, come mostrato in [18].

In aggiunta, la proiezione delle sequenze *r* sui pesi che le collegano con una certa unità nascosta (il cosiddetto input di una unità nascosta, Fig. 5D) disegna le coordinate di un nuovo spazio di rappresentazione che "comprime" i dati amplificando i *pattern* e le regolarità rilevanti all'apprendimento delle loro proprietà statistiche; nel caso delle proteine, tali rappresentazioni interne sono riconducibili a caratteristiche funzionali, strutturali, filogenetiche condivise da sottogruppi delle sequenze modellizzate³ [19]. L'idea alla base, ben illustrata proprio dall'applicazione ai recettori dei linfociti T (Fig. 5D), è che gli input alle unità nascoste separano gruppi di recettori accomunati dai motivi di sequenza

³Il numero delle unità nascoste è uno dei cosiddetti "iperparametri" del modello, in quanto pertinenti alla sua struttura globale, e viene fissato con procedure standard di validazione incrociata in cui si effettua l'apprendimento su una porzione dei dati per poi valutarne la performance sulla porzione rimanente. Intuitivamente, allora, la ricerca iperparametrica del numero di unità nascoste può essere pensata come una ricerca empirica del numero più adeguato di *pattern*, sottotipologie o caratteristiche per rappresentare i dati in considerazione.

rilevati dai pesi ed, in virtù dell'interpretazione funzionale di questi motivi in termini di specificità di legame con l'antigene, permettono dunque di ben separare gruppi di recettori con specificità di riconoscimento verso virus diversi.

L'identificazione di motivi di sequenza potenzialmente funzionali mostra come un modello probabilistico del riconoscimento possa non solo fungere da strumento per individuare quali recettori rispondono ad un dato antigene, ma possa anche contribuire ad isolare, almeno parzialmente, quali proprietà a livello biochimico lo rendono in grado di rispondervi in modo specifico. Modelli statistici che affrontano in maniera più puntuale questa domanda, tuttavia, dovrebbero descrivere l'interazione specifica fra i siti dell'antigene e quelli del recettore: la possibilità di costruire modelli statistici di questo tipo è resa sempre più concreta dalla crescita costante di dati sperimentali, che sopperirà gradualmente anche alla mancanza di un campionamento *high-throughput* e combinato di antigeni e dei recettori che li riconoscono, ovvero un campionamento del processo di interazione antigene-recettore.

Presentazione dell'antigene

Le RBM sono un approccio che consente di modellizzare a livello probabilistico anche il processo complementare al riconoscimento dell'antigene, ossia la presentazione di quest'ultimo da parte di una determinata molecola HLA.

Io ed i miei collaboratori abbiamo utilizzato le RBM con questo scopo in [20], partendo da *set* di dati sperimentali che mappano grandi quantità di antigeni presentati dalle proteine HLA in un certo campione biologico (un tessuto per esempio).

Da questi dati abbiamo appreso una distribuzione di probabilità, parametrizzata come nell'eq. (2), che può essere interpretata come la distribuzione di probabilità del processo di presentazione, ovvero una distribuzione che incorpora i vincoli, a livello di composizione in amminoacidi, che rendono un antigene presentabile. Questo modello RBM è poi divenuto il nucleo di funzionamento di un metodo che abbiamo denominato

RBM-MHC (dove MHC è un altro acronimo per indicare i complessi proteici HLA [1]).

Si tratta di un metodo sia per predire, assegnando uno *score* probabilistico di presentazione attraverso la distribuzione di probabilità inferita, quali porzioni di proteine, virali o tumorali, sono presentate al sistema immunitario (Fig. 6A-D), sia per predire il tipo di proteina HLA che più plausibilmente presenta un certo antigene⁴ (Fig. 6C-E).

A questo proposito, nello spazio di rappresentazione della RBM (Fig. 6B), gli antigeni si organizzano in *cluster* (gruppi) sulla base della composizione biochimica, e, siccome le proprietà di legame con la proteina HLA dipendono dalla presenza di certi gruppi funzionali di amminoacidi, *cluster* differenti corrispondono ad antigeni che si legano in maniera specifica a differenti proteine HLA. Lo scopo è stato allora sfruttare questa rappresentazione dei dati interna al modello per predire quale proteina HLA presenta un certo antigene, costruendo, sempre tramite l'apprendimento automatico, un classificatore della tipologia HLA (Fig. 6C).

La struttura in *cluster* della rappresentazione compressa dei dati elaborata dalla RBM, che già separa gli antigeni in base alla specificità di legame con l'HLA, fa sì che questo classificatore possa essere appreso utilizzando solo una piccola percentuale di antigeni, di tipologia HLA nota dalle banche dati, per poi essere in grado di associare accuratamente gli antigeni restanti alla tipologia HLA corrispondente (Fig. 6E). Tale approccio è dunque utile soprattutto per la caratterizzazione di tutti quei *set* di dati di recente produzione (per esempio in test clinici), per cui è possibile recuperare l'annotazione relativa alla specificità HLA dalle banche dati solo in una minoranza di casi.

Predizioni computazionali sulla presentazione vengono tipicamente sfruttate nello sviluppo dei vaccini, più specificatamente per la selezione iniziale delle regioni del proteoma di un virus presentabili dagli HLA più comuni nella popolazione umana, in modo da individuare un *set* li-

⁴Questa infatti è un'informazione che tipicamente non è nota quando un antigene viene rilevato sperimentalmente, ciò che è noto è il *set* dei 6 tipi di HLA posseduti a livello genetico dall'individuo da cui il campione è stato prelevato.

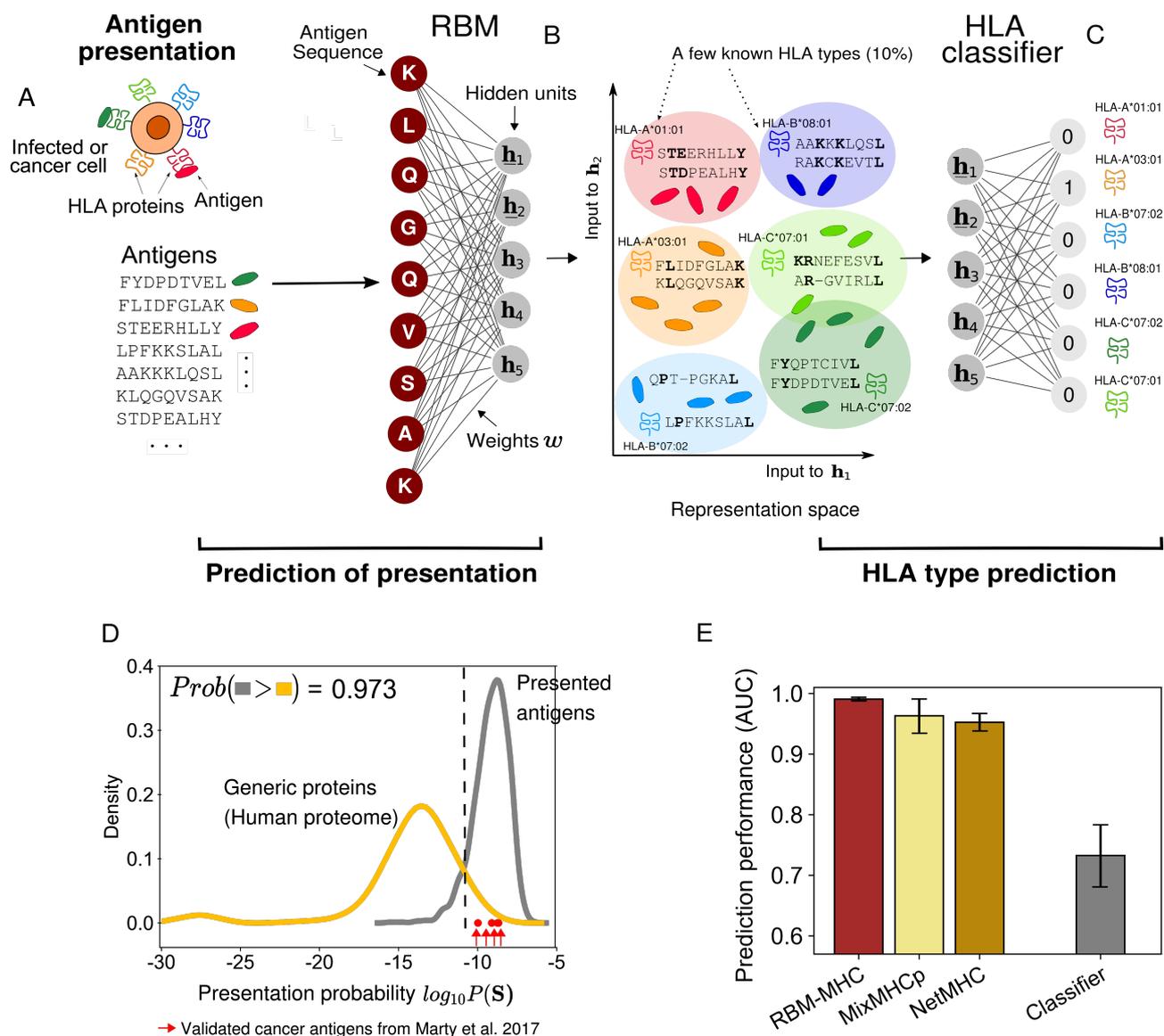


Figura 6: Struttura del metodo RBM-MHC per la predizione della presentazione degli *antigeni* da parte di specifici HLA (A). La predizione di quali *antigeni* sono presentabili è effettuata assegnando la probabilità di presentazione inferita tramite una RBM (B): il pannello D mostra che questa quantità è capace di discriminare *antigeni* sperimentalmente rilevati come presentati (come degli *antigeni* tumorali, marcati in rosso) e generici frammenti di proteine che generalmente non sono presentabili. La qualità della predizione è misurata dalla probabilità che il modello assegni uno score probabilistico più alto agli *antigeni* effettivamente presentati (0.97). In un secondo momento, il metodo apprende un classificatore (C), in modo da sfruttare la struttura a cluster dello spazio di rappresentazione della RBM per predire il tipo di HLA che presenta ogni *antigene*. Anche quando le associazioni *antigene*-HLA a disposizione durante l'apprendimento coprono solo una piccola percentuale dell'intero set di *antigeni*, la predizione finale è estremamente accurata (E), del tutto paragonabile allo stato dell'arte (fornito da algoritmi come NetMHC [27]) e decisamente più alta di un classificatore appreso dalla stessa piccola porzione di associazioni note a partire direttamente dalle sequenze (e non dalla loro rappresentazione nello spazio degli input alle unità nascoste). La figura è adattata da [20].

mitato di potenziali *target* antigenici da validare sperimentalmente in fasi successive.

Un ruolo simile è quello svolto nell'ambito dell'immunoterapia (vedi riquadro) ed in particolare nella cosiddetta *neoantigen discovery*, ovvero per l'identificazione dei neoantigeni, specifici al paziente, suscettibili di scatenare una risposta immunitaria da parte dello stesso, un passaggio chiave nello sviluppo di vaccini anticancro personalizzati. In questo contesto, metodi computazionali le cui predizioni possono essere formulate solo a partire dalla sequenza sono di estrema importanza: essi consentono infatti di filtrare speditamente quello che tipicamente è un enorme numero di candidati neoantigeni (provenienti da tutti i possibili frammenti di proteine contenenti delle mutazioni), andando a selezionare solo i frammenti che hanno un'alta probabilità di essere presentati dalle proteine HLA del paziente [21].

Per sviluppare procedure di *neoantigen discovery* realmente efficaci, la predizione della presentazione deve essere complementata da una stima del potenziale di riconoscimento dei neoantigeni da parte dei linfociti T del repertorio individuale. Identificare le proprietà degli antigeni che ne determinano il potenziale di riconoscimento e la predizione quantitativa di quest'ultimo sono tuttavia problemi assolutamente aperti [22], la cui soluzione aggiungerà un mattone fondamentale sia alla nostra comprensione teorica della risposta immunitaria sia ai nascenti approcci di medicina personalizzata.

Nel panorama del *Machine Learning*

Gli approcci *data-driven* fin qui descritti sono caratterizzati da strutture relativamente semplici, mappabili in modelli di meccanica statistica; l'impiego che ne ho delineato è essenzialmente quello di individuare dei *pattern* statistici in grandi moli di dati e ricavarne predizioni. Questo è esattamente uno di quei problemi computazionali che costituiscono il campo di applicazione classico di svariate tecniche di apprendimento automatico (o *machine learning*), come le reti neurali e, più di recente, le reti organizzate su svariati livelli dette profonde (*deep learning*⁵).

⁵Si vedano, per delle spiegazioni più esaustive, gli articoli per esempio di Guido Sanguinetti, Carlo Lucibello e

Con la rivoluzione apportata nell'ultima decade soprattutto dal *deep learning*, approcci di apprendimento automatico sono utilizzati in maniera crescente anche per affrontare i problemi di immunologia computazionale di cui si è discusso. Ne menziono solo alcuni a scopo illustrativo: modelli basati sull'architettura profonda del *Variational Autoencoder* [23], proposti come un'alternativa per ricostruire la distribuzione di probabilità del processo di generazione (senza però incorporarne esplicitamente i meccanismi noti); soNNia [24], una versione *deep* del modello di selezione qui presentato; classificatori dei recettori per specificità di risposta verso un determinato insieme di antigeni (come TCRex [25] e DeepTCR [26]); NetMHC [27], il metodo di più ampia diffusione per predire la presentazione dell'antigene da parte di una certa molecola HLA, il quale è strutturato come una rete neurale appresa in modo supervisionato a partire dall'informazione sull'affinità di legame degli antigeni all'HLA corrispondente.

Per contrasto con le architetture *deep*, la tipologia di apprendimento eseguito dalle RBM viene chiamata *shallow learning* (letteralmente, apprendimento superficiale), come è evidente dalla sua rappresentazione grafica, che prevede un solo livello nascosto (Fig. 5B). Chiaramente le architetture *deep*, combinando più livelli che elaborano l'informazione attraverso trasformazioni non lineari successive, sono in grado di specificare funzioni arbitrariamente complesse e di realizzare dei fit statistici dei dati sofisticati, capaci per esempio di individuare *pattern* complessi e di riprodurre proprietà statistiche che non si limitano alle sole medie o correlazioni a due punti.

C'è qualche vantaggio che dovrebbe motivarci a privilegiare anche degli approcci *shallow*? Modelli dalla struttura più semplice sono tipicamente modelli più parsimoniosi in termini di parametri, proprio perché specificati da un numero inferiore di questi ultimi. Da un lato, modelli parsimoniosi consentono di mantenere sotto controllo meglio il problema dell'*overfitting*, che porta il modello appreso a conformarsi troppo dettagliatamente sul particolare *set* di dati a disposizione, perdendo potere di generalizzazione su dati nuovi. Questo problema è indotto dalla

Giorgio Buttazzo sul recente numero di Ithaca dedicato all'intelligenza artificiale [15].

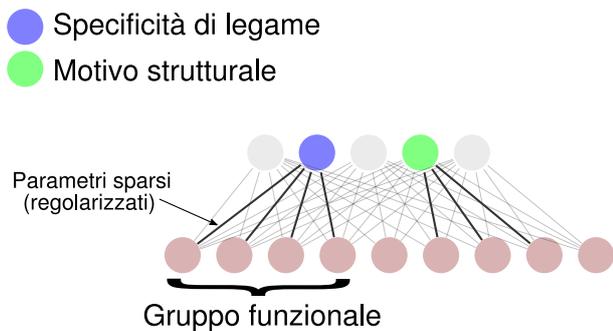


Figura 7: Rappresentazione stilizzata di un esempio dell'effetto di una regolarizzazione che favorisce la sparsità: valori significativamente diversi da zero dei pesi (colore scuro) si concentrano su alcuni siti della sequenza, per esempio quelli in cui compare un gruppo funzionale di amminoacidi che ne determina la specificità di legame con altre molecole. L'unità nascosta connessa a quei pesi può essere immediatamente interpretata come l'unità che cattura questa proprietà e, ricevendo input di valore diverso dalle sequenze con varianti distinte del gruppo funzionale, aiuta a discriminare diverse specificità di legame. Similmente altre unità nascoste rendono manifeste altre proprietà, come la presenza di diversi motivi strutturali.

condizione di inferire un numero troppo elevato di parametri a partire dall'informazione di un set di dati molto limitato (come è spesso il caso in biologia, soprattutto quando i dati sono prodotti in esperimenti gravosi sia dal punto di vista dei costi che del tempo impiegato); modelli con un numero modesto di parametri sono allora meno affetti da questo problema, a cui invece è necessario fare particolare attenzione con le architetture *deep*, tipicamente sovrapparametizzate.

Dall'altro lato, modelli parsimoniosi equivalgono sia a modelli i cui parametri possono essere ispezionati visualmente sia spesso a modelli più trattabili a livello matematico, ovvero studiabili tramite calcoli analitici: questi sono aspetti che favoriscono la cosiddetta interpretabilità del modello, un'altra istanza che può e deve legittimamente intervenire nella selezione del modello.

L'interpretabilità, nell'ambito dell'apprendimento automatico, non è un concetto con un'accezione univoca, potendosi riferire sia all'intelligibilità e alla trasparenza dell'algoritmo a livello di funzionamento sia al grado di spiegabilità del processo modellizzato e delle predizioni formulate sulla base del modello appreso [28]. La scelta di modelli trattabili e parsimoniosi è funzionale a questa seconda accezione (la spiegabilità dell'esito dell'apprendimento come modello del fenomeno), la quale può essere ulteriormente supportata da opportune scelte di termini di **regolarizzazione**.

I termini di regolarizzazione sono dei termini che vengono introdotti nell'inferenza per controllare i valori e le interdipendenze dei parametri durante il loro apprendimento; si tratta di termini particolarmente necessari ad evitare sia l'*overfitting* che possibili divergenze nei va-

lori inferiti quando si ha un numero limitato di dati, permettendo allo stesso tempo di regolare il tipo ed il regime di rappresentazione fornita dai parametri. Per esempio, si può optare per una regolarizzazione che favorisca la sparsità dei parametri, ovvero una distribuzione disomogenea per cui i parametri significativamente diversi da zero si concentrano solo fra alcune unità dell'RBM e sono così più facilmente visualizzabili (Fig. 7). Una tale regolarizzazione ha anche il beneficio di rendere più separabile il contributo di alcuni sottogruppi di unità alla rappresentazione interna dei dati resa possibile dal livello nascosto, la quale potrà così essere interpretata in termini, per esempio, di proprietà biofisiche (si veda Fig. 7 e [19] per degli esempi con le proteine). È stato sistematicamente studiato [29] come le regolarizzazioni giochino un ruolo fondamentale per esempio nella transizione fra il regime di rappresentazione per prototipi e quella compositiva (ovvero per caratteristiche separate dei dati), descritta anche da Daniele Tantari su questa rivista [15]. Tali rappresentazioni per tipi o per proprietà condivise, a cui si è già accennato in precedenza, comportano una riduzione della dimensionalità dello spazio di modellizzazione dei dati, la quale può agevolare la scoperta di nuove regolarità ed associazioni, a loro volta da sfruttare per formulare nuove predizioni (un po' come la predizione della tipologia HLA illustrata in Fig. 6B-C); non è un caso, infatti, che ormai esistano numerosi algoritmi concepiti prima di tutto per la riduzione di dimensionalità dei dati (t-SNE, UMAP, DBSCAN etc.).

Domande aperte e limitazioni, ovvero spazi per la ricerca futura

L'enorme disponibilità di dati di un certo tipo (le sequenze) ha aperto nuove possibilità di modellizzazione a determinati livelli di descrizione, soprattutto molecolari. Le predizioni dei modelli ottenuti sono dunque basate sugli osservabili a cui questi dati garantiscono accesso: da una parte, le regolarità a livello di composizione in amminoacidi, indicative per esempio della propensione a stabilire legami biochimici recettore-antigene, e dall'altra le abbondanze delle singole sequenze, che consentono per esempio di quantificare il grado di espansione di alcune popolazioni di linfociti T.

Tuttavia una serie ulteriore di eventi, a cui pertengono modalità di misura e di descrizione matematica differenti, concorre ad indurre l'attivazione dei linfociti [3]: il tempo tipico di durata del legame chimico, il *clustering* dei recettori, la riorganizzazione dinamica della membrana dei linfociti con la formazione della sinapsi immunologica, modificazioni conformazionali, reazioni chimiche di *signaling* innescate dal legame antigene-recettore ecc. Il passaggio dal riconoscimento molecolare alla risposta è poi un effetto collettivo, di popolazione, sensibile al contesto dato dalle altre cellule del sistema immunitario.

Pertanto, la predizione basata sulle sequenze, seppur importantissima per estrarre informazioni dai dati disponibili in grande quantità, è intrinsecamente incompleta e deve allora, a maggior ragione, essere specificata a livello probabilistico.

Approcci che siano in grado di combinare diversi livelli di descrizione, integrando dati di diversa natura (strutture, affinità di legame oltre alle sequenze) costituiscono un obiettivo di comune interesse nella comunità allargata fra immunologia computazionale e biofisica statistica.

Certamente una domanda aperta, nonché di formidabile difficoltà dal punto di vista della scrittura dei modelli, è come scale globali e locali si influenzino a vicenda nel determinare la risposta immunitaria.

Anche dal punto di vista dell'impiego dell'apprendimento statistico nella modellizzazione del biologico vi sono da sottolineare delle limita-

zioni, sia teoriche e che pratiche, su cui parte del lavoro futuro potrebbe focalizzarsi. In questa modellizzazione statistica, come in ogni sforzo di modellizzazione, è implicita una maniera di rappresentare le variabili (qui le molecole biologiche) basata su delle assunzioni che apportano un vantaggio operativo ma non sempre completamente giustificate dal punto di vista dei fondamenti teorici.

Per esempio, pensiamo alle molecole biologiche come realizzazioni equivalenti ed indipendenti, quando invece, ad esempio per le famiglie di proteine, l'assunzione di indipendenza è particolarmente delicata siccome le proteine sono legate da relazioni filogenetiche (e correggere questi bias richiede soluzioni *ad hoc*); o ancora, le pensiamo in uno spazio statico, come se l'evoluzione avesse raggiunto l'equilibrio invece che essere un processo dinamico, continuamente in atto e plausibilmente fuori dall'equilibrio.

Similmente, modellizzare un intero spazio di possibili realizzazioni con i *set* di dati disponibili è un'approssimazione, soprattutto se guardiamo a spazi popolati da realizzazioni di un'enorme diversità, e con una distribuzione statistica eterogenea, come i recettori immunitari o gli antigeni.

Per quanto il quantitativo di dati di sequenziamento a disposizione cresca continuamente, dobbiamo per ora limitarci a pensarlo come un campionamento sì estremamente informativo ma sparso, non-esaustivo dello spazio intero.

Tecniche di evoluzione diretta [30] e di *deep mutational scanning* [31], che misurano sistematicamente gli effetti sulle proprietà biochimiche di legame di singole mutazioni, consentono dei campionamenti più densi dello spazio funzionale delle molecole biologiche, fornendo dunque la materia prima per costruire modelli con una più alta risoluzione sui dettagli molecolari del riconoscimento da parte dei linfociti e della loro conseguente attivazione.

Conclusione

In questo articolo ho descritto a grandi linee come si innesca, a livello molecolare, la risposta del sistema immunitario contro agenti patogeni e cellule tumorali, sottolineando un'interessante convivenza fra diversità e specificità che

pone sfide complesse sia di concettualizzazione che di formalizzazione matematica di modelli esplicativi per tali dinamiche.

In questo contesto, mi sono concentrata su schemi di modellizzazione che si innestano sulla maniera di pensare della meccanica statistica e che allo stesso tempo fanno ricorso all'apparato di tecniche dell'apprendimento statistico.

L'idea cardine consiste nel pensare i repertori immunitari come ipotetici spazi di possibilità fortemente vincolati da pressioni funzionali, e nel cercare dei modelli che realizzino una rappresentazione intellegibile di queste pressioni, estrapolando anche delle predizioni, attraverso l'inferenza delle distribuzioni di probabilità su questi spazi.

Si tratta dunque di approcci con un paradigma operativo ibrido, in quanto finalizzati ad elaborare modelli teorici ma con una forte componente induttiva ed empirica, derivante dall'aver incorporato l'informazione dei dati disponibili attraverso l'apprendimento statistico⁶.

Gli esempi che ho fornito sono dei modelli quantitativi per quattro processi alla base della capacità di risposta dei linfociti: la generazione dei recettori, la loro selezione, il riconoscimento degli antigeni da essi implementato e la presentazione degli antigeni.

Nel discutere questi esempi, ho tentato di rendere chiaro infine che si tratta di approcci interdisciplinari non solo nel metodo ma anche nell'esito, in quanto hanno le potenzialità per confrontarsi con problemi di rilievo sia per l'immunologia che per la bioinformatica e la medicina più in generale.

Ringraziamenti

Ringrazio i miei mentori su questi argomenti, Simona Cocco, Rémi Monasson, Thierry Mora, Aleksandra M. Walczak, Vinod P. Balachandran e Benjamin D. Greenbaum, e tutte le persone da cui ho avuto modo di imparare sia nell'équipe "Physique Statistique et Inférence pour la Biologie" ad École Normale Supérieure che nella collaborazione "Computational Deconstruction of

⁶Se vogliamo, questo è proprio il paradigma operativo dell'ape nella similitudine di Francis Bacon riportata nell'*incipit*, la quale raccoglie materiale dal mondo circostante per poi trasformarlo con i propri strumenti e secondo i propri fini.

Neoantigen-TCR Degeneracy for Cancer Immunotherapy" supportata da Stand Up to Cancer - Lustgarten Foundation. Ringrazio in particolare Silvia Grigolon, Cosimo Lupo e Sara Torrenzieri per i loro preziosi commenti sul manoscritto.



- [1] L. Sompayrac, *How the Immune System Works*, 4th ed. Wiley-Blackwell, Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ (2012).
- [2] F.M. Burnet, *A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection*, Aust. J. Sci., 20 (1957).
- [3] G. Altan-Bonnet, T. Mora, A.M. Walczak, *Quantitative Immunology for Physicists*, Phys. Rep., 849 (2020).
- [4] D. Mason, *A Very High Level of Crossreactivity Is an Essential Feature of the T-Cell Receptor*, Immunol. Today, 19 (1998) 9.
- [5] G. Longo, M. Montévil, *Extended criticality, phase spaces and enablement in biology*, Chaos, Solitons & Fractals, 55 (2013).
- [6] S. Cocco et al., *Inverse Statistical Physics of Protein Sequences: A Key Issues Review*, Rep. Prog. Phys., 81 (2018) 3.
- [7] A. Murugan et al., *Statistical inference of the generation probability of T-cell receptors from sequence repertoires*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109 (2012) 40.
- [8] Q. Marcou, T. Mora, A.M. Walczak, *High-throughput immune repertoire analysis with IGoR*, Nat. Commun., 9 (2018) 1.
- [9] Z. Sethna et al., *OLGA: fast computation of generation probabilities of B- and T-cell receptor amino acid sequences and motifs*, Bioinformatics, 35 (2019).
- [10] Y. Elhanati et al., *Quantifying selection in immune receptor repertoires*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111 (2014) 27.
- [11] Z. Sethna et al., *Population Variability in the Generation and Selection of T-Cell Repertoires*, PLoS Comput. Biol., 16 (2020) 12.
- [12] B. Bravi et al., *Probing T-cell response by sequence-based probabilistic modeling*, PLoS Comput. Biol., 17 (2021) 9.
- [13] P. Smolensky, *Information Processing in Dynamical Systems: Foundations of Harmony Theory*. In: D.E. Rumelhart, J.L. McClelland, eds. *Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructure of Cognition*, MIT Press, Cambridge, Massachusetts (1986).
- [14] G.E. Hinton, *Training Products of Experts by Minimizing Contrastive Divergence*, Neural Comput., 14 (2002) 8.
- [15] *Ithaca: Viaggio nella Scienza. Intelligenza Artificiale*, XVI (2020)
- [16] V.P. Balachandran et al., *Identification of Unique Neoantigen Qualities in Long-Term Survivors of Pancreatic Cancer*, Nature, 551 (2017) 7681.

École Normale Supérieure de Paris. Si interessa di inferenza statistica, processi stocastici e reti complesse con applicazioni in biologia.

- [17] A.D. Waldman, J.M. Fritz, M. Lenardo, *A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice*, Nat. Rev. Immunol., 20 (2020) 11.
- [18] P. Dash et al., *Quantifiable Predictive Features Define Epitope-Specific T Cell Receptor Repertoires*, Nature, 547 (2017) 7661.
- [19] J. Tubiana, S. Cocco, R. Monasson, *Learning Protein Constitutive Motifs from Sequence Data*, eLife, 8 (2019).
- [20] B. Bravi et al., *RBM-MHC: A Semi-Supervised Machine-Learning Method for Sample-Specific Prediction of Antigen Presentation by HLA-I Alleles*, Cell Syst., 12 (2021) 2.
- [21] V. Roudko, B.D. Greenbaum, N. Bhardwaj, *Computational Prediction and Validation of Tumor-Associated Neoantigens*, Front. Immunol., 11 (2020) 27.
- [22] D.K. Wells et al., *Key Parameters of Tumor Epitope Immunogenicity Revealed Through a Consortium Approach Improve Neoantigen Prediction*, Cell, 183 (2020) 3.
- [23] K. Davidsen et al., *Deep Generative Models for T Cell Receptor Protein Sequences*, eLife, 8 (2019).
- [24] G. Isacchini et al., *Deep generative selection models of T and B cell receptor repertoires with soNNia*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 118 (2021) 14.
- [25] S. Gielis et al., *Detection of Enriched T Cell Epitope Specificity in Full T Cell Receptor Sequence Repertoires*, Front. Immunol., 10 (2019).
- [26] J. Sidhom et al., *DeepTCR is a deep learning framework for revealing sequence concepts within T-cell repertoires*, Nat. Commun., 12 (2021) 1.
- [27] M. Andreatta, M. Nielsen, *Gapped sequence alignment using artificial neural networks: Application to the MHC class I system*, Bioinformatics, 32 (2015).
- [28] Z. Lipton, *The Mythos of Model Interpretability*, 2016 ICML Workshop on Human Interpretability in Machine Learning, New York (2016).
- [29] J. Tubiana, S. Cocco, R. Monasson, *Learning compositional representations of interacting systems with Restricted Boltzmann Machines: Comparative study of lattice proteins*, Neural Comput., 31 (2019) 8.
- [30] Y. Li et al., *Directed Evolution of Human T-Cell Receptors with Picomolar Affinities by Phage Display*. Nature Biotechnology, Nat. Biotechnol., 23 (2005) 3.
- [31] D.T. Harris et al., *Deep Mutational Scans as a Guide to Engineering High Affinity T Cell Receptor Interactions with Peptide-Bound Major Histocompatibility Complex*, J. Biol. Chem., 291 (2016) 47.



Barbara Bravi: fisica teorica di formazione, è attualmente Lecturer in Biomathematics presso il Dipartimento di Matematica di Imperial College London. Ha conseguito il dottorato presso King's College London nel 2016, ed in seguito ha effettuato periodi di ricerca post-dottorale a École Polytechnique Fédérale de Lausanne ed a

Evoluzione e probabilità

La Selezione Naturale è un meccanismo per generare un livello estremamente elevato di improbabilità.

R.A. Fisher

Luca Peliti Santa Marinella Research Institute, Santa Marinella (Rm), Italia

Gli esseri viventi presentano un livello di organizzazione così raffinato che rende apparentemente impossibile il credere che si sia potuto sviluppare con un processo di prova ed errore, come richiesto dalla teoria dell'evoluzione darwiniana. In questo articolo, nato in occasione del convegno "Probabilità, Rischio e Previsione: strumenti per la costruzione di una cultura dell'incertezza" promosso dal Gran Sasso Research Institute nel 2017, discuto come l'esistenza di tassi di riproduzione differenti permetta di produrre un livello estremamente alto di improbabilità, e come gli strumenti concettuali della teoria dell'evoluzione permettano di predire, in qualche modo, il corso dell'evoluzione, come viene fatto regolarmente, per esempio, nel processo di produzione del vaccino per l'influenza stagionale.

Probabilità a priori e probabilità retrospettive.

Nella figura 1 è rappresentata la concezione popolare del processo di evoluzione dell'uomo. Vediamo, partendo da un antenato decisamente scimmiesco, delle forme di vita che diventano progressivamente sempre più vicine a un ideale contemporaneo di uomo, ovviamente maschio,

bianco, di capelli chiari, probabilmente anglosassone. Anche quando viene considerata l'evolu-

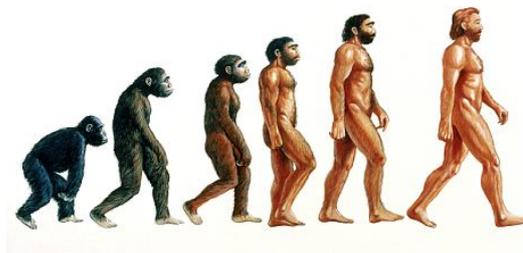


Figura 1: Una rappresentazione popolare delle tappe dell'evoluzione umana. Dal Daily Mail.

zione di altre forme di vita, la rappresentazione popolare non è molto diversa, come nel caso dell'evoluzione del cavallo (fig. 2). Il processo di evoluzione sembra poter essere descritto come la progressiva scoperta di un archetipo (*Homo sapiens* o *Equus caballus*) precedentemente esistente, almeno nel mondo delle idee.

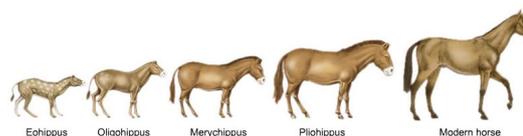


Figura 2: Una rappresentazione della linea evolutiva del cavallo. Da Pinterest.

Se questa rappresentazione è corretta, la teoria

dell'evoluzione si trova di fronte a un grosso problema: come è possibile per il meccanismo darwiniano di mutazione e selezione raggiungere questo archetipo ideale in un tempo ragionevole? Anche, più modestamente: come si può pensare che una struttura così complessa come l'occhio umano (a sinistra nella figura 3) si possa formare con un meccanismo di tentativi ed errori? Tuttavia si può vedere che la formazione dell'occhio nei vertebrati non è un fatto unico. Altre forme di vita hanno sviluppato, nel corso dell'evoluzione della vita sulla Terra, delle strutture comparabili. Una di queste forme è il comune polpo. E guardando i dettagli dell'anatomia dell'occhio del polpo (a destra nella figura 3), ci si rende conto che sebbene esso sia strutturalmente molto simile a quello dei vertebrati, è il risultato di un processo evolutivo del tutto indipendente. In particolare nei vertebrati la retina (1) è costituita da cellule che sono collegate tramite fibre nervose (2) al cervello mediante il nervo ottico (3): le fibre nervose sono poste *al di sopra* della retina, per cui la luce deve attraversarle prima di raggiungere le cellule fotosensibili. E notoriamente, il punto in cui il nervo ottico attraversa la retina per entrare nell'occhio corrisponde al punto cieco (4). L'occhio del polpo sembra essere stato disegnato più razionalmente: le fibre nervose (2) sono al di sotto della retina (1), e quindi non c'è punto cieco; e il collegamento con il resto del sistema nervoso ha luogo in un ganglio ottico (non rappresentato) disposto dietro al globo oculare. Possiamo cerca-

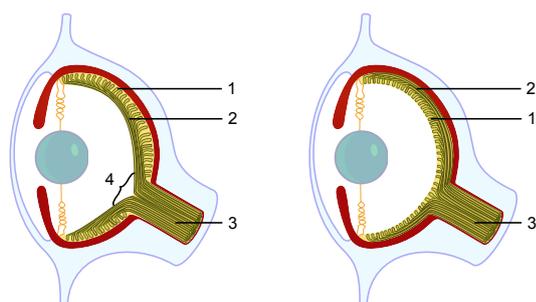


Figura 3: A sinistra: Schema della struttura dell'occhio dei vertebrati. A destra: Schema della struttura dell'occhio di certi molluschi, come il polpo. 1: Retina, 2: Fibre nervose, 3: Nervo ottico, 4: Punto cieco. Da Wikipedia.

re di rendere più precise queste considerazioni discutendo dell'evoluzione di una proteina tipica. Seguiamo in questo un argomento di Hoyle

e Wickramasinghe [1, cap. 2], che vogliono mostrare che la teoria usuale della mutazione e selezione non può produrre biomolecole complesse da un'associazione aleatoria di atomi. Parafrasando il loro argomento, cerchiamo di valutare qual è la probabilità che disponendo aminoacidi a caso in una sequenza lineare si possa ottenere un enzima funzionante. Le cellule hanno un repertorio di 20 aminoacidi, e le proteine sono costituite da catene lineari di aminoacidi (dette catene polipeptidiche). Un tipico enzima (una proteina che ha la funzione di accelerare, spesso di molti ordini di grandezza, lo svolgimento di reazioni chimiche) ha una lunghezza di un centinaio di aminoacidi. Se supponiamo che solo una particolare sequenza di aminoacidi produca un enzima funzionale, la probabilità di estrarre questa sequenza disponendo aminoacidi a caso sarà dell'ordine di una sul numero totale di sequenze di aminoacidi di lunghezza 100, pari a $20^{100} \approx 10^{30}$. Evidentemente questa valutazione è troppo pessimistica, perché suppone che basti un errore in un solo aminoacido per rendere inefficace l'enzima. Ma un calcolo più realistico non conduce a conclusioni sostanzialmente differenti [1, pag. 24]. Se le cose stanno così, è difficile sottrarsi alla conclusione di Hoyle e Wickramasinghe, che la vita sulla Terra ha avuto inizio con strutture, di origine extraterrestre (quale che sia), che avevano già risolto i problemi fondamentali della biochimica. E che quindi il passaggio dal non-vivente al vivente ha avuto inizio da qualche parte nell'immensa estensione dell'Universo o addirittura fuori di esso.

Possiamo riformulare questo argomento, esplicitandolo nel tempo, nella maniera seguente. Immaginiamo con Dawkins [2, Cap. 11] che per sviluppare un occhio efficiente siano necessari 1000 passi di evoluzione, e che ad ogni passo si presentino due scelte: quella giusta e quella sbagliata. Ammettendo di scegliere "alla cieca" (dopotutto, l'occhio non si è ancora formato!) la probabilità di fare la scelta giusta ad ogni passo è pari a $\frac{1}{2}$. Ma allora la probabilità di fare *ogni volta* la scelta giusta, per tutti i 1000 passi, viene ad essere $1/2^{1000} \approx 1/10^{300}$. È chiaro che a posteriori il fatto che la genealogia a cui apparteniamo abbia fatto ogni volta la scelta giusta viene a sembrare miracolosa!

Tuttavia né l'occhio né la proteina debbono

essere perfetti — nel senso di essere nella forma in cui si presentano oggi — per fornire un vantaggio agli organismi che li producono. È quindi irrealistico valutare la probabilità della loro produzione nella maniera che abbiamo appena descritto. L'occhio è il risultato di un lungo processo di ricerca e sviluppo effettuato da diverse forme di vita nel corso del tempo, partendo dalla formazione di piccole chiazze di cellule fotosensibili, che si sono poi venute a riorganizzare in strutture più complesse e più efficaci. E le strutture più efficaci si sono fissate in certe forme di vita perché apportavano un vantaggio a chi le produceva—un vantaggio che si materializzava in una discendenza più numerosa.

Nell'argomento presentato prima si suppone implicitamente che non si sappia se si è o no sulla buona strada finché non si sia arrivati alla mèta. Immaginiamo invece, seguendo l'argomento di Darwin, che ogni passo fatto nella buona direzione porti un piccolo vantaggio, in termini di sopravvivenza o di fecondità, all'individuo che lo compie. Più precisamente, supponiamo di inviare nel "Giardino dei sentieri che si biforcano" una squadra inizialmente di 100 individui, che a ogni passo fanno una scelta (a destra o a sinistra) e poi si riproducono. Supponiamo che quelli che fanno la scelta giusta al momento giusto si riproducano un po' meglio di quelli che la fanno sbagliata: per esempio, che per ogni figlio di un individuo che ha fatto la scelta sbagliata, si abbia in media 1.02 figli di quelli che hanno fatto la scelta giusta. Abbiamo così, dopo il primo passo, 50 individui dalla parte giusta e 50 dalla parte sbagliata, e dopo che si sono riprodotti, 102 dalla parte giusta, e 100 dalla parte sbagliata. Sicuramente una differenza molto piccola: la proporzione di individui sul sentiero giusto è adesso del 51% invece che del 50%. Tuttavia se aspettiamo qualche generazione la proporzione di individui tende ad aumentare: dopo 10 generazioni il numero di discendenti di un individuo che ha fatto il passo giusto sarà circa 1.22 volte quello di un individuo che l'ha sbagliato, e dopo 100 generazioni questo rapporto sarà pari a circa 7.25. Quindi dopo 100 generazioni circa il 88% della popolazione discenderà da chi ha fatto il passo giusto. Ammettiamo che a questo punto si presenti (a quelli che stanno sul sentiero giusto) un'altra biforcazione. La metà prenderà la via

giusta, e l'altra metà quella sbagliata. Avremo quindi il 44% di individui sulla via giusta, il 44% che avrà sbagliato l'ultimo passo, e il 12% di quelli che avevano sbagliato fin dall'inizio. Aspettando altre 100 generazioni, ciascun individuo che ha fatto la scelta giusta avrà in media 7.25 volte il numero di discendenti di uno di quelli che ha fatto la scelta sbagliata, e ciascuno di questi avrà in media 7.25 volte più discendenti di quelli che discendono da chi ha sbagliato il primo passo. Facendo i conti, avremo un po' meno dell'88% di quelli che hanno fatto due passi giusti, il 12% circa di quelli che hanno indovinato il primo passo e meno dell'1% per quelli che hanno sbagliato al primo passo (e non c'interessa che cosa abbiano fatto dopo). Andando avanti così, e ammettendo di poter aspettare 100 generazioni per ogni biforcazione del sentiero, in 10 000 generazioni (un tempo lungo, ma ragionevole sulle scale geologiche) la nostra popolazione sarà costituita per l'88% circa da individui i cui antenati hanno fatto tutte le 1000 scelte giuste, e per il 12% circa da quelli che si sono sbagliati solo all'ultimo passo, mentre i discendenti di tutti gli altri costituiscono una frazione assolutamente trascurabile della popolazione. Riguardando a posteriori il cammino fatto questo appare altamente improbabile, perché la sua probabilità a priori è estremamente piccola. Tuttavia il cammino effettivamente seguito ha profittato ad ogni passo delle indicazioni della selezione, per cui la sua probabilità a posteriori è molto elevata. Inoltre possiamo considerare che anche la nostra stima della probabilità a priori è troppo pessimistica, per due ragioni: uno, che non è detto che le scelte giuste debbano essere fatte tutte esclusivamente in un ordine fissato, e due che, come dimostra l'esistenza dell'occhio del polpo, a volte è possibile ottenere delle strutture funzionalmente equivalenti percorrendo dei sentieri molto diversi. In effetti nei molluschi si possono osservare occhi che presentano un gran numero di differenti strutture. Basandosi su queste osservazioni, una stima realistica [3] del numero di generazioni necessarie per lo sviluppo dell'occhio dà un valore dell'ordine di 360 000 generazioni, un numero elevato, ma che in fondo richiede sole poche centinaia di migliaia di anni, di fronte a una storia del vivente che si valuta in miliardi di anni.

Evoluzione lineare ed evoluzione ad albero.

In effetti la strada dell'evoluzione non è definita a priori, ma risulta dal processo d'evoluzione stesso. Come ha sottolineato Jacob [4],

"La Selezione Naturale non lavora come un ingegnere, ma come un hobbista; un hobbista che non sa ancora che cosa produrrà, ma recupera tutto quello che gli passa fra le mani."

Possiamo renderci conto delle tracce di questo processo di *fai-da-te* considerando quelle piccole imperfezioni rivelatrici in cui certe strutture del vivente sembrano essere inutilmente complicate rispetto a quello che un ingegnere avrebbe potuto progettare a tavolino. Un esempio di queste strutture nei mammiferi è il nervo laringeo ricorrente sinistro (cf. fig. 4), che compie una lunga deviazione sotto l'arco aortico per finire ad innervare delle strutture dietro la laringe a pochi centimetri dal suo punto di distacco dal nervo vago. Nelle giraffe la deviazione ammonta a circa 4.6 m! L'anatomia comparata ci permette di dare una spiegazione a questa stranezza. Come si può vedere nella figura 5, uno dei nervi che nel pesce andava alle branchie è diventato il nervo laringeo. Nel pesce questo nervo è in posizione più interna rispetto alla vicina vena (numero 6 nell'immagine). Quando il nervo si è allungato si è trovato a passare sotto quella vena, ma il punto di origine della diramazione non ha potuto spostarsi anch'esso in avanti perché incastrato sotto la vena (che nei mammiferi è diventata il dotto arterioso). Così il nervo ha dovuto continuare ad allungarsi. Nel processo d'evoluzione le forme di vita debbono operare le loro modifiche strada facendo, senza impedire all'organismo di funzionare. Questo è paradossale, come pretendere di cambiare le eliche ad un aereo mentre vola. Quest'esigenza implica che in questo processo aspetti meno importanti vengano tralasciati rispetto ad altri più essenziali: in altri termini, per esempio, che il costo dell'allungamento di qualche millimetro del nervo laringeo venga trascurato rispetto al vantaggio di avere (nella giraffa) un collo più lungo, che le permetta di raggiungere le foglie di alberi più alti.

Come sa bene qualunque hobbista, il piacere del *fai-da-te* non sta nel costruire cose seguendo le istruzioni, come quando si montano dei

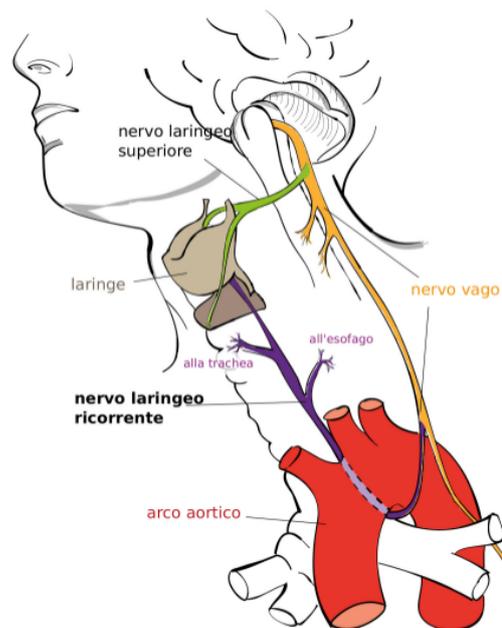


Figura 4: Il nervo laringeo ricorrente (o *laringeo inferiore*) è un ramo del nervo vago, che innerva quasi tutti i muscoli intrinseci della laringe. Deve il suo nome al percorso ad ansa compiuto durante la discesa a livello toracico, seguita dalla risalita verso l'alto, nel collo, fino alla laringe (per la quale, tuttavia, non contribuisce all'innervazione sensitiva). Da Wikipedia.

mobili IKEA®, ma nell'inventare nuovi usi per degli oggetti che si hanno a disposizione. Alcuni di questi oggetti risolvono, magari in modo originale, dei problemi presenti: per esempio si può pensare di utilizzare vecchi elenchi telefonici per costruire uno sgabello. In altri casi, una combinazione inaspettata di oggetti permette di costruire uno strumento che non esisteva prima: l'esempio più famoso è forse come Gutenberg dirottò la pressa a vite (utilizzata per spremere l'uva) all'uso di comprimere i fogli di carta contro i caratteri tipografici nella stampa. Agendo come un hobbista, l'evoluzione presenta dei fenomeni simili. Jacob [4, pag. 67] riassume così la teoria dello sviluppo dei polmoni nei vertebrati terrestri, ricostruita da Ernst Mayr [5]:

"Il suo sviluppo è cominciato presso certi pesci d'acqua dolce che vivevano in paludi stagnanti, quindi povere d'ossigeno. Questi pesci presero l'abitudine d'ingoiare dell'aria e d'assorbire l'ossigeno attraverso la parete del loro esofago. In queste condi-

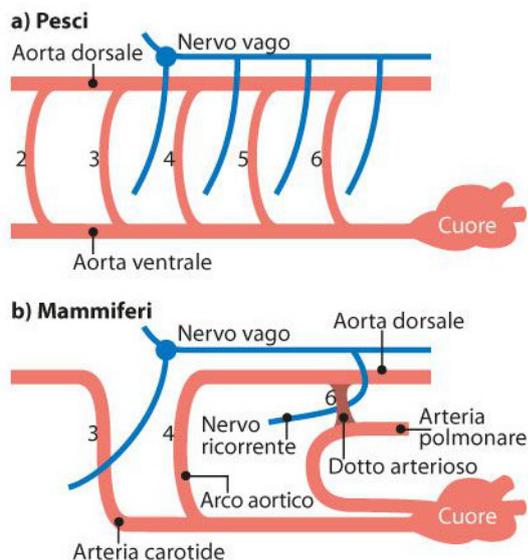


Figura 5: Schema dell'evoluzione del nervo vago, dai pesci ai mammiferi. L'antenato del nervo laringeo ricorrente passava accanto alla vena marcata con 6 nell'immagine. Questa vena è diventata il dotto arterioso nei mammiferi. Le diramazioni comprese fra quella compresa fra la vena 3 e la vena 4 e quest'ultima non sono più presenti nei mammiferi. Da <http://www.davideguglielmo.it/>.

zioni, ogni allargamento di questa parete si traduceva in un vantaggio selettivo. Si formarono così dei diverticoli dell'esofago che, sotto l'effetto d'una continua pressione di selezione, s'ingrandirono a poco a poco fino a trasformarsi in polmoni. [...] Fabbricare un polmone con un pezzo d'esofago assomiglia molto a fare una sottana con una tenda della nonna."

E per di più, mentre quando si taglia la tenda della nonna si ha almeno in testa l'esempio delle gonne già esistenti, il processo descritto sopra ha portato a fabbricare un oggetto che prima non esisteva: il polmone.

Ritornando all'esempio del giardino dei sentieri che si biforcano, siamo stati forse troppo pessimisti nel supporre che lo sbagliare sentiero a un bivio anche una sola volta porti necessariamente alla rovina. Può essere, dato che le possibilità combinatorie delle forme di vita sono così numerose, che il sentiero porti — sempre dopo un gran numero di biforcazioni — ad un'altra struttura praticabile, magari con un'altra funzione. E questo lo possiamo vedere già soltanto riflettendo

alla varietà delle forme di vita che sono presenti attualmente. Gould [6] ha fatto presente che

"Il modello della scala [nell'evoluzione] è molto peggio che sbagliato. Non potrà mai fornire un'illustrazione del procedere trionfale dell'evoluzione — perché può applicarsi solo a discendenze fallite."

Questo è il caso della famiglia degli equini, rappresentata adesso da non più di sei specie (di cui una sola di cavalli), e della famiglia *Hominidae* che comprende in tutto sette specie: due specie di oranghi, due di gorilla, due di scimpanzé (lo scimpanzé propriamente detto e il bonobo), e *Homo sapiens*. Ma molte altre famiglie non possono essere descritte da uno schema lineare. Già solo fra i mammiferi, la famiglia *Mustelidae* comprende almeno 57 specie (fra cui il tasso e la donnola), quella dei *Cricetidae* 600, quella dei *Muridae* (che comprende ratti e topi) più di 700. Per non parlare della prodigiosa varietà delle specie di insetti. Una storiella, forse apocrifia, racconta che il biologo evolucionista Haldane rispose una volta così a un teologo che gli domandava che cosa avesse concluso sul Creatore basandosi sullo studio della creazione:

"Il Creatore, se esiste, ha una passione sconosciuta per i coleotteri."

Haldane alludeva al fatto che ci sono 300 000 specie di coleotteri contro non più di 9000 specie di uccelli e poco più di 10 000 specie di mammiferi. Così mentre se può avere un senso guardare all'evoluzione del cavallo a partire dal punto d'arrivo (ma perché sembra naturale scegliere il cavallo, piuttosto che la zebra o l'umile somaro?) non avrebbe molto senso descrivere l'evoluzione dei coleotteri dal punto di vista di una particolare specie attuale, scelta a caso.

Nei casi normali, in cui una famiglia mostra di aver avuto successo nell'evoluzione, la rappresentazione dovrebbe sottolineare la progressiva diversificazione delle forme di vita. L'espressione usata da Darwin nella sua prima edizione dell'*Origine delle Specie* per descrivere la sua teoria era "discendenza con modificazioni".¹ Risalendo di antenato in antenato si riconosce che forme di vita simili hanno antenati comuni:

¹Ricordiamo che l'unica figura contenuta nell'*Origine delle Specie* è un diagramma nel cap. IV che mostra il divergere e il ramificarsi delle specie.

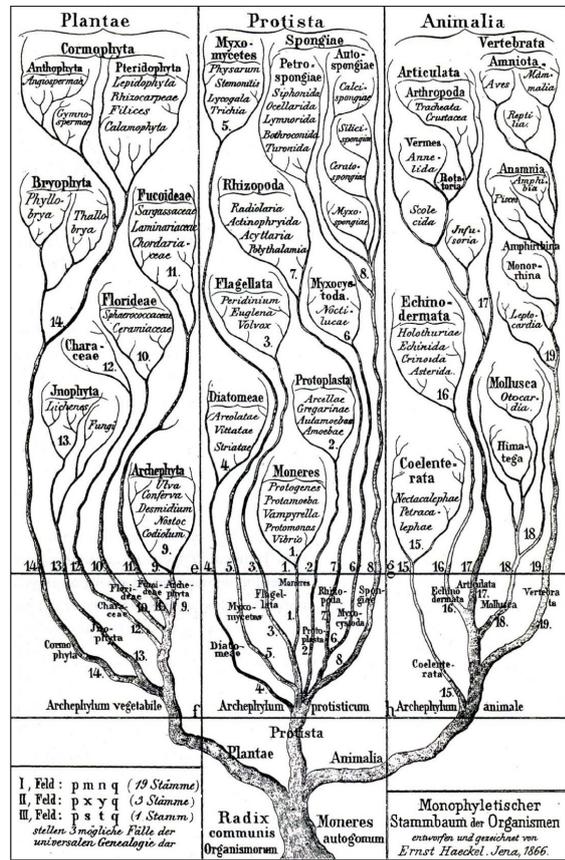
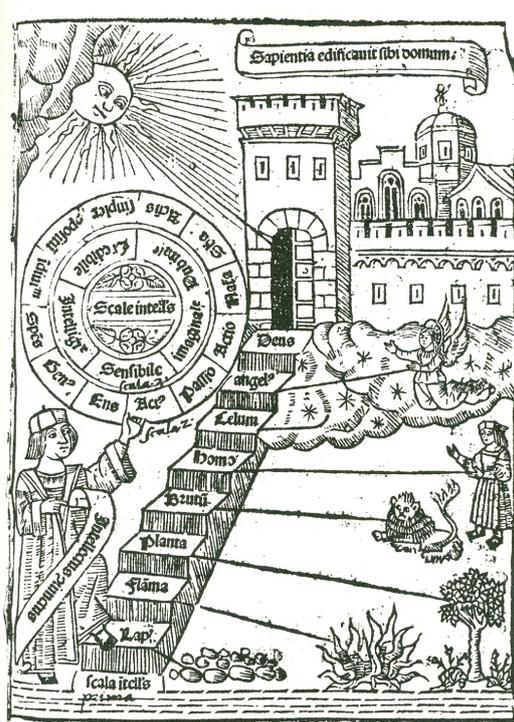


Figura 6: Evoluzione lineare ed evoluzione ad albero. Sinistra: Rappresentazione della Scala naturæ in R. Lull, *Liber de ascensu et descensu intellectus* (1305)(Valencia: Jorge Costilla, 1512). Destra: Albero genealogico monofiletico degli organismi, in E. Haeckel, *Generelle Morphologie der Organismen* (Berlin: Georg Reimer, 1866).

ma esse si sono diversificate prendendo sentieri diversi in qualche bivio. Quindi una rappresentazione più fedele del processo evolutivo è quello dell'albero. Mentre la rappresentazione lineare dell'evoluzione richiama irresistibilmente le rappresentazioni medievali della *Scala naturæ* (come quella mostrata in fig. 6, a sinistra), già pochi anni dopo la pubblicazione dell'*Origine* il biologo tedesco E. Haeckel audacemente rappresentava un unico albero genealogico per tutto il vivente (fig. 6, a destra), diviso in tre grandi branche, e con un tronco comune costituito dai *Monera*, che possiamo identificare come gli odierni *Bacteria* (un termine inesistente all'epoca).

Haeckel introdusse, accanto alle branche rappresentanti i due regni tradizionali del vivente, gli animali e le piante, già riconosciuti da Linneo nel *Systema Naturæ* e i soli menzionati da Darwin nell'*Origine*, una terza branca, denominata *Protista*, che comprendeva tutti gli organismi microscopici noti a quel tempo, a parte i *Monera*.

L'albero di Haeckel (almeno in questa edizio-

ne, perché pochi anni dopo sarebbe tornato a una rappresentazione molto più vicina alla *Scala naturæ*, con un unico tronco possente che culmina nell'uomo) somiglia abbastanza a quello momentaneamente accettato dai biologi evuzionisti, e che rappresentiamo, molto semplificato, nella figura 7. Riconosciamo sì tre branche fonda-

Albero della Vita Filogenetico

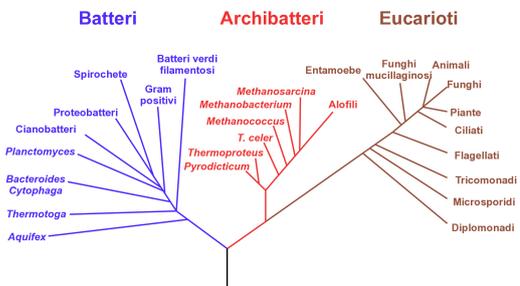


Figura 7: Schema dell'albero filogenetico del vivente. Da Wikipedia.

tali, ma se prestiamo attenzione gli animali e le

piante costituiscono, con i funghi (propriamente detti) solo dei ramoscelli terminali di una stessa branca.

Le branche adesso sono identificate come **Eucarioti**, cioè organismi composti di cellule che hanno un nucleo cellulare ben identificato, e che comprendono tutti gli organismi multicellulari; **Batteri** (propriamente detti), organismi unicellulari, che contengono anche gran parte dei batteri causa delle malattie infettive (in questa classificazione i virus non sono considerati viventi); e **Archibatteri**, una grande famiglia di organismi unicellulari che differiscono dalle altre forme di vita per aspetti fondamentali della membrana cellulare e del meccanismo di produzione delle proteine.

Molti archibatteri sono estremofili, cioè possono sopravvivere ad elevate temperature e pressioni, in cui i batteri ordinariamente non sopravvivono. Per questo si presume che essi fossero più idonei a svilupparsi nell'ambiente ostile della giovane Terra, e che quindi siano più antichi dei batteri propriamente detti, da cui l'epiteto di Archibatteri.

Questa branca, della cui esistenza si è cominciato a sospettare non più di cinquant'anni fa, sembra essere uno degli attori più importanti dell'evoluzione. Dal diagramma si vede che (almeno secondo l'attuale opinione prevalente) gli eucarioti si sono diversificati a partire dagli archibatteri piuttosto che dai batteri. In effetti si ipotizza che gli eucarioti siano venuti a formarsi da situazioni in cui degli archibatteri (molto diversi dai loro discendenti attuali) abbiano formato delle strutture simbiotiche con dei batteri che avevano fagocitato. Questo per sottolineare quante sorprese si sono trovate anche recentemente nello studio dell'organizzazione filogenetica fondamentale della vita.

Possiamo riassumere questa discussione sottolineando i due punti fondamentali: il primo, che un percorso evolutivo che appare a priori molto improbabile viene ad essere molto probabile retrospettivamente, guardandolo dal suo punto d'arrivo, dato che durante tutto il percorso si è esercitata una costante pressione selettiva che ha favorito le varianti vantaggiose rispetto a quelle svantaggiose. In altri termini, la probabilità retrospettiva di un determinato percorso evolutivo è una probabilità

condizionata dal fatto che la forma di vita considerata è attualmente vivente. Questa probabilità è quindi molto diversa dalla probabilità a priori. Il secondo punto è che non bisogna perdere di vista che gli organismi non hanno davanti a sé una strada obbligata per l'evoluzione, ma piuttosto un gran numero di vie praticabili, come dimostrato dalla varietà delle forme viventi.

La natura aleatoria della Selezione Naturale.

Per cercare di comprendere nei dettagli il processo evolutivo sono stati sviluppati, a partire dagli anni '30 del secolo scorso, un gran numero di strumenti probabilistici che vanno a costituire la disciplina nota come Genetica delle popolazioni. I nomi più noti associati a questa disciplina sono quelli di R. A. Fisher (britannico), S. Wright (americano) e M. Kimura (giapponese).

In questa disciplina si considera, per esempio, una popolazione costituita da un numero fissato di individui che evolve mediante il meccanismo darwiniano di riproduzione, selezione e mutazione. Il modello più semplice che descrive questa situazione è chiamato modello di Wright-Fisher, ed è schematicamente rappresentato nella figura 8. Le colonne rappresentano la costituzione della popolazione in generazioni successive, partendo da sinistra. I colori rappresentano le caratteristiche (fenotipo) degli individui che compongono la popolazione: caratteristiche diverse sono rappresentate da colori diversi. L'idoneità (*fitness*) del fenotipo viene misurata dal numero medio di figli capaci di riprodursi che un individuo con quel fenotipo può produrre nelle condizioni date. Si suppone che la riproduzione sia asessuale e che le caratteristiche dei figli siano uguali a quelle del rispettivo genitore, a meno di mutazioni (nel modello rappresentato in figura non appaiono mutazioni). La popolazione nella nuova generazione viene ottenuta scegliendo a caso un genitore nella generazione precedente per ogni nuovo individuo, con una probabilità proporzionale all'idoneità del suo fenotipo. Il rapporto di filiazione è rappresentato dalle linee in figura 8. A causa delle inevitabili fluttuazioni, certi individui (come quello arancio e quello magenta nella prima colonna) non avranno discendenti, mentre altri (come quello rosso o

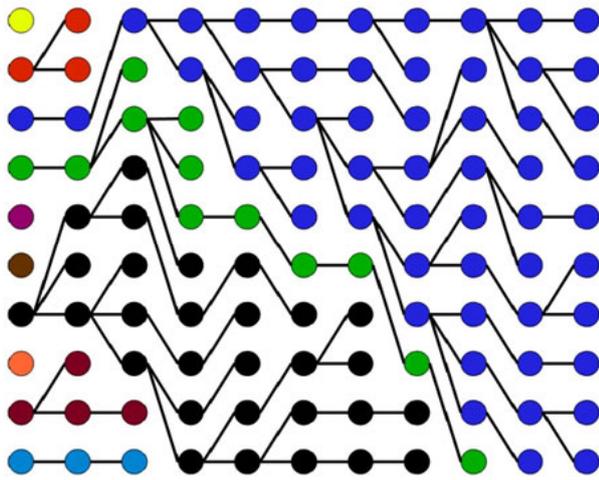


Figura 8: Schema del modello di Wright-Fisher dell'evoluzione di una popolazione con riproduzione non sessuale. Le colonne corrispondono a generazioni successive di una popolazione di 10 individui. Fenotipi differenti sono indicati da colori differenti. Gli individui di una generazione sono collegati ai loro genitori nella generazione precedente da tratti neri. Si suppone che gli individui abbiano lo stesso fenotipo dei loro genitori.

quello nero) ne avranno più d'uno. Applicando diverse volte il processo, osserviamo che certi fenotipi tendono a invadere la popolazione: in figura, questo avviene prima con il fenotipo nero, e finalmente con il fenotipo blu, che occupa tutta la popolazione a partire dalla decima generazione. Uno dei contributi fondamentali di Kimura alla teoria è stato sottolineare che questo fenomeno (chiamato la fissazione di un tratto) può avvenire in popolazioni costituite da un numero piccolo d'individui anche se i fenotipi sono equivalenti dal punto di vista della selezione. Anzi c'è una probabilità piccola ma non nulla che si fissi un fenotipo non ottimale. Inoltre, dato che molte popolazioni in natura sono costituite da pochi individui, Kimura ha suggerito che gran parte della diversità del vivente sia dovuta alla fissazione aleatoria di varianti diverse in diverse popolazioni. Nella figura 9 è rappresentata l'evoluzione della frequenza del fenotipo ottimale in una popolazione di 500 individui. Il fenotipo ottimale ha un vantaggio dell'1% rispetto agli altri, nel senso che un individuo che lo porta ha, in media, 1% più figli di uno che non lo porta. La frazione iniziale di individui con fenotipo ottima-

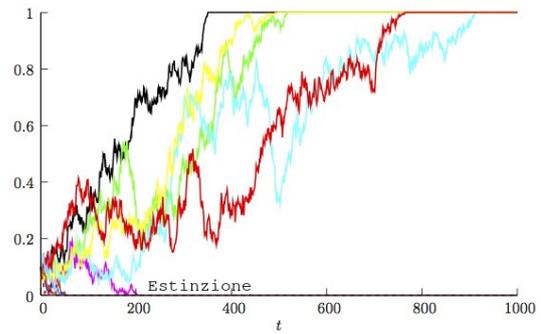


Figura 9: Evoluzione della frequenza del fenotipo ottimale in un modello di Wright-Fisher. Popolazione di 500 individui. Il processo è stato ripetuto 10 volte, partendo dalla stessa condizione iniziale. Il fenotipo ottimale ha un'adattabilità superiore dell'1% rispetto agli altri fenotipi. La frequenza iniziale del fenotipo ottimale è del 10%. Il fenotipo ottimale va a fissazione in 5 casi su 10 e si estingue negli altri 5 casi.

le è del 10%. In questa situazione osserviamo che il fenotipo ottimale va a fissazione entro 1000 generazioni in 5 casi su 10, mentre si estingue negli altri 5 casi. Quindi in questo caso la Selezione Naturale ha un effetto positivo solo nel 50% dei casi, a causa della piccola taglia della popolazione.

In effetti uno dei più importanti risultati di Kimura [7] è che se in una popolazione appare un singolo mutante che presenta un vantaggio, per esempio, di 1% nei confronti degli altri, la probabilità che questo mutante vada a fissazione è pari al suo vantaggio relativo, cioè nel nostro caso è solo dell'1%. (Anzi, tenendo conto che in una popolazione a riproduzione sessuata ogni individuo ha due copie del genoma, mentre la mutazione apparirà in una sola di esse, questa probabilità sarà pari alla metà dell'1%.)

Sono prevedibili i processi evolutivi?

Ma quindi se anche la Selezione Naturale può a volte fare cilecca, che speranza abbiamo di prevedere il corso dei processi evolutivi? O forse la teoria dell'evoluzione, sola fra le teorie scientifiche, non deve pretendere di formulare previsioni, ma solo di spiegare a posteriori le proprietà del vivente?

Delle previsioni fatte a partire dalla teoria dell'evoluzione sono state fatte e verificate molte volte. In un caso molto interessante, prima Darwin e poi (indipendentemente) l'altro scopritore

della Selezione Naturale, Alfred J. Wallace, avevano formulato una predizione precisa. Questa predizione è stata verificata con completa soddisfazione solo dopo un gran numero di ricerche compiute in molti anni, per venirsi a concludere pochi anni fa, nel 1992, con la scoperta della cosiddetta pistola fumante.

Vale la pena di raccontare questa storia [8]. Come ben sappiamo, l'impollinamento compie un ruolo essenziale nel ciclo di vita delle piante a fiori, e molto spesso esse ricorrono a produrre nettare per invogliare gli insetti a visitare i loro fiori. È evidentemente conveniente per la pianta sviluppare dei meccanismi che permettano più facilmente la visita a una particolare specie d'insetti che a un'altra, perché in questo modo aumenta la probabilità che il loro prezioso polline venga apportato a fiori della stessa specie. A questo scopo, sotto la spinta dell'evoluzione, molte specie di fiori hanno sviluppato meccanismi raffinati per selezionare le specie di insetti ammesse a raccogliere il loro nettare. Darwin stesso dedicò uno dei suoi trattati a descrivere

“I vari espedienti mediante i quali le orchidee vengono impollinate dagli insetti”.

Sapendo di questa passione per le orchidee, nel 1862 un coltivatore d'orchidee inviò a Darwin una serie d'orchidee del Madagascar, che includeva il bel fiore a forma di stella di *Angraecum sesquipedale*. Il nome allude al fatto che il nettare si trova in fondo a un tubo lungo quasi un piede (circa 30 cm). In una lettera a un amico, Darwin scrisse

“Santo Cielo, quale insetto può succhiarlo”

e in un'altra lettera pochi giorni dopo suggerì che

“in Madagascar ci debbono essere falene con proboscidi capaci di estendersi fino a 10 o 11 pollici (25.4–27.9 cm)”.

Darwin pubblicò questa predizione nel suo libro sulle orchidee, uscito quello stesso anno. Nel 1907, più di 20 anni dopo la morte di Darwin, venne identificata in Madagascar una sottospecie della falena *Xantopan morgani* già notata nella regione del Congo per la sua lunga proboscide.

Questa falena ha un'ampiezza alare di 16 cm, ma la proboscide è veramente colossale, lunga più di 20 cm, e forma un grosso avvolgimento davanti alla testa quando non è in uso. Data la predizione di Darwin, questa sottospecie venne chiamata *Xantopan morgani praedicta*. Tuttavia si



Figura 10: Colta in flagrante! *Xantopan morgani praedicta* succhia il nettare di *Angraecum sesquipedale*. Da [8].

è dovuto aspettare fino al 1992, ben 130 anni dopo la predizione di Darwin, perché si potessero osservare falene di questa sottospecie succhiare il nettare dal fiore di *Angraecum* a trasferirne il polline di pianta in pianta (cf. fig. 10). *Angraecum sesquipedale* è adesso noto come l'orchidea di Darwin fra gli appassionati.

Negli anni recenti si è dedicato uno sforzo sempre crescente per passare dalla ricostruzione ed analisi del passato dei processi evolutivi alla predizione del loro comportamento futuro. Questo sforzo non ha un interesse soltanto accademico. È soltanto tramite delle previsioni che è possibile formulare un vaccino antinfluenzale efficace. In effetti il comportamento del virus dell'influenza presenta due aspetti apparentemente contraddittori: se da una parte il suo tasso di mutazione è così elevato che il ceppo virale dominante cambia in modo sostanziale ogni pochi anni, dall'altra in ogni stagione epidemica quasi tutte le infezioni sono dovute a un insieme di ceppi molto simili fra loro. La seconda proprietà fa sì che sia possibile produrre un vaccino efficace, purché si sia individuato correttamente quale sarà il ceppo dominante, con un anticipo sufficiente a produrre abbastanza dosi del vaccino. L'identificazione

del ceppo prevalente nella prossima stagione è l'obiettivo di un gruppo d'azione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) che utilizza dati sulla prevalenza dei diversi ceppi virali e sulla maggiore o minore efficacia dell'immunità distribuita nella popolazione (a causa delle epidemie precedenti) nei confronti dei diversi ceppi [9]. Ogni sei mesi, il WHO pubblica le sue raccomandazioni per la composizione del vaccino antinfluenzale, con un anticipo di circa sei mesi rispetto all'inizio della stagione epidemica in ciascun emisfero. Per esempio, la pubblicazione delle raccomandazioni per la stagione epidemica 2018 nell'emisfero Sud è avvenuta il 28 Settembre 2017.

Come è possibile formulare delle previsioni per un processo evolutivo, che viene determinato da così tanti fattori aleatori? Finché erano disponibili soltanto scarsi dati, riguardanti soprattutto la macro-evoluzione (l'evoluzione delle specie) si era giustificati nel mantenere un atteggiamento scettico sulla ripetibilità e quindi sulla prevedibilità dei processi evolutivi. Ma le cose stanno cambiando, con la possibilità di avere dati di sequenziamento o di analisi fenotipica ad alto flusso, di compiere esperimenti di evoluzione in parallelo su molti campioni, e con lo sviluppo di metodi più efficaci per analizzare modelli di sistemi dinamici complessi.

Questo apre la porta alla possibilità di formulare e convalidare delle predizioni per il comportamento dei processi di evoluzione su una scala di tempo abbordabile: ma questo potrebbe aiutarci a risolvere dei problemi concreti di grande importanza, come il problema della selezione del vaccino dell'influenza, ma anche per la lotta allo sviluppo della resistenza agli antibiotici (specialmente in ambiente ospedaliero), o nella previsione dello sviluppo dei tumori in un paziente specifico: perché l'evoluzione di un tumore riproduce in piccolo, su una scala di tempo breve, un processo di selezione darwiniana.

Come spesso succede, i progressi si realizzano quando ci si pongono obiettivi meno ambiziosi. Nel nostro caso, mentre probabilmente sarà sempre impossibile fare previsioni per l'evoluzione dei genotipi delle forme di vita, potrebbe essere possibile prevedere—entro certi limiti—l'evoluzione dei fenotipi. Il genotipo di un organismo è la totalità delle sue caratteristiche che

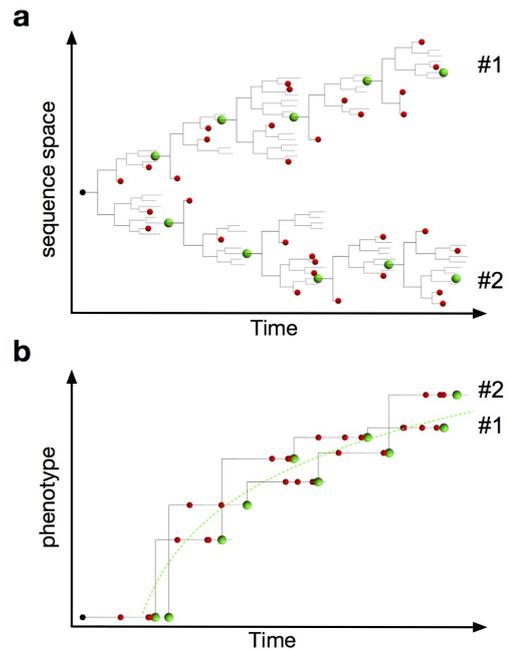


Figura 11: Rappresentazione schematica di un processo di selezione-mutazione nello spazio genotipico e nello spazio fenotipico. Confronto dei processi evolutivi in due popolazioni in parallelo in due descrizioni diverse. Alto: L'evoluzione nello spazio delle sequenze (genotipi) è un processo stocastico con molti cammini equiprobabili. Le mutazioni producono continuamente nuove varianti, mostrate come nodi in un albero. Queste varianti sono controllate solo debolmente dalla selezione: in figura, i punti verdi rappresentano le varianti selezionate positivamente (con idoneità maggiore), e i punti rossi quelle selezionate negativamente. Quindi le due popolazioni seguono cammini divergenti. Basso: L'idoneità ed altri tratti fenotipici dello stesso processo evolvono in modo molto regolare. I cammini mostrati contengono le stesse mutazioni (punti verdi e rossi) che a sinistra, ma ora a sequenze differenti corrispondono effetti fenotipici simili. Effetti di selezione positiva e negativa contribuiscono a condurre l'evoluzione verso un singolo cammino fenotipico, rappresentato dalla linea verde. Le popolazioni evolvono in parallelo vicino a questo cammino. Da [10].

possono essere ereditate: in pratica, esso è in buona parte riassunto dal suo genoma, cioè dalla sequenza del suo DNA. Come sappiamo, il DNA è descritto da una sequenza molto lunga scritta in un alfabeto di quattro lettere: A, T, C e G. Negli organismi più semplici questa sequenza è lunga già qualche milione di lettere, e il numero di varian-

ti possibili è sterminato. Considerando anche solo le varianti che differiscono di qualche lettera da una sequenza data, otterremo un numero dell'ordine della lunghezza del genoma. Ma molte di queste varianti sono irrilevanti, perché non modificano il fenotipo dell'organismo, cioè il complesso delle sue caratteristiche osservabili: e sono queste caratteristiche che cadono sotto il vaglio della Selezione Naturale. Questo punto è rappresentato schematicamente nella figura 11, che è tratta da un recente articolo che discute della predicibilità dell'evoluzione. Che questo non sia solo un costrutto teorico è stato verificato in un esperimento condotto sul comune lievito di birra *Saccaromyces cerevisiae* da un gruppo di Harvard. [11] In questo esperimento 640 ceppi

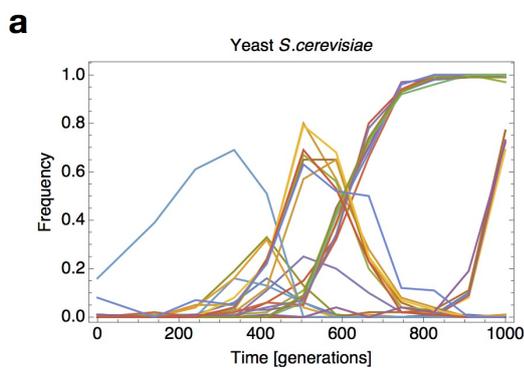


Figura 12: Frequenza di diverse varianti in popolazioni di *Saccaromyces cerevisiae* che evolvono in parallelo. Sebbene le varianti siano geneticamente diverse, si possono riconoscere delle somiglianze nella loro dinamica. Tipicamente alcune varianti dapprima crescono in frequenza, per poi venir soppiantate da varianti sopravvenute. Questo mostra che l'evoluzione in parallelo mostra un certo grado di riproducibilità. Da [10], su dati di [11].

di lievito sono stati fatti evolvere in parallelo per 1000 generazioni sotto condizioni identiche. Di tanto in tanto veniva misurata la loro idoneità, confrontando il loro tasso di crescita con quello del ceppo ancestrale nelle stesse condizioni. Così i ricercatori hanno potuto confrontare quanto variava l'idoneità fra i diversi ceppi, e se le capacità iniziale di un ceppo modificavano il risultato finale. Dato che la dinamica dell'evoluzione agisce sulle proprietà osservabili degli organismi, cioè sul fenotipo, è ragionevole che la dinamica evolutiva sia meglio prevedibile a livello del fenotipo che del genotipo. Sviluppando questo concetto,

è stato possibile introdurre un modello di predizione [12] dell'evoluzione del virus A/H3N2 dell'influenza che dovrebbe permettere di migliorare il metodo del WHO, raggiungendo un orizzonte di predicibilità dell'ordine di un anno.

Sappiamo che Dobzhansky, uno dei fondatori della sintesi evuzionistica, scrisse un famoso saggio dal titolo *In biologia nulla ha senso se non alla luce dell'evoluzione*. [13] A questo possiamo aggiungere che non si può comprendere l'evoluzione se non la si pensa probabilisticamente. E che gli strumenti della teoria della probabilità possono fornirci già da adesso dei metodi per fare predizioni su processi evolutivi che ci riguardano da vicino e, speriamo, in un prossimo futuro, per imparare a controllarli.



- [1] F. Hoyle, N. C. Wickramasinghe, *Evolution from Space: A Theory of Cosmic Creationism* (New York: Simon and Schuster, 1981). Traduzione italiana: F. Hoyle, N. C. Wickramasinghe, *Evoluzione dallo spazio* (Milano: Etas Libri, 1984)
- [2] R. Dawkins, *The Blind Watchmaker* (London: Penguin Books, 1986). Traduzione italiana: R. Dawkins, *L'orologio cieco*, traduzione di Libero Sosio (Milano: Rizzoli, 1988)
- [3] D.-E. Nilsson, S. Pelger: *A pessimistic estimate of the time required for an eye to evolve*, Proc. R. Soc. Lond. B, 256 (1984) 53.
- [4] F. Jacob, *Le jeu des possibles: Essai sur la diversité du vivant* (Paris, Fayard, 1981). Traduzione italiana: F. Jacob, *Evoluzione e bricolage, Gli "espedienti" della selezione naturale* (Torino: Einaudi, 1978)
- [5] E. Mayr, *From molecules to organic diversity*, Federation Proceedings, 23 (1964) 123, ristampato in: E. Mayr *Evolution and the Diversity of Life* (Cambridge (Mass.): Belknap, 1976) citato da [4]. Per una descrizione tecnica, vedi G. C. Packard, *The evolution of air-breathing in Paleozoic gnathostome fishes*, Evolution, 28 (1974) 320. Questo modello è stato più recentemente criticato. Vedi per esempio: C. Farmer, *Did lungs and the intracardiac shunt evolve to oxygenate the heart in vertebrates?* Paleobiology, 23 (1997) 358.
- [6] S. J. Gould, *Life's little joke*, in: S. J. Gould, *Bully for Brontosaurus: Reflections in Natural History* (New York: Norton, 1991). Traduzione italiana: S. J. Gould, *Bravo brontosauo*, traduzione di Libero Sosio (Milano: Feltrinelli, 1992)
- [7] M. Kimura: *On the probability of fixation of mutant genes in a population*, Genetics, 47 (1962) 713.
- [8] J. Arditti, J. Elliott, I. J. Kitching, L.T. Wasserthal: *'Good Heavens what insect can suck it' – Charles Darwin*

Angraecum sesquipedale and *Xantopan morganii praedicta*,
Botanical Journal of the Linnean Society, 169 (2012)
403.

- [9] Si può trovare la descrizione del protocollo di previsione utilizzato dal WHO alla URL http://apps.who.int/gb/pip/pdf_files/Fluvaccvirusselection.pdf?ua=1
- [10] M. Lässig, V. Mustonen, A. M. Walczak: *Predicting evolution*, Nature Ecology & Evolution, 1 (2017) 0077.
- [11] S. Kryazhinsky, D. P. Rice, E. R. Jerison, M. M. Desai: *Global Epistasis Makes Adaptation Predictable Despite Sequence-Level Stochasticity*, Science, 344 (2014) 1519.
- [12] M. Łuksza, M. Lässig: *A predictive fitness model for influenza*, Nature, 507 (2014) 57.
- [13] Th. Dobzhansky: *Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution*, American Biology Teacher, 35 (1973) 125.



Luca Peliti: è stato Professore Ordinario di Meccanica Statistica presso l'Università "Federico II" di Napoli. Si è occupato di meccanica statistica, applicata in particolare a sistemi di interesse biologico, e dell'approccio statistico alla teoria dell'evoluzione. È autore, in particolare, di *Appunti di Meccanica Statistica* (Bollati Boringhieri, 2003) e di *Stochastic Thermodynamics: An Introduction*, in collaborazione con Simone Pigolotti, di prossima pubblicazione presso Princeton University Press. Al momento è vice direttore del Santa Marinella Research Institute.

La frontiera tra le scienze della vita e la fisica teorica.

Certainly no subject or field is making more progress on so many fronts at the present moment, than biology, and if we were to name the most powerful assumption [...] to understand life, it is that all things are made of atoms, and that everything that living things do can be understood in terms of [...] atoms.

— Richard P. Feynman, *Lectures on Physics* (1964)

Mario Nicodemi

Dipartimento di Fisica "E. Pancini" - Università di Napoli "Federico II" e INFN sez. di Napoli

La ricerca al confine tra le scienze della vita e le scienze fisiche è oggi un settore strategico in grande sviluppo, dove la ricchezza dei dati prodotti dalle nuove tecnologie quantitative della biologia molecolare incontra in modo naturale i sofisticati strumenti d'analisi della fisica teorica.

“Certamente nessun campo di ricerca sta facendo attualmente più progressi su così tanti fronti della biologia, e se dovessimo formulare l'ipotesi più potente [...] per comprendere la vita, è che tutto è fatto di atomi, e che tutto ciò che fanno gli esseri viventi può essere compreso in termini di [...] atomi" [1]

Introduzione

Negli ultimi decenni la biologia molecolare ha fatto progressi scientifici impressionanti, con scoperte rivoluzionarie che si susseguono con sorprendente velocità, come forse è successo in fisica all'inizio del secolo scorso con lo sviluppo della meccanica quantistica, della meccanica relativistica e della meccanica statistica.

Richard Feynman nelle sue *Lectures on Physics* a metà anni '60 scriveva infatti che:

Questa frase racchiude il progetto ambizioso di spiegare i fenomeni biologici a partire dai principi fondamentali della fisica, come fatto per altri sistemi a molti corpi, dalla materia condensata alla *soft-matter*, perché alla fine i sistemi biologici sono fatti di atomi e quindi obbediscono alle leggi della fisica. È poco noto che Feynman, che avrebbe vinto il premio Nobel per la Fisica nel 1965 per lo studio dell'elettrodinamica quantistica, seguendo i suoi interessi poliedrici si sia dedicato tra la fine degli anni '50 e l'inizio dei '60 a lavorare a problemi di genetica con Robert S. Edgar

nel laboratorio di Max Delbruck al Caltech.

Il progetto ideale riassunto dalla frase citata di Feynman ha cominciato a materializzarsi grazie agli enormi passi avanti fatti negli ultimi anni dalle nuove tecnologie della biologia molecolare che hanno cominciato a produrre dati quantitativi altamente riproducibili, che si prestano naturalmente ad analisi condotte con gli strumenti della fisica teorica. Anzi, la ricchezza e la complessità dei dati biologici attualmente disponibili necessita l'uso dei metodi sofisticati di analisi delle scienze dure per essere interpretata e compresa. Per questa ragione la ricerca alla frontiera tra la biologia molecolare e la fisica teorica è oggi un campo scientifico d'importanza strategica in grande sviluppo.

Un terreno d'incontro tra fisica teorica e biologia molecolare

Il Progetto Genoma Umano, per esempio, ci ha permesso di conoscere la sequenza del nostro genoma e, in particolare, d'identificare i nostri geni. La domanda fondamentale su come funziona il sistema rimane, però, aperta. Perché un gene è attivo in certi tessuti e non in altri? Perché in una cellula normale un oncogene può rimanere silente per anni e attivarsi improvvisamente portando al cancro? L'arrivo di dati sperimentali quantitativi apre la strada nell'era post-genomica all'uso dei metodi della fisica per cercare di rispondere a queste domande, perché in fondo il genoma umano è solo uno dei sistemi complessi della fisica. Nella risposta a queste domande si trova la chiave per comprendere il funzionamento stesso della vita e, nel contempo, per sviluppare nuovi approcci di medicina personalizzata per la cura di malattie come il cancro o i disordini congeniti.

Negli ultimi anni è stato scoperto, per esempio, che il genoma umano ha una complessa organizzazione spaziale all'interno del nucleo cellulare, che serve scopi funzionali vitali [2, 3, 4, 5, 6]. Per regolare la propria attività, infatti, i geni devono stabilire contatti fisici con regioni di regolazione remote sul DNA, a milioni di basi di distanza, che ne controllano la trascrizione. Ne risulta una complessa architettura in cui i nostri ventimila geni vengono messi in contatto con i corrispettivi regolatori. Questa struttura tridimensionale defi-

nisce l'attività e, dunque, il destino della cellula, stabilendo quali geni devono essere trascritti e quali rimanere silenti. L'alterazione dell'organizzazione spaziale del genoma può modificare l'espressione dei geni e portare all'insorgere di malattie [7].

Lo studio dell'architettura spaziale dei cromosomi è un terreno perfetto dove la fisica teorica incontra la biologia poiché, dopo tutto, i cromosomi sono polimeri e la meccanica statistica interviene naturalmente nella descrizione e comprensione del loro comportamento [8]. Il mio gruppo di ricerca, per esempio, ha lavorato per sviluppare nuovi metodi per misurare sperimentalmente la struttura dei cromosomi con alta precisione [9, 10] e per capire, attraverso approcci di meccanica statistica, i meccanismi fisici che ne determinano la conformazione tridimensionale portando in contatto geni e regolatori nel nucleo cellulare in un formidabile processo di auto-organizzazione del sistema [11, 12, 13, 14].

I meccanismi di regolazione del nostro genoma

Le scoperte che ho descritto hanno cambiato in maniera radicale il modo in cui guardiamo al nostro DNA. Hanno mostrato, infatti, che per capire come funziona il genoma non dobbiamo solo decifrare la sequenza lineare di lettere di cui è costituito, ma dobbiamo comprenderne anche la complessa struttura tridimensionale, cioè come il DNA si ripiega su se stesso nello spazio del nucleo.

L'importanza dei geni è ben nota: essi codificano la produzione delle proteine che servono alle cellule per funzionare. È meno noto, però, che i geni rappresentano in lunghezza solo il 2% del genoma umano. Il ruolo del restante 98% è rimasto completamente misterioso fino a non molti anni fa, al punto da essere ribattezzato "DNA spazzatura" seguendo l'idea che fosse un'inutile relitto lasciato da milioni di anni di evoluzione. Oggi sappiamo che, tutt'altro che spazzatura, esso contiene le sequenze di regolazione dei geni e quindi la chiave del loro funzionamento [15]. Abbiamo anche scoperto che il nostro DNA è ripiegato nel nucleo cellulare in una struttura gerarchica fatta di domini-dentro-domini [16],

come nelle scatole cinesi. E in questi domini avvengono le complicate interazioni tra i geni e i loro molteplici regolatori (si stima che ogni gene abbia in media quattro sequenze di regolazione lungo il DNA) che spesso implicano la colocalizzazione simultanea di diverse regioni cromosomali [9].

E si comincia a capire che i meccanismi fisici che determinano la struttura tridimensionale del genoma, cioè come e perchè si formano i contatti di regolazione, si basano su transizioni di fase che coinvolgono il polimero del DNA e una serie di fattori molecolari con cui interagisce. Meccanismi di transizione *coil-globule* servono, per esempio, a stabilire contatti tra regioni remote [11, 13], mentre meccanismi di separazione di fase sono usati per isolare regioni distinte che non devono interagire [12, 14]. In questo modo iniziamo a comprendere la ragione e il modo in cui anche mutazioni genetiche che non compromettono l'integrità dei geni possono portare all'insorgere di malattie: esse possono alterare la struttura tridimensionale del DNA modificando la rete dei contatti di regolazione tra geni e regolatori [13, 17].

Una frontiera strategica della ricerca scientifica

Le scoperte al confine tra la biologia molecolare e la fisica stanno svelando il funzionamento stesso della vita, ma i progressi scientifici e tecnologici ottenuti negli ultimi anni possono avere applicazioni rivoluzionarie ben oltre la scienza di base. Uniti all'impiego clinico dei nuovi potenti metodi di sequenziamento del DNA, possono essere usati, per esempio, per prevedere le implicazioni mediche di mutazioni in singoli pazienti, o anche in singole cellule. Cominciamo a capire l'origine di malattie genetiche come, per esempio, disturbi congeniti [13, 17] o il cancro [18] e le nuove scoperte stanno aprendo la strada allo sviluppo di nuove metodi di trattamento. Questi progressi si inseriscono nel quadro più ampio dell'attuale rivoluzione scientifica in corso alla frontiera tra le scienze della vita e le scienze fisiche, matematiche e computazionali, e porteranno a scoperte fondamentali nella comprensione della natura

e nelle applicazioni biomediche per le prossime generazioni.



- [1] R. P. Feynman, R. B. Leighton, M. Sands: *The Feynman Lectures on Physics*, Addison-Wesley, Boston (1964, revised edition 2005).
- [2] J. Dekker, L. Mirny: *The 3D Genome as Moderator of Chromosomal Communication*, *Cell*, 164 (2016) 1110.
- [3] J. R. Dixon, D. U. Gorkin, B. Ren: *Chromatin Domains: The Unit of Chromosome Organization*, *Mol. Cell.*, 62 (2016) 668-680.
- [4] E. H. Finn, T. Misteli: *Molecular basis and biological function of variability in spatial genome organization*, *Science*, 365 (2019) 9498.
- [5] Y. M. Sigal, R. Zhou, X. Zhuang: *Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy*, *Science*, 361 (2018) 880.
- [6] R. Kempfer, A. Pombo: *Methods for mapping 3D chromosome architecture*, *Nature Reviews Genetics*, 21 (2019) 207-226.
- [7] M. Spielmann, D. G. Lupianez, S. Mundlos: *Structural variation in the 3D genome*, *Nature Reviews Genetics*, 19 (2018) 453.
- [8] P. G. de Gennes: *Scaling Concepts in Polymer Physics*, Cornell University Press, Ithaca, NY, USA (1979).
- [9] R. Beagrie *et al.*: *Complex multi-enhancer contacts captured by Genome Architecture Mapping (GAM), a novel ligation-free approach*, *Nature*, 543 (2017) 519.
- [10] L. Fiorillo *et al.*: *Comparison of the Hi-C, GAM and SPRITE methods using polymer models of chromatin*, *Nature Methods*, 18 (2021) 482.
- [11] M. Barbieri *et al.*: *Complexity of chromatin folding is captured by the strings and binders switch model*, *PNAS*, 109 (2012) 16173.
- [12] M. Barbieri *et al.*: *Active and poised promoter states drive folding of the extended HoxB locus in mouse embryonic stem cells*, *Nature Struct. Mol. Bio.*, 24 (2017) 515.
- [13] S. Bianco *et al.*: *Polymer Physics Predicts the Effects of Structural Variants on Chromatin Architecture*, *Nature Genetics*, 50 (2018) 662.
- [14] M. Conte *et al.*: *Polymer physics indicates chromatin folding variability across single-cells results from state degeneracy in phase-separation*, *Nature Com.*, 11 (2020) 3289.
- [15] R. Andersson *et al.*: *An atlas of active enhancers across human cell types and tissues*, *Nature*, 507 (2014) 455.
- [16] J. Fraser *et al.*: *Hierarchical folding of chromosomes is linked to transcriptional changes in cellular differentiation*, *Molecular Systems Biology*, 11 (2015) 852.
- [17] B. K. Kragestein *et al.*: *Dynamic 3D chromatin architecture contributes to enhancer specificity and limb morphogenesis*, *Nature Genetics*, 50 (2018) 1463.

[18] G. I. Dellino *et al.*: *Release of stalled RNA-Polymerase II at specific loci and chromatin domains favors spontaneous DNA double strand breaks formation and predicts cancer translocations*, *Nature Genetics*, 51 (2019) 1011.



Mario Nicodemi: è Professore Ordinario di Fisica Teorica presso il Dipartimento di Fisica dell'Università di Napoli Federico II, e *Einstein BIH Visiting Professor* presso il Max Delbrück Center di Berlino. Coordina il Gruppo IV della Sezione di Napoli e l'iniziativa Specifica Nazionale Fisica Biologica dell'INFN. Presso la Federico II coordina la *Task Force* d'Ateneo sulla Biologia Computazionale e Quantitativa. È membro di progetti e *panel* internazionali per la gestione della ricerca e delle sue risorse, incluso il consorzio The 4D Nucleome del National Institute of Health (NIH) negli USA, il Berlin Institute for Health in Germania e l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) in Francia. Il suo gruppo di ricerca lavora nel campo della Meccanica Statistica dei Sistemi Complessi e delle sue applicazioni alla Biologia Molecolare.

Le città invisibili, guidati da Italo Calvino nell'impero della matematica con la sacca del docente

Sandra Lucente

Dipartimento Interateneo di Fisica, Università degli Studi di Bari "A. Moro"

Introduzione

Incipit sull'incipit

"Non è detto che Kublai Kan creda a tutto quel che dice Marco Polo."

Ecco violata una delle regole che ogni *public speaker* conosce: non si inizia con una negazione. Ma è l'*incipit* de *Le Città invisibili*, il libro degli ossimori, pubblicato da Italo Calvino nel 1972. In questo articolo faremo riferimento all'edizione Mondadori del 1993 [1]. Qui le regole possono ribaltarsi e dalla negazione si costruiscono scene che la visione non può affermare. Prendono posto alla destra e alla sinistra del lettore Kublai Kan e Marco Polo. Uno dice, l'altro dubita. Attenzione lettore, guarda bene attorno. "Non è detto che Kublai Kan creda a tutto quel che dice Marco Polo". Chi non dice? L'autore è lì dinanzi a noi e aggancia la nostra curiosità con un dubbio.

Il libro è un tavolo da poker dove si sfidano il lettore, lo scrittore, l'imperatore e il viaggiatore.

Qualora il lettore sia un insegnante di matematica troverà in questo *incipit* quella sensazione che troppo spesso gli si palesa a lezione: non è detto che lo Studente creda a tutto quello che dice il Docente. Allora questo lettore-prof scruta nella direzione di Calvino e decide di giocare, di scoprire se davvero il viaggiatore mente all'imperatore, o peggio di scoprire se non sta mentendo lo scrittore.

Nelle pagine de *Le Città invisibili*, si instaura un dialogo tra Kublai Kan e Marco Polo, potremmo forse riguardare questa dinamica per stimolare il dialogo tra studente e docente. Il lettore ha puntato, Calvino rilanci.

Non è detto che voi crediate a tutto quello che sto per scrivere, a come gli intermezzi delle *Città invisibili* possano farci riflettere sulla didattica della matematica e sulla matematica

stessa, ma io amo questo romanzo e non posso che raccontarlo ogni volta in modo diverso, proprio come ha fatto Calvino con il *Milione* reinterpretandolo dopo quasi settecento anni.

La cornice

Non me ne vogliano gli studiosi di Calvino se in poche righe riassumerò un capolavoro, ma per ricavare dal testo delle osservazioni sull'insegnamento della matematica non ci occorrono troppi dettagli. Non abbiamo tempo, o meglio caratteri, per fermarci nelle città dell'impero di Levante ad ammirare il teatro, né a leggere insegne, o a fare chiacchierare con uomini guidati da stelle. Stiamo cercando una strada e allora stendiamo la mappa dell'universo invisibile e ne riassumiamo la struttura.

Ne *Le Città invisibili* ci sono 55 città di 11 diverse categorie, raggruppate in nove capitoli. Una struttura combinatoria dà origine a questa disposizione generando un indice apparentemente asimmetrico, si veda Appendice A. Altrove ho scritto [2], ma soprattutto parlato, del concetto matematico di dimensione che si legge in tutte le città, si veda Appendice B.

In questo articolo si vuole invece analizzare la cornice narrativa che accoglie le 55 mappe letterarie delle città. Tutte le città hanno il nome di una donna, ma gli unici che ne parlano sono uomini: l'imperatore, gli ambasciatori e oltre questi il giovane veneziano. All'inizio e alla fine di ogni capitolo, Calvino conduce il lettore all'ascolto del dialogo tra Marco Polo e Kublai Kan. Non c'è tempo storico, ma un grande spazio: l'impero di Kublai Kan è troppo ampio, quindi a Marco Polo è chiesto di descriverlo. Noi ci concentreremo su questi dialoghi, immaginando che Kublai Kan sia uno studente, l'impero sia la matematica e Marco Polo sia il docente.

Leggeremo solo la cornice delle *Città invisibili*, ed è ovvio che proveremo incompletezza alla fine della lettura. Eppure se un giorno andassimo agli Uffizi e ci concentrassimo solo sulle cornici dei capolavori sapremmo di aver visto abbastanza da saziare la sete di bellezza, torneremmo in seguito a goderci i dipinti. Leggeremo dunque i brani intercalati tra le città come fossero un racconto

disgiunto, deducendone, oserei dire, un corso di comunicazione e formazione.

Un ben più articolato esperimento del genere è stato compiuto nella rilettura matematica delle *Lezioni Americane* di Calvino fatta da Gabriele Lolli [3]. Che Calvino sia attratto dalla matematica è ben noto, basti rileggere la conferenza newyorkese del 1983 quando già preconizza la città dei *big numbers*.

L'edizione Mondadori 1993 ha per introduzione un brano di tale conferenza e una postfazione ad opera di Pier Paolo Pasolini. Per simmetria alle sue inclinazioni, Calvino attrae i matematici e stimola le analogie, il cuore del lavoro matematico, diceva Stefan Banach

"I buoni matematici riescono a vedere le analogie. I grandi matematici riescono a vedere le analogie tra le analogie".

Ma le analogie, e quindi anche questo articolo, si possono smontare e rimontare:

"Ogni città si trasfigura. Ma bisogna che tutto capiti per caso, senza dargli troppa importanza, senza la pretesa di star compiendo una operazione decisiva."

Gli elementi narrativi

L'ingresso dell'imperatore

Alla scelta di far vestire allo studente il ruolo di Kublai Kan e al docente quello di Marco Polo si potrebbe obiettare che lo studente non possiede la matematica-impero mentre Kublai Kan aveva conquistato il territorio. Ma oggi nella tasca di ogni studente c'è uno smartphone che raggiunge tutto il sapere in pochi secondi. Eppure Kublai Kan ha bisogno di Marco Polo, esattamente come lo studente ha bisogno di un resoconto che porti in evidenza quello che Calvino chiama "filigrana di un disegno così sottile da sfuggire al morso delle termiti". Il sapere raccontato non muore solo se accolto da curiosità e attenzione in ascolto continuo che stimoli l'immaginazione. È questo l'atteggiamento in cui viene introdotto Kublai Kan.

L'ingresso del giovane veneziano

Marco Polo entra in scena come nuovo arrivato e affatto ignaro alle lingue del Levante. Quando si parla del rapporto di qualcuno con la matematica succede spesso di ascoltare di docenti che non la rendono comprensibile o al contrario di nuovi arrivati che riescono a parlare di matematica in modo diverso. Marco Polo viene descritto dai suoi gesti, dai salti, dalle grida di meraviglia e di orrore, la pantomima dell'ambasciatore amato sembra funzionare molto meglio sull'imperatore rispetto al dettagliato calcolo portato dagli altri suoi colleghi ambasciatori. Può un docente avvicinare alla matematica solo con formule per quanto esatte? È invece necessario prima descrivere il senso di quelle formule con una pantomima di immagini che suscitino meraviglia e a volte persino orrore.

La sacca del docente e la partita a scacchi

La figura di Marco Polo è accompagnata dalle bisacce con oggetti da disporre come pezzi degli scacchi. Se immaginassimo uno studente parlare di noi, quali oggetti userebbe per connotarci? Abbiamo nella memoria docenti anni settanta con la sigaretta oppure catastrofici professori che perdono libri mentre camminano. La tecnologia ha fatto molto più ordine tra le carte, riversando il caos nelle cartelle di *file*. Oggi forse il *computer* è la bisaccia di molti docenti. Ma non esiste un docente che non abbia una borsa.

Marco Polo descrive le città estraendo oggetti dalla bisaccia disposti poi come pezzi degli scacchi. Calvino, in un romanzo combinatorio, non ci dice quale sia la migliore disposizione sulla scacchiera, è il segreto dell'ambasciatore. Quando un docente decide di ricorrere ai segni, di estrarre un oggetto da una borsa per spiegare un concetto, oppure di usare una *app* per provocare gli studenti con l'interazione di un concetto dinamico, allora deve anche decidere in quale modo porgerlo, a quale livello. La scacchiera di inizio gioco o la configurazione a due passi dallo scacco matto?

Facciamo un esempio che mi è particolarmente caro: il concetto di limite finito di una successione. Possiamo ovviamente scegliere dalla borsa solo il gesso o la penna del *tablet*, per scrivere la

nozione epsilon-nu, avendo egregiamente svolto il nostro compito e consegnando allo studente una formula che non contiene alcuna ambiguità. Docenti con una borsa leggermente più ingombrante preferiscono invece partire dal racconto della divisione del cerchio, dell'eshaustione archimedeo e mostrare sulla LIM programmi dinamici in cui poligoni regolari inscritti riempiono il cerchio dall'interno o dall'esterno. Solo dopo arriva la formula epsilon-nu. Questo secondo docente non ha mostrato pigreco già sotto-scacco, ma ha mostrato agli studenti tutta la partita.

C'è una possibilità ancora più efficace: far giocare la partita agli studenti stessi. Se allo studente si chiede di costruire il poligono regolare nel cerchio, di tagliarlo, dopo vari tentativi con numero di lati crescente sarà lo studente stesso ad osservare che la parte restante tende a zero. Solo dopo viene la visione di questo processo fatto con un numero di lati molto grande mediante un software di geometria dinamica e infine la formula. In pratica abbiamo disposto il nostro sapere come sulla scacchiera ad inizio partita. Per inciso, riguardo pigreco, uno degli esperimenti più famosi è lago di Buffon e questo scienziato francese, in quanto naturalista, viene citato da Calvino descrivendo la biblioteca della città di Teodora.

Tornando all'insegnamento della matematica, qualunque approccio si voglia seguire deve essere sottinteso che la matematica è una partita più grande di quella singola spiegazione. L'acquisizione di ogni concetto matematico dà una idea di matematica, anche se mai avremo tutti i concetti della regina delle scienze. In parallelo, dice Kublai Kan:

"Se ogni città è come una partita a scacchi, il giorno che arriverò a conoscerne le regole possederò finalmente il mio impero, anche se mai riuscirò a conoscer tutte le città che contiene."

Gli emblemi

"Palese o oscuro che fosse, tutto quel che Marco mostrava aveva il potere degli emblemi che una volta visti non si possono dimenticare nè confondere."

Anche nella singola frase, Calvino non rinuncia alla simmetria: "palese o oscuro" si legano a "nè

dimenticare nè confondere". L'emblema va indagato partendo da diverse direzioni. L'etimologia di emblema è gettare dentro.

Il docente che scelga di usare emblemi, cioè oggetti che introducano un concetto, non guardi tanto il suo gesto mentre porge un solido o una immagine o una stessa parola, ma si concentri sulla possibilità che lo studente lo tocchi, lo legga, lo guardi da varie prospettive. Gli emblemi che il docente utilizza per introdurre i concetti non sono i concetti stessi, per questo portano una parte di incertezza che la matematica andrà a chiarire. Non sempre le connessioni tra un elemento e l'altro del racconto risultavano evidenti all'imperatore: gli oggetti potevano voler dire cose diverse. Quando ad un bambino si consegna un emblema matematico (i regoli o il geopiano ad esempio) potrebbe usarlo con uno scopo completamente diverso da quello per cui abbiamo creato quell'oggetto. Eppure questa è una ricchezza. Gli emblemi sono l'esca del concetto.

Un esempio molto interessante è l'utilizzo di un domino per spiegare il principio di induzione. Un docente che voglia, come Marco Polo, usare gli emblemi dovrebbe disporre le tessere in verticale a distanza opportuna e farle poi cadere in successione, discutere con gli studenti di infinite tessere e di come il gioco si interromperebbe se una tessera fosse troppo lontana dall'altra. Solo dopo mostrerà esempi di dimostrazione per induzione e ancora dopo il metodo induttivo nella forma di assioma dei numeri naturali. Questo ultimo *step* è ovviamente consigliato soprattutto a livello universitario.

Forse un giorno lo studente dimenticherà cosa sia la base dell'induzione, non saprà quale è la somma dei quadrati degli interi, ma di certo ricorderà quelle tessere e l'esistenza di un metodo dimostrativo che riguarda solo le proprietà basate sui numeri naturali. Tornando al discorso didattico generale, il docente che passi dagli emblemi alle formule ponga molta attenzione a come sceglierli, in modo che il suo significato regga allo sviluppo del concetto. Come per Kublai Kan, ogni nuova notizia aggiunge all'emblema un nuovo senso. Si pensi alla spiegazione della parabola in ambito geometrico per poi ripescarla nell'ausilio grafico alle equazioni di secondo grado. Dunque l'emblema deve essere capace di accrescere il suo significato con lo

sviluppo delle conoscenze riguardo il concetto.

Tornando al caso del principio di induzione ad esempio, una volta introdotta la nozione di insieme continuo lo studente si chiederà come mai il domino non funziona più e potrebbe addirittura divenire all'idea che il continuo sia un blocco di marmo in cui le tessere sono così vicine che non c'è alcuno spazio per far cascare nemmeno una molecola.

Il linguaggio

Col passare del tempo, ai gesti si sostituiscono le parole

"dapprima esclamazioni, nomi isolati, verbi, poi giri di frase, discorsi ramificati e frondosi, metafore e traslati."

Sin dal principio chi insegna vorrà giungere a questo momento di dialogo meno imbarazzato, ma se prendiamo a modello l'ambasciatore Marco Polo allora dobbiamo notare che le prime parole a sostituire le esclamazioni sono i nomi isolati. Le parole della matematica vanno consegnate sempre con cautela, inserendole nel linguaggio naturale. Se vogliamo spiegare la corrispondenza tra insiemi, si potrebbe sottolineare che nelle pieghe della definizione di Dirichlet c'è l'idea di missive che gli abitanti del primo insieme mandano agli abitanti del secondo. La polisemia è una ricchezza del linguaggio matematico, non un limite. Eredita quella ambivalenza degli emblemi che generava spazio di libertà.

Marco Polo suggerisce anche di usare le metafore, queste sono in qualche modo sono gli emblemi della comunicazione. Tutto questo articolo è una metafora, quindi non mi soffermerò troppo su questo aspetto, ma sul loro uso in matematica. Vedere gli insiemi come *sécchi* invece che come cerchi è più o meno efficace per comprendere il concetto cardine della matematica moderna? L'idea dei *sécchi* va scartata perché non si presta poi alla spiegazione delle operazioni tra insiemi, non è chiaro cosa sia l'unione o l'intersezione.

Dunque la scelta della metafora richiede sempre attenzione. Infine, non è bene mischiare metafore diverse, bisogna estrarle una per volta dalla sacca del docente e consegnarle in modo che coloro con cui dialoghiamo possano analizzarle da diverse prospettive. Esattamente quello

che succedeva agli emblemi. Quando poi il concetto si formalizza nella spiegazione si devono riprendere i gesti, gli emblemi, le immagini e la metafore per mostrare la non ambiguità della formalizzazione. Alle notizie fondamentali enunciate con vocaboli precisi, egli faceva seguire un commento muto.

Il dialogo

Non troppi docenti sono disposti a credere che Marco Polo e Kublai Kan giungono ad un discorso ramificato e frondoso tanto che

"lo straniero aveva imparato a parlare la lingua dell'imperatore o l'imperatore a capire la lingua dello straniero."

Verso questo traguardo sono stati fondamentali le pause dei dialoghi, lo spazio intorno alle informazioni un

"vuoto non riempito di parole che ci si poteva girare in mezzo con il pensiero, perdersi, fermarsi a prendere il fresco o scappare via di corsa."

In epoca di *blog* e video e *slide*, occorre, come nella lezione frontale, avere la dote di descrivere i concetti lasciando dello spazio per girarci intorno, per perdersi, per fermarsi. Se chi ci ascolta troverà questa possibilità allora visiterà la città, altrimenti una didattica auto-consistente crea una città trafficata di nozioni, chiusa e soffocante.

Fermarsi manifestando insofferenza o scappare sono atteggiamenti tanto diversi che l'imperatore manifesta a paragrafi alterni. La pazienza di Marco Polo sta nell'accoglierli, non sopprimendo quel vuoto; la grandezza dell'imperatore sta nel volerlo abitare. Avere docenti che riempiono di nozioni o scegliere di essere studenti che rifiutano il tempo del perdersi tra queste rende la matematica una materia impenetrabile.

C'è una una scena in cui i due protagonisti calviniani tacciono:

"tra loro era indifferente che quesiti e soluzioni fossero enunciati ad alta voce o che ognuno dei due continuasse a rimuginarli in silenzio."

Siamo capaci, come insegnanti di questa zona di libertà su quesiti e soluzioni? Siamo capaci di

una pazienza alla Marco Polo? Il viaggiare gli ha dato un tempo diverso per ogni città, adesso dà all'imperatore il suo tempo di relazione. Ogni docente ricordi il tempo in cui ha viaggiato nelle città matematiche e ne generi il tempo di relazione con i suoi allievi fiducioso che un dialogo di questo tipo ha una meta, un approdo. Il sogno di ogni docente è ascoltare la frase dello studente che si avvia a congetture.

Nella metafora calviniana è il momento in cui l'imperatore annuncia al giovane veneziano:

"d'ora in poi sarò io a descrivere le città e tu verificherai se esistono e se sono come io le ho pensate."

C'è un passaggio intermedio che può essere obiettivo di ogni docente e studente: la lezione (la città nel caso di Marco Polo) deve poter essere smontata e ricostruita in altro modo, sostituendo ingredienti, spostandoli, invertendoli (come fa Kublai Kan). Ad esempio cambiando gli assiomi, si possono far immaginare le geometrie non euclidee già mentre si studiano gli Elementi.

I pezzi degli scacchi e la scacchiera

Verso fine libro Calvino mette in discussione gli emblemi suggerendo di usare pochi oggetti (i pezzi degli scacchi) per rappresentare svariati elementi. È un passaggio di astrazione che va fatto appunto dopo molto cammino, inserire l'astrazione prima di alcune curiose visioni ci priverebbe dell'attenzione dell'ascoltatore. Quando il viaggio nella matematica è maturo, il confronto docente/studente è quello tra giocatori di scacchi, e la partita è la scoperta di come le regole algebriche e geometriche conducano a stati successivi di conoscenza: innumerevoli forme che il sistema delle forme mette insieme e distrugge. Questo verbo distruggere non vale per i teoremi, ma sicuramente alcune partite sono state archiviate, hanno perso interesse.

A coloro che si occupano di programmi scolastici o dell'impostazione di corsi universitari è richiesta massima attenzione alla scelta degli argomenti da proporre agli studenti. La disposizione sulla scacchiera determina infatti la vittoria o la sconfitta della curiosità. Ma nessuno dimentichi di descrivere i meccanismi della matematica stessa, della scacchiera insomma. E lì

che ci sono le storie più affascinanti. Marco Polo fa proprio questo quando Kublai Kan mette in dubbio il senso del gioco: parla della consistenza della scacchiera.

Il giardino

Tutto il dialogo tra Kublai Kan e Marco Polo si svolge nel giardino dell'imperatore, in una atmosfera di bellezza orientale. All'inizio del capitolo VII però i protagonisti mettono in dubbio l'esistenza dei viaggi e dello stesso giardino. Resta solo certa l'esistenza del dialogo. Ma il giovane veneziano rassicura l'imperatore di un secondo giardino:

"ogni cosa che vedo e faccio prende senso in uno spazio della mente dove regna la stessa calma di qui, la stessa penombra, lo stesso silenzio percorso da fruscii di foglie."

Se dovessimo interpretare un luogo per lo studio della matematica non potremmo scegliere che un simile giardino. L'apprendimento della matematica diventa un viaggio solo se si parte da una mente concentrata, attenta ai fruscii del ragionamento, al muoversi delle ombre.

Rinunciare ad un approccio performante e competitivo è fondamentale per il piacere dello studio di questa disciplina. Quando Marco Polo aggiunge che il giardino dell'imperatore affaccia le sue terrazze sul lago delle loro menti sembra suggerire anche uno stile della lezione che ricordi agli studenti le potenzialità di uno studio concentrato, che non è un dono scontato che si attiva con un interruttore. La concentrazione è un esercizio continuo legato anche al credere in sé stessi e alla rinuncia di distrazioni/aiuti di dispositivi elettronici. La concentrazione è anche necessaria per far germogliare nel giardino della mente nuove bellezze. Un processo insomma che chiudendo il cerchio fa ripartire nuovi viaggi nell'impero della conoscenza.

L'impero

L'impero di Kublai Kan è amplissimo e descritto da ambasciatori anch'essi stranieri. Lo stesso conquistatore resta sempre straniero ai suoi sudditi. Seguendo metafora dell'impero matematico, dell'imperatore/ studente e degli ambascia-

tori/docenti giungiamo a dover affermare che chi insegna la matematica non la possiede mai definitivamente.

"Solo attraverso occhi e orecchi stranieri l'impero può manifestare la sua esistenza,"

così solo attraverso un passaggio millenario di testi e lezioni la matematica dispiega la sua lista di tesori. E per quanto il docente o il ricercatore singolo possa trasmettere metodi algebrici, idee geometriche, tecniche dimostrative, ogni giorno si palesa il rischio

"dell'opaco spessore sonoro"

che riduce le idee a cifre e tecnicismi. Invece la matematica da far scoprire è insieme quella necessaria per il prosieguo degli studi, quella in uso nelle applicazioni e perché no, quella possibile non ancora mai scritta, ma che si intravede nelle congetture che somigliano alle sfere di vetro nella città di Fedora.

Un'altra visione è descritta nella città di Zoe: si apprende che esiste una città senza figure e senza forma riempita di città particolari. Se l'impero per Kublai Kan ha perso la misura, per molti la matematica è l'impero della scienza, ma nel suo proliferare di teoremi e sottodiscipline e modelli ha perso quella forma così chiara che aveva quando era geometria euclidea prima e hilbertiana dopo.

Quando onestamente il docente rivela la sua pochezza rispetto ad una disciplina così vasta, lo studente potrebbe scoraggiarsi. Bisogna dunque tenersi pronti a dibattere su questo spiegando la potenza e il fascino del linguaggio matematico, pronto per descrivere anche le nostre città visibili e le loro dinamiche. Ma Calvino mette in guardia:

"non c'è linguaggio senza inganno."

Per questo tra i dialoghi si inserisce un paradosso (non si può tornare a raccontare la città da cui non si torna) e una dimostrazione per assurdo (sulla propria esistenza). Nulla avvicina lo studente alla logica che soggiace alla matematica più del gioco di ricerca dei paradossi. La domanda "a cosa serve questo gioco?" è però sempre pronta ad esplodere. Ci ricorda una esclamazione di Kublai Kan che sembra risentito con Marco

Polo e confrontandolo con gli altri ambasciatori esclama:

"Torni da paesi altrettanto lontani e tutto quello che sai dirmi sono i pensieri che vengono a chi prende il fresco la sera seduto sulla soglia di casa. A che ti serve tanto viaggiare?"

La matematica è fatta di discipline, connesse tra loro. È bene che sin da subito si insegni questa pluralità. Ogni disciplina è nata in risposta a domande di fisica o di filosofia o di economia o di matematica stessa. Ci sono persino parti della matematica nate da domande belliche. Come Calvino asserisce che

"ogni città riceve la sua forma dal deserto a cui si oppone,"

così i matematici non hanno la sensazione di colmare un vuoto, quanto di costruire e insieme scoprire le proprie città mentre rispondono. Non si costruisce l'applicazione della matematica, si risponde alle domande costruendo la matematica.

Un impero fatto di archi

Uno dei passaggi più celebri delle Città invisibili è il seguente:

"Marco Polo descrive un ponte, pietra per pietra - Ma qual è la pietra che sostiene il ponte? - chiede Kublai Kan - il ponte non è sostenuto da questa o quella pietra, - risponde Marco, - ma dalla linea dell'arco che esse formano. Kublai Kan rimane silenzioso, riflettendo. Poi soggiunge: - Perché mi parli delle pietre? È solo dell'arco che mi importa. Polo risponde: - Senza pietre non c'è arco. "

Il docente deve prendere il tempo di descrivere pietra per pietra l'arco di un concetto. Deve avere il coraggio di non andare immediatamente a quello che interessa allo studente, la matematica non è una disciplina in cui la comprensione si realizza nello stesso tempo della spiegazione. Il programma del corso o dell'anno deve essere un dispiegarsi di città che costituiscono un romanzo.

"Più si perdeva in quartieri sconosciuti di città lontane, più capiva le altre città che aveva attraversato per giungere fin là."

La geometria analitica non deve tradurre la geometria euclidea con i metodi algebrici, deve farci capire meglio l'una e l'altra disciplina. La bellezza del teorema di Pitagora potrebbe rivelarsi dopo aver studiato il teorema di Carnot o addirittura gli spazi hilbertiani. Se la matematica non ha tempo, il suo apprendimento sì. Lo studioso deve percepire che esiste un passato che cambia man mano egli avanza nel suo viaggio.

L'atlante

"Il Gran Kan possiede un atlante, ne sfoglia le carte sotto gli occhi di Marco Polo per mettere alla prova il suo sapere."

Il docente attuale sa bene che lo studente può cercare ogni contenuto sul *web* e il suo sapere può esser messo alla prova, allora si ricordi che lui è il viaggiatore, può riconoscere nella vastità della rete quello che ha già visto, accennare itinerari in zone sconosciute. Ci deve però accompagnare il dubbio che la rete possa sottrarci il possesso del sapere:

"Mi sembra che tu riconosci meglio le città sull'atlante che a visitarle di persona."

Il ruolo del docente non è elencare le città ma stimolare ad andare altrove.

Deve essere un atlante gigantesco quello di Kublai Kan, ricorda uno di quei quadri realizzati a puntinismo. In ogni punto si è contratta una città, proprio come accade ad Olinda. E tutte le città non sono che un punto sino ad una somiglianza assoluta suggerita da Calvino quando racconta Trude, la città proprio antecedente Olinda.

Capitava a scuola che ci venisse assegnato un disegno da colorare con il puntinismo. La visione finale era potente ma nessuno di quei punti aveva importanza in sé, eppure si potevano aggiungere ma non sottrarre punti. A ripensarci la rete e il sapere funzionano in modo analogo. Invece dei punti c'è una stringa di caratteri, l'indirizzo *web*, il disegno finale è potentissimo, ma si

rischia la perdita di importanza del singolo argomento. Lì esattamente lì, nella scelta del colore, nel racconto di quel punto è l'inalienabile ruolo dell'insegnante. Il segreto di Marco Polo non è aver visto le città, ma conoscere l'ascoltatore e stimolarne le attese:

"chi mi ascolta ritiene solo le parole che aspetta. Chi comanda al racconto non è la voce è l'orecchio."

Conclusione

La rappresentazione

In molte stampe e dipinti l'incontro tra Kublai Kan e Marco Polo è rappresentato come lo scambio di un libro. Chi guarda può immaginare che l'imperatore stia porgendo al veneziano un atlante del regno o, ricevendo Il Milione, o, in un universo futuro, insieme leggono Le Città Invisibili.

Nella postfazione Pasolini sottolinea che i "due interlocutori siano eternamente cangianti". Nel caso di docente/studente questo ci porta ad immaginare che nel porgersi il libro, nello scambiarsi lo sguardo, i nostri interlocutori si riconoscano e insieme si sorprendano del loro cambiamento nel tempo. Sarebbe auspicabile che in uno di questi passaggi di testi i due protagonisti dell'apprendimento si interroghino sull'assiomatica che produce un ramo o l'altro della matematica.

Per Marco Polo l'impero si genera da "una città fatta solo da eccezioni", per Kublai Kan "un modello che racchiude tutto quello che risponde alla norma". Lo studente impara il rigore e in un incontro di là nel tempo, il docente deve metterlo in discussione deve far capire che certe costruzioni teoriche sono nate da controesempi.

Le funzioni mostruose del primo novecento e la teoria dei frattali sono un esempio in questo senso. Quante volte i matematici si sono sentiti dire che le proprie visioni non esistevano. Sono sopravvissuti, come consiglia Marco Polo,

"credendo che se vuoi sapere quanto buio hai intorno devi aguzzare lo sguardo sulle fioche luci lontane."

La storia della matematica deve affiancarsi alle lezioni teoriche e alle esercitazioni perché quella storia mostra come procedere per viaggiare nel

vasto impero dei numeri e delle forme. Lo studente appassionato di matematica considererà anche l'approccio storico utile al dominare la materia. Torna a risuonare la domanda di Kublai Kan:

"riuscirò a possedere il mio impero finalmente?"

C'è una ingenua visione lineare del sapere, che non bisogna in alcun modo trasmettere. Il sapere, soprattutto odierno, è centrato sulla complessità e sulla parzialità di visioni. Lo studente appassionato di matematica deve avere in risposta a questa domanda l'idea di un impegno costante e di un lavoro corale che è quello che oggi si fa nei centri di ricerca. Sulla rete, grazie allo scambio di informazioni, il sapere diventa transdisciplinare e completa quel che sappiamo per portarci nuove domande su aspetti che non conosciamo.

"Il viaggiatore riconosce il poco che è suo scoprendo il molto che non ha avuto e che non avrà."

Conclusione sulla conclusione

L'introduzione di Calvino e la postfazione di Pasolini sembrano dialogare tra loro iterando il *pattern* del dialogo tra Kublai Kan e Marco Polo. Si legge nelle prime pagine:

"le città invisibili sono un sogno che nasce dal cuore delle città invivibili."

Si legge negli ultimi fogli:

"tutte le città che Calvino sogna nascono dallo scontro tra una città ideale e una città reale."

Anche questo articolo si è generato da lezioni e laboratori nella città del sapere che idealmente ha ancora il nome di scuola e università. A volte invisibile, a volte invivibile, a volte idealizzata, a volte realizzata. Parafrasando la frase di Calvino, la lezione di matematica ideale nasce nel cuore di un'epoca che sembra senza fantasia. E nasce persino dalla nostalgia. Pasolini, nella stessa postfazione, scrive infatti che

"i desideri, le nozioni, le informazioni, le notizie, le esperienze, le ideologie, le logiche, tutto è ricordo. Ogni strumento intellettuale per vivere è un ricordo."

Dunque anche la lezione di matematica deve mettere nostalgia della soluzione di un problema, dell'intuizione passata, dello studio futuro.

Parlando, o tacendo, del termine dei viaggi, chiede Kublai Kan:

"È per smaltire la nostalgia che sei andato tanto lontano?"

Non risponde Marco Polo:

"La forma delle cose si distingue meglio in lontananza."

Oggi si sente soprattutto nostalgia della profondità richiesta da ogni concetto. Una profondità individuale dinanzi alla complessità della matematica che il nostro tempo richiede. In definitiva il docente deve con il suo racconto mirare a suscitare la stessa decisione che nell'immaginario prese lo studente Kublai Kan:

"è tempo che il mio impero, già cresciuto troppo verso il fuori, cominci a crescere al di dentro"

e insieme crescere in leggerezza perché la matematica deve sempre essere fonte di piacere del pensiero e del dialogo.

Quello di Marco Polo e Kublai Kan si conclude con una notissima frase che non contiene la parola città o la parola viaggio ma le parole attenzione, sapere, apprendimento. Per non soffrire dell'inferno dei viventi, sostiene il giovane veneziano, esiste un modo che

"esige attenzione e apprendimento continuo: cercare e saper riconoscere chi e cosa non è inferno e farlo durare e dargli spazio."

Appendice A: Struttura combinatoria de Le città invisibili

Italo Calvino, figlio di una docente di botanica e un agronomo, sente la necessità di sistematizzare, di sperimentare la classificazione delle città.

Le 55 città sono raggruppate in 11 gruppi da 5:

(Me) LE CITTÀ E LA MEMORIA:

Diomira, Isidora, Zaira, Zora, Murilia

(De) LE CITTÀ E IL DESIDERIO:

Dorothea, Anastasia, Despina, Fedora, Zobeide

(Se) LE CITTÀ E I SEGNI:

Tamara, Zirma, Zoe, Ipazia, Olivia

(So) LE CITTÀ SOTTILI:

Isaura, Zenobia, Armilla, Sofronia, Ottavia

(Sc) LE CITTÀ E GLI SCAMBI:

Eufemia, Cloe, Eutropia, Ersilia, Smeraldina

(Oc) LE CITTÀ E GLI OCCHI:

Valdrada, Zemrude, Bauci, Fillide, Moriana

(No) LE CITTÀ E IL NOME:

Aglaura, Leandra, Pirra, Clarice, Irene

(Mo) LE CITTÀ E I MORTI:

Melania, Adelma, Eusapia, Argia, Laudomia

(Ci) LE CITTÀ E IL CIELO:

Eudossia, Bersabea, Tecla, Perinzia, Andria

(Co) LE CITTÀ CONTINUE:

Leonia, Trude, Procopia, Cecilia, Penteseia

(Na) LE CITTÀ NASCOSTE:

Olinda, Raissa, Marozia, Teodora, Berenice

In molti commenti si legge che 55 è somma dei primi dieci numeri, insomma quello che i matematici chiamano numero triangolare. Come disporre sul triangolo le città?

A leggere l'indice del libro sembra esserci solo una gran confusione, ma non dimentichiamo che lo scrittore sta giocando con il lettore. Mettendoci alla prova giungiamo a quel sottile piacere della scoperta aritmetica comprendendo lo schema dell'indice già analizzato in [4] e [5].

L'indice dei primi due capitoli dà un triangolo. Le prime quattro righe, 10 città, costituiscono il primo capitolo, la quinta riga il secondo. Ma le città della memoria sono terminate. Per la sesta riga abbiamo due scelte: continuare a leggere l'indice e affidare solo al primo capitolo la triangolarità o lasciare uno spazio vuoto sotto Me5. La città successiva nell'indice è infatti De5. Se poniamo De5 sotto Me5 tutta la consequenzialità verticale si rompe. Quindi è meglio lasciare lo spazio vuoto. Il capitolo 3 contiene 5 città, dalla struttura precedente indoviniamo che le prime quattro sono De5, Se4, So2, Sc1, ne occorre una nuova, arriva Oc1. E chiaro che c'è una città in più che si sta costruendo: il libro stesso.

Inserendo tutto l'indice, andando a capo a fine capitolo e lasciando uno spazio vuoto, fino al pe-

Me1
 Me2 De1
 Me3 De2 Se1
 Me4 De3 Se2 So1
 Me5 De4 Se3 So2 Sc1

Figura 1: Indice a forma di scalinata (a).

Me1
 Me2 De1
 Me3 De2 Se1
 Me4 De3 Se2 So1
 Me5 De4 Se3 So2 Sc1
 De5 Se4 So3 Sc2 Oc1
 Se5 So4 Sc3 Oc2 No1
 So5 Sc4 Oc3 No2 Mo1
 Sc5 Oc4 No3 Mo2 Ci1
 Oc5 No4 Mo3 Ci2 Co1
 No5 Mo4 Ci3 Co2 Na1
 Mo5 Ci4 Co3 Na2
 Ci5 Co4 Na3
 Co5 Na4
 Na5

Figura 2: Indice a forma di scalinata (b).

nultimo capitolo il gioco funziona: le città dello stesso tipo appaiono in verticale, e viene fuori una scala, di cui tanto si è scritto come chiave di lettura del romanzo. L'ultimo capitolo contiene 10 città che consentono di completare la progressione verticale andando a capo e lasciando sempre uno spazio iniziale (Fig. 1 e 2).

Adesso la scala è doppia, come se il lettore che ha percorso la prima possa tornare indietro a quel primo capitolo di altrettante 10 città. Anche 10, come 15, è un numero triangolare, il più famoso essendo usato nel simbolo pitagorico del tetraktys.

Se infine capovolgessimo gli ultimi due capitoli negli spazi vuoti sotto i capitoli 3-7 avremmo l'evidenza della triangolarità di 55, ovvero la disposizione triangolare del libro con 11 righe, 11 viaggi di Marco Polo non uniformi, sempre più lunghi. Per un matematico una bella disposizione è quella che ricorda il triangolo di Tartaglia, o Pascal che dir si voglia (Fig. 3 e 4). Non a caso

Me1
 Me2 De1
 Me3 De2 Se1
 Me4 De3 Se2 So1
 Me5 De4 Se3 So2 Sc1
 Na5 De5 Se4 So3 Sc2 Oc1
 Na4 Co5 Se5 So4 Sc3 Oc2 No1
 Na3 Co4 Ci5 So5 Sc4 Oc3 No2 Mo1
 Na2 Co3 Ci4 Mo5 Sc5 Oc4 No3 Mo2 Ci1
 Na1 Co2 Ci3 Mo4 No5 Oc5 No4 Mo3 Ci2 Co1

Figura 3: Indice a forma di triangolo (a).

Me1
 Me2 De1
 Me3 De2 Se1
 Me4 De3 Se2 So1
 Me5 De4 Se3 So2 Sc1
 Na5 De5 Se4 So3 Sc2 Oc1
 Na4 Co5 Se5 So4 Sc3 Oc2 No1
 Na3 Co4 Ci5 So5 Sc4 Oc3 No2 Mo1
 Na2 Co3 Ci4 Mo5 Sc5 Oc4 No3 Mo2 Ci1
 Na1 Co2 Ci3 Mo4 No5 Oc5 No4 Mo3 Ci2 Co1

Figura 4: Indice a forma di triangolo (b).

55 è un numero anche di Fibonacci, ma pensare che Calvino lo abbia scelto per questo è come asserire che Castel del Monte è tutto basato sulla sequenza ricorsiva più famosa perché i suoi lati, escluso quello principale sono appunto 55. Ai

Me1
 Me2 De1
 Me3 De2 Se1
 Me4 De3 Se2 So1
 Me5 De4 Se3 So2 Sc1
 Na5 De5 Se4 So3 Sc2 Oc1
 Na4 Co5 Se5 So4 Sc3 Oc2 No1
 Na3 Co4 Ci5 So5 Sc4 Oc3 No2 Mo1
 Na2 Co3 Ci4 Mo5 Sc5 Oc4 No3 Mo2 Ci1
 Na1 Co2 Ci3 Mo4 No5 Oc5 No4 Mo3 Ci2 Co1

Figura 5: Indice a forma di sviluppo di poliedro (a).

numeri non bisogna far dire troppo altrimenti non dicono nulla. Potremmo per esempio dire che $55=15+15+15+10$ ma anche $55=4 \times 10 + 3 \times 5$. Nel primo caso avremmo suddiviso il triangolo in uno centrale di 10 città e tre laterali da 15 città. Se invece si vogliono evidenziare 4 tetraktys



Figura 6: *Indice a forma di sviluppo di poliedro (b).*

capovolgiamo ancora i primi e ultimi due capitoli e tre capitoli restano esclusi dal disegno di un parallelogramma, quel disegno che può divenire nuova lettura (Fig. 5 e 6). Queste due possibili suddivisioni ci portano a rappresentare il libro secondo la frase dell'autore ligure che troviamo nella introduzione:

"Questo è un libro fatto a poliedro, e di conclusioni ne ha un po' dappertutto, scritte lungo tutti i suoi spigoli."

La prima disposizione è lo sviluppo piano di una piramide triangolare retta. Le città dello stesso tipo sono ancora scritte in successione passando da una faccia all'altra. Il libro ha cambiato dimensione è diventato volume e anche Calvino sorriderrebbe di questo bisenso.

La seconda possibile configurazione ricorda lo sviluppo piano di un tetraedro. Si guadagna in regolarità e stabilità ma tre capitoli scompaiono nelle alette necessarie per incollare le facce. Ma possono scomparire le città invisibili? Non sta forse proprio nella loro invisibilità la loro permanenza? Il termine invisibile non compare frequentemente nel testo, ad un punto Kublai Kan lascia intendere che è invisibile la ragione perché una città viva e riviva ogni giorno. Un collante dunque, come nelle alette del tetraedro.

Ritengo più naturale che il poliedro sia la piramide la cui altezza cade sul triangolo delle dieci città rendendo So4, Sofronia, un punto di equilibrio. Peccato che proprio questa città viene continuamente smontata e rimontata, così il lettore deve fare con il libro stesso. Nella scala invece la città centrale è Bauci perché si trova nel posto 3 della riga 8, contando sia dall'alto che dal basso, sia da destra che da sinistra, insomma in una simmetria particolare. Calvino però scrive nell'introduzione:

"studiosi di semiologia strutturale hanno detto che nel punto esattamente centrale del libro bisogna cercare e han-

no trovato un'immagine di assenza ed hanno trovato Bauci."

Questa terza persona singolare indica un suggerimento alla comprensione del testo o un invito a complicare il gioco? La scala ha 15 righe, det-

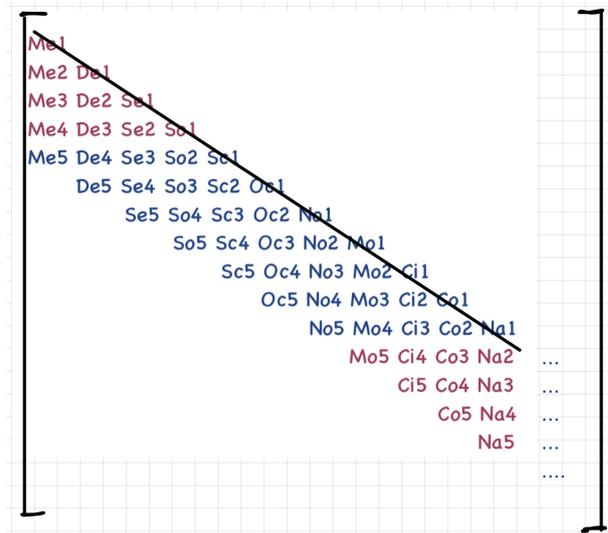


Figura 7: *Indice in forma di matrice.*

ta scacchiera sghemba e digradante dal critico Milanini [4], si può dunque inserire in una matrice 15x15 con la prima città di ciascun tipo sulla diagonale. La matrice è triangolarizzata inferiormente, sopra la diagonale gli elementi sono tutti nulli, e un altro triangolo di elementi nulli compare inferiormente. Ha quindi rango 11, e se consideriamo il romanzo come un sistema omogeneo (saranno d'accordo i colleghi umanisti con questo bisenso!) allora abbiamo infinite soluzioni, infinite città che tocca al lettore scrivere, e in molti infatti hanno provato a estendere questo poema. Ma se si scrive un nuovo tipo di città allora se ne scrivono altre quattro dello stesso tipo per non interrompere il gioco e la matrice aumenta di ordine. In definitiva, Calvino ci sta raccomandando di proseguire il gioco per rendere infiniti i luoghi di incontro.

"Il catalogo delle forme è sterminato: finché ogni forma non avrà trovato la sua città, nuove città continueranno a nascere."

Appendice B: Classificazione delle città secondo il concetto di dimensione

Il concetto matematico di dimensione è molto più recente di quanto si possa immaginare. Una sua storia è tracciata in [6]. Sin dagli albori del pensiero scientifico, lo spazio fisico ha richiesto un numero che descrivesse la sua dimensione. Possiamo dire che Aristotele ed Euclide furono abbastanza concordi nell'asserire che

"delle grandezze, quella che ha 1 dimensione è linea, quella che ne ha 2 è superficie, quella che ne ha 3 è corpo, e al di fuori di queste non si hanno altre grandezze."

Dirà anche Euclide che il punto non ha dimensione, allora, quando avremo il numero del non avere potremo assegnare dimensione zero al punto, dimensione 1 alle curve poiché descritte dallo scorrimento di un punto (ovvero di una punta), dimensione 2 al piano perché ottenuto facendo scorrere la retta che ha dimensione 1, dimensione 3 allo spazio che si riempie di fogli piani. Si costruisce induttivamente un universo.

Ma dal terzo secolo a.C. ad oggi la fisica stessa ha richiesto un passaggio allo spazio tempo. Così introdotta nella meccanica analitica di Lagrange a fine settecento, raccontata da Hilton un secolo dopo, la quarta dimensione non stupiva più all'inizio del novecento. Allora il discorso dimensionale passò alla matematica che generalizzato l'argomento con facilità a mondi N dimensionali diede ad ogni oggetto più coordinate e molteplici proiezioni.

Nel connubio tra matematica e fisica, a partire dalla fine dell'ottocento vengono anche introdotti i quaternioni, oggetti di dimensione pari, che estendono i numeri complessi, la loro chiave è la simmetria e la rotazione. La fisica delle particelle elementari richiede spazi infinito dimensionali.

Non sembri strano che per un matematico l'estrema generalizzazione riporti al punto di partenza. La matematica è una bizzarra materia in cui coloro che colgono i frutti parlano della forma delle radici e quel discorso modifica la coltivazione stessa, il frutto raccolto germoglia in nuove specie. Fuor di metafora, all'indomani della nascita delle geometrie non euclidee, della

formalizzazione della teoria degli insiemi e della classificazione degli infiniti ci si soffermò sulla definizione di dimensione e ne nacquero nuove.

Poincaré propose la seguente definizione: un oggetto è N dimensionale se esso viene tagliato da un oggetto almeno $N-1$ dimensionale. Ad esempio se assumiamo che il punto abbia dimensione zero, una curva continua ha dimensione 1 perché togliendo un punto si hanno due parti disgiunte (i matematici dicono che la curva meno il punto ha due componenti connesse). Per tagliare un piano occorre invece una linea, il solo punto non basta, si aggira. Quindi il piano ha dimensione 2 perché esiste un oggetto 1 dimensionale contenuto nel piano, tale che rimosso dal piano determina un insieme con due componenti connesse.

Il lettore controlli che per tagliare lo spazio occorre un piano e non basta una retta. Ovviamente nulla verrà tagliato, per attribuire la dimensione basterà immaginare l'oggetto che taglia. Sembra di essere nella città di Isaura, laddove

"il paesaggio invisibile condiziona quello visibile,"

invece è solo l'immaginazione razionale a creare le parole per il reale.

Tornando alla definizione di dimensione, Brouwer si restrinse ai cubi N dimensionali e li definì in modo ricorsivo guardandone la frontiera. Per passare da cubi ad altre figure occorre un teorema di invarianza, che Brouwer stesso aveva dimostrato. Un segmento ha per frontiera i punti, dunque se il punto ha dimensione zero, il segmento ha dimensione 1. Il quadrato ha dimensione 2 poiché il suo bordo è fatto da segmenti, cioè oggetti 1 dimensionali. Il lettore verifica facilmente che il bordo del cubo 3D è fatto da quadrati. Allora si immagina il tesseracto, cubo quadridimensionale come racchiuso da cubi tridimensionali. E non è difficile immaginare anche le dimensioni superiori.

Come è vicino l'inizio del percorso alle Definizioni 3 e 6 del Libro I degli Elementi di Euclide: gli estremi della linea sono punti, gli estremi di una superficie sono linee. Estremi, frontiera, bordo, comunque si chiami questo concetto è il più letterario della topologia: corrisponde al confine. Forse prima di parlare di intorni e aderenza, dovremmo leggere in aula la descri-

zione calviniana della città di Despina città di confine tra due deserti. Perché è il confine che definisce la città, il bordo la forma. Così dice persino Euclide nelle Definizioni 13 e 16 del Libro I degli Elementi:

"dicesi bordo ciò che è estremo di qualche cosa, dicesi figura ciò che è compreso da uno o più bordi".

Rispetto al rigore della geometria moderna, queste frasi sembrano confuse, ma vanno invece rilette per sentire che da sempre il *limes* è nella storia umana e anche matematica.

Queste ed altre teorie della dimensione topologica sono induttive, dunque la dimensione è un numero intero e positivo. Ma in teoria degli insiemi lo zero si costruisce dal vuoto, allora bisogna assegnare una dimensione dell'insieme vuoto, volgendo lo sguardo indietro rispetto al punto: convenzionalmente al vuoto si assegna valore -1. Paradossale che poi questa dimensione si utilizzi in statistica del linguaggio.

Una analogia intuizione, del legame tra vuoto e linguaggio, si trova nella cornice del romanzo quando Marco Polo spiega a Kublai Kan perché non parla mai di Venezia:

"Le immagini della memoria, una volta fissate con le parole, si cancellano. Forse Venezia ho paura di perderla tutta in una volta, se ne parlo.

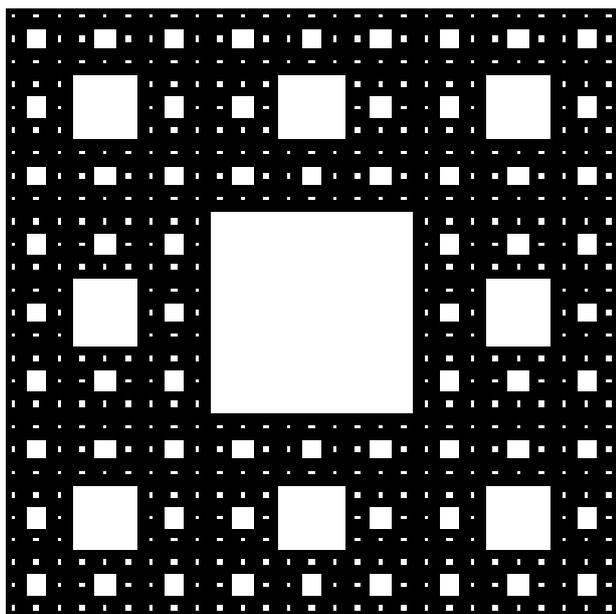


Figura 8: *Tappeto di Sierpinski*

All'inizio del novecento, con Hausdorff invece la dimensione diventa un concetto metrico e la dimensione può non essere intera, ci sono già gli esempi di Cantor, Menger e Peano ma è l'avvento della teoria dei frattali a mostrare oggetti in cui le diverse definizioni di dimensione non coincidono. Basti pensare al tappeto di Sierpinski (Fig. 8), ottenuto svuotando un quadrato di un nono centrale, in un procedimento limite resta una rete di linee, quindi ha dimensione topologica 1, ma ha dimensione di Hausdorff pari a $\ln(8)/\ln(3)$ che tiene conto appunto dei pezzi di quadrato che ogni volta sopravvivono al taglio e della divisione dei lati che abbiamo scelto.

Ben più complicate sono le cose per l'insieme di Mandelbrot, si veda [7], (Fig. 9) e il suo bordo avvicinandosi al quale sembra di giungere nella città denominata Cecilia, il cui viaggio ricorda la tecnica del box counting e i viaggiatori non possono che constatare che ormai i luoghi si sono mescolati.

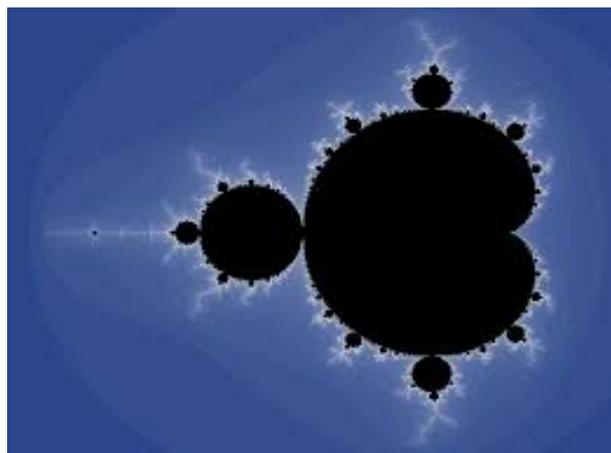


Figura 9: *Insieme di Mandelbrot*

Si può assegnare una dimensione ad ogni città visibile e invisibile. In alcuni lavori si sono classificate le città frattali e tra queste Matera attribuendone alla città dei Sassi una dimensione frattale, si veda [8].

Lo stesso Calvino nella introduzione attribuiva a Moriana la dimensione due. In questa appendice, senza specificare il motivo, si assegna ad ogni città invisibile una dimensione. Il lettore può cambiare la scelta, prediligendo la dimensione topologica a quella metrica o viceversa, le caratteristiche del confine, alla Brouwer, rispetto alle caratteristiche di connessione, alla Poincaré.

Dimensione negativa: il vuoto.

Zoe (Se3), Ipazia (Se4), Ottavia (So5), Bauci (Oc3).

Dimensione zero: il punto.

Fillide (Oc4), Trude (Co2), Olinda (Na1), Procopia (Co3).

Dimensione uno: la linea.

Isaura (So1), Armilla (So3), Cloe (Sc2), Ersilia (Sc4), Tecla (ci3), Marozia (Na3).

Dimensione due: la superficie.

Despina (De3), Leandra (No2), Eudossia (Ci1), Moriana (Oc5), Argia (Mo2).

Dimensione tre: lo spazio.

Diomira (Me1), Anastasia (De2), Irene (De5), Laudomia (Mo5).

Dimensione quattro: spazio-tempo.

Zaira (Me3), Zora (Me4), Zirma (Se2), Eufemia (Sc1), Adelma (Mo2), Clarice (No4).

Dimensione N: la classificazione.

Dorotea (De1), Tamara (Se1), ZemRude (Oc2), Bersabea (Ci2), Teodora (Na4).

Dimensione complessa: reale e immaginario.

Fedora (De4), Valdrada (Oc1), Sofronia (So4), Aglaura (No1), Eusapia (Mo3), Perinzia (Ci4), Raissa (Na2), Andria (Ci5).

Dimensione frazionaria o frattale.

Isidora (Me2) frattale ad albero, Zenobia (So2) pattern reiterato, Zobeide (De5) gomito, Eutropia (Sc3) gerla di Apollonio, Pirra (No3) negativo dell'insieme di Cantor, Smeraldina (Sc5) curva di Peano, Cecilia (Co4) bordo dell'insieme di Mandelbrot, Berenice (Na5) Yin-Yang ricorsivo.

Dimensione infinita.

Maurilia (Me5), Olivia (Se5), Melania (Mo1), Leonia (Co1), Penteseleia (Co5).

In questa suddivisione, le caratteristiche di elencazione, simmetria e ricorsività sembrano dominare rispetto ad altre. Sarebbe interessante confrontare questa mia con un'altra classificazione, mi aspetto che qualche città perda dimensione perché il lettore ha visto una proiezione di quello che osservavo o viceversa possa avere dimensione maggiore perché leggendo avevo una prospettiva diversa. Oppure, alcune città, come i frattali possono avere due dimensioni: una topologica e una che tiene conto delle proprietà metriche.

"Il filo del discorso è segreto, le loro regole assurde, le prospettive in-

gannevoli, e ogni cosa ne nasconde un'altra."



- [1] I. Calvino: *Le città invisibili*, Oscar Mondadori, Milano (1993).
- [2] S. Lucente, *Le dimensioni invisibili nella civiltà degli algoritmi*, in Atti del Convegno Log@ritmi la provocazione della Scienza 2018, Paginaria Edizioni, Polignano a mare, (2019), Ed. Alberto Maiale.
- [3] G. Lolli: *Discorso sulla matematica*, Bollati Boringhieri, Torino (2011).
- [4] C. Milanini: *L'utopia discontinua. Saggio su Calvino*, Garzanti, Milano (1990).
- [5] P. Alessandrini *La matematica invisibile di Calvino* dal blog Mr. Palomar, 18/09/2011.
- [6] T. Crilly, D. M. Johnson: *The emergence of topological dimension theory*, in *History of topology*, North-Holland, Amsterdam (1999), Ed. I.M. James, p. 1-24.
- [7] B. Mandelbrot: *The Fractal Geometry of Nature*, WH Freeman, New York (1982).
- [8] S. Lucente: *Matera in Many Dimensions*, Heritage, 2019 (2) 380.



Sandra Lucente: è docente di Analisi Matematica presso il Dipartimento Interateneo di Fisica dell'Università degli Studi di Bari Aldo Moro. Fa ricerca sulle equazioni alle derivate parziali di tipo iperbolico e dispersivo. Attualmente è Presidente del Museo della Matematica del Dipartimento di Matematica dell'Università di Bari. Comunicatrice scientifica per Sapere, Maddmaths!, Prisma, La Repubblica, è anche formatrice e insegnante di comunicazione della scienza. Autrice dei testi di turismo matematico: *Itinerari Matematici in Puglia*, *Itinerari Matematici in Basilicata per Giazira Scritture*. Con una biografia di Ennio De Giorgi è coautrice di *Mezzogiorno di Scienza*, Dedalo Edizioni 2020.

Numero XVIII Anno 2021



Fisica, Matematica e Medicina (A)

