

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Dipartimento di Fisica e Astronomia
Corso di Laurea in Fisica

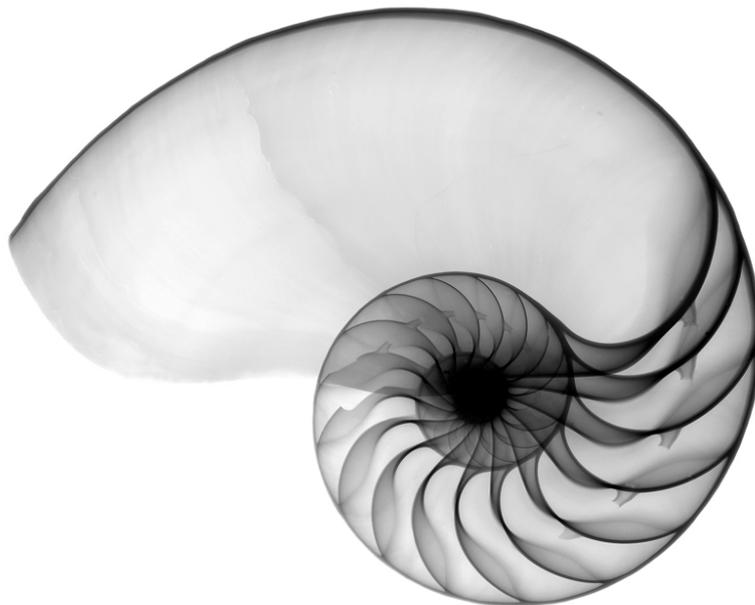
MODELLI DI REAZIONE-DIFFUSIONE

Presentata da:
Sara Sponghi

Relatore:
**Castellani
Gastone**
Correlatrice:
**Sala
Claudia**

Anno Accademico 2020-2021

La mente busca lo muerto pues lo vivo se le escapa; quiere cuajar en témpanos la corriente fugitiva, quiere fijarla. Para analizar un cuerpo, hay que menguarlo o destruirlo. Para comprender algo hay que matarlo, enrigidecerlo en la mente. La ciencia es un cementerio de ideas muertas, aunque de ellas salga vida. También los gusanos se alimentan de cadáveres. Mis propios pensamientos tumultuosos y agitados en los senos de mi mente, desgajados de su raíz cordial, vertidos a este papel y fijados en él en formas inalterables, son ya cadáveres de pensamientos. ¿Cómo pues, va a abrirse la razón a la revelación de la vida? Es un trágico combate, es el fondo de la tragedia, el combate de la vida con la razón. (Miguel De Unamuno)



Abstract

L'essere umano è fatto per osservare, porsi domande e ottenere risposte. Per ottenerle si affida ai modelli astratti e la sfida consiste nel trovare quello che meglio approssima il comportamento di ciò che lo circonda. La natura, apparentemente imprevedibile, è in realtà un caleidoscopio di periodicità (dalle coloratissime fantasie degli anfibì alle pigmentazioni delle ali dei volatili) formalizzabili in un'equazione differenziale. Quest'equazione può essere risolta numericamente ma la parte intrigante del problema non sta nella soluzione in sé, quanto più in ciò che la soluzione stessa rappresenta. Partendo dalla soluzione e analizzando la periodicità innescata infatti è possibile risalire al processo scatenante (molecolare, cellulare o meccanico) e ottenere così nuove informazioni sui meccanismi che stanno alla base dell'organizzazione cellulare durante lo sviluppo di un organismo. Quello che verrà fatto in questa tesi sarà simulare un processo di diffusione sfruttando la soluzione per il caso molecolare, per poi verificare (dai dati sintetici) che tale soluzione comporti la formazione di un'effettiva periodicità. Nel primo capitolo verranno spiegati i processi biologici che possono sottostare la formazione di pattern, da quelli previsti dalla teoria di Turing a quelli alternativi (i.e. gradienti di concentrazione). Il secondo e il terzo capitolo trattano le metodologie di approccio allo studio del problema e la conseguente classificazione dei processi: dopo un breve excursus su tre principali meccanismi in grado di dar luogo alla formazione di pattern, viene accennata la costruzione di un generico modello matematico in grado di inglobare le tre categorie e rendere conto della formazione di periodicità. Tale modello è basato sulla definizione di una funzione di interazione fra le componenti del sistema, ricavata con metodi matematici utilizzati per la linearizzazione dei sistemi di equazioni differenziali parziali (approfonditi nel quarto capitolo). Nel terzo capitolo vengono discussi inoltre, qualitativamente, i risultati ottenuti dalla simulazione: le conclusioni sembrano confermare il modello ipotizzato. Il lavoro svolto in questa tesi, pur meritando ulteriori indagini, pone le basi per lo studio dei meccanismi di formazione di pattern a partire da dati sperimentali.

Indice

1	Periodicità nei Tessuti e Meccanica Cellulare	1
1.1	Il Modello di Turing e i Meccanismi Alternativi	2
1.2	La Meccanica Cellulare e le Vie di Segnalazione	4
1.3	La Tensione Corticale nella Riorganizzazione Cellulare	6
1.4	La Riorganizzazione Cellulare nella Fase di Sviluppo	8
1.5	Polarità Planare	10
2	Approccio Matematico alle Diverse Cause di Periodicità	12
2.1	Meccanismi di Patterning nei Sistemi Biologici	13
2.2	Meccanismi Diversi Possono Dare Origine a Pattern Simili <i>in Silico</i> .	14
2.3	Classificazione dei Meccanismi	15
2.4	Conferme di Ipotesi <i>A Priori</i>	19
3	Modello per il Caso Molecolare	23
3.1	Cenni sulla Funzione di Interazione per il Caso Molecolare	23
3.2	Simulazione e Risultati	26
3.3	Conclusioni	31
4	Compendi	32
4.1	Stabilità	32
4.2	Legge di Fick ed Equazione di Reazione-Diffusione.	39
5	<i>Grazie non è mai scontato</i>	44
5.1	Alla Famiglia	44
5.2	Agli amici di Prometeo	44
5.3	Agli amici di Fisica	44
5.4	A Graziano Servizi	45

Capitolo 1

Periodicità nei Tessuti e Meccanica Cellulare

L'organizzazione dei tessuti è un processo fondamentale per la fase di sviluppo di un organismo e avviene tramite proliferazione, migrazione e differenziazione cellulare. Su grandi scale sono i processi di informazione posizionale attraverso i morfogeni e le interazioni fra cellule a determinare la differenziazione, mentre a livello locale sono le dinamiche di contrazione e le molecole di adesione cellulare (CAM) a influenzare gli impacchettamenti e di conseguenza la funzione specifica che assumeranno i diversi tipi cellulari. Il primo capitolo si concentra proprio sulla distinzione fra i processi globali e quelli locali, dalla morfogenesi alle dinamiche di contrazione. Quest'ultime, come vedremo in seguito, portano ad una polarizzazione delle componenti intracellulari che si riproduce su larga scala rispetto agli assi embrionali e innesca così la formazione di pattern caratteristici. Lo scopo della trattazione è quello di formalizzare i processi biologici di patterning in un modello matematico sulla scia dei lavori di D'Arcy Thompson (*On Growth and Form*, 1917) e di Alan Turing (*The Chemical Basis of Morphogenesis*, 1952), che cercarono una correlazione fra le reazioni chimiche inorganiche e quelle organiche. Lo stesso Alan Turing, ispirato dal lavoro di Thompson, pensò di formalizzare la formazione di periodicità in un'equazione differenziale in grado di descrivere l'interazione fra due molecole (un attivatore e un inibitore di periodicità) caratterizzate da tassi di diffusione differenti. Come vedremo più avanti (Cap.2) il modello di *reazione-diffusione* di Turing non è l'unico in grado di spiegare la formazione di periodicità, ma può essere una solida base di partenza per la costruzione di un più generico modello matematico.

1.1 Il Modello di Turing e i Meccanismi Alternativi

Il modello di Turing si basa sull'esistenza di due morfogeni, un attivatore e un inibitore, secreti dalle cellule e caratterizzati da due tassi di diffusione differenti, la cui mutua interazione comporta la formazione di pattern periodici. L'attivatore diffonde lentamente concentrando la sua azione a livello locale, mentre l'inibitore agisce rapidamente ma ad un tempo limitato rispetto a quello dell'attivatore. Tenendo in considerazione che il morfogeno adibito all'attivazione produce anche il suo stesso inibitore, le due molecole danno origine ad un'onda stazionaria che descrive l'andamento della periodicità caratteristica. Per rendere più chiaro il concetto forniamo un esempio: supponiamo di poter paragonare il comportamento dell'attivatore al tasso di proliferazione di una popolazione di conigli. La proliferazione degli esemplari fornisce nutrimento per i predatori, ad esempio una popolazione di volpi (che giocano il ruolo di inibitori). Al crescere della popolazione di conigli cresce anche la popolazione delle volpi, portando così a favorire nel lungo periodo la proliferazione dei predatori ma non quella delle prede - giacché la riproduzione dei conigli favorisce quella delle volpi ma non accade il viceversa. Se invece la proliferazione di entrambe le specie si accompagnasse ad un'espansione del raggio d'azione, e in particolare il raggio d'azione delle volpi fosse molto maggiore di quello dei conigli ma limitato nel tempo, la presenza delle volpi finirebbe per circoscrivere una zona dominata dai conigli portando ad un pool locale di attivazione circondato da una zona di inibizione. Ecco perché si dice che il modello di Turing si basa su un meccanismo di *attivazione locale e inibizione a lungo raggio*. Bisogna però identificare quali morfogeni siano buoni candidati alla coppia *attivatore-inibitore* (dettagli più approfonditi verranno forniti nel Cap.2) e incorporare la teoria di Turing ai risultati sperimentali ottenuti dalla biologia molecolare e dall'ingegneria genetica, che rivelano il coinvolgimento di numerose vie di regolazione geniche (GRN) non incluse nel modello di diffusione. Anche se recenti simulazioni informatiche hanno dimostrato come il modello di Turing si riveli adatto alla descrizione di patterning specifici quali la distribuzione dei follicoli piliferi nei topi o delle piume nelle ali di volatili, in altri casi i meccanismi sottostanti sembrano essere di natura differente. Questo è il caso della *germband*¹ della *Drosophila*, dove è l'espressione genica a dettare la periodicità piuttosto che un processo di diffusione molecolare. Un altro esempio alternativo al processo di diffusione (ma che, come vedremo nel Cap.2, può essere formalizzato in modo analogo) è dato dal caso del *Danio Zebrafish*: la fantasia a strisce tipica di questo pesce è dovuta alla mutua interazione fra le cellule dei pigmenti, che si traduce in una migrazione direzionata non prevista dalla teoria di Turing. Bisogna inoltre aggiungere che l'equazione del modello di diffusione si presta bene ad una descrizione bidimensionale e dunque può rivelarsi utile per l'analisi di tessuti comparabili con array 2D quali quello della pelle, dell'intestino o dell'orecchio interno. Altre componenti biologiche più complesse che non possono essere descritte bidimensionalmente, come i tubuli del sistema vascolare, necessitano di un formalismo alternativo come quello proposto da Lewis Wolpert. Wolpert pensò di introdurre il concetto di *informazione*

¹Insieme di strati germinali che determina l'asse dorsale-ventrale dell'embrione durante la fase di gastrulazione negli insetti. [7]

ne posizionale, secondo cui le cellule si differenziano e si distribuiscono seguendo un gradiente chimico o meccanico per poi attivare GRN in grado di precisare il destino cellulare. I gradienti di concentrazione sono fondamentali nella determinazione degli assi embrionali rispetto cui andranno ad organizzarsi i tessuti dell'organismo: nel caso della *Drosophila* è proprio la concentrazione di gene bicoide a definire l'asse anteriore-posteriore durante la fase di gastrulazione (processo di sviluppo embrionale che porta alla formazione di endoderma, mesoderma ed ectoderma) dell'embrione. Come già anticipato precedentemente che i meccanismi di formazione di patterning possano dipendere da processi alternativi a quello di diffusione è noto da evidenze sperimentali, tuttavia nulla esclude che una concomitanza di entrambi comporti la formazione di periodicità. Ad esempio, la formazione delle dita dei vertebrati sembra essere frutto sia di un meccanismo di diffusione che di uno di informazione posizionale: un sistema di reazione-diffusione di morfogeni WNT, BMP e SOX9 è responsabile dell'organizzazione delle cellule mesenchimali² per la formazione delle dita, mentre il gradiente di SHH³ rispetto all'asse anteriore-posteriore modifica la lunghezza d'onda del modello di diffusione che descrive la loro morfologia.

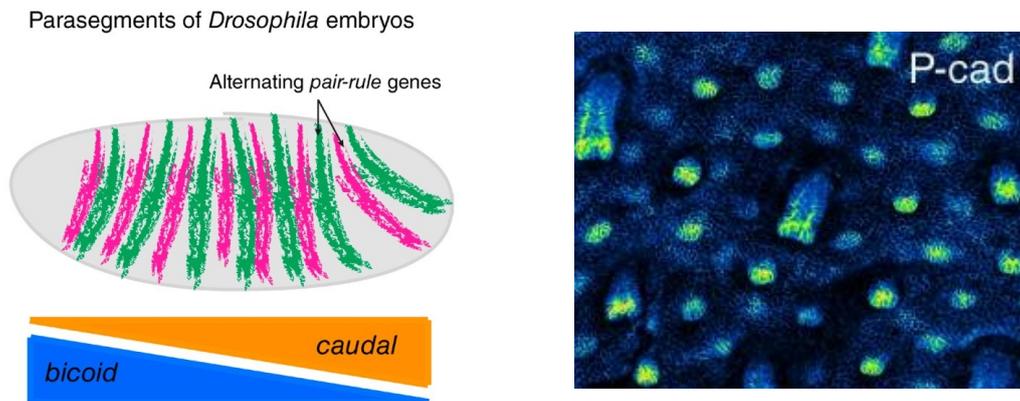


Figura 1.1: Casi in cui è l'espressione genica a determinare il patterning. A sx: immunofluorescenza di Caderina-P nell'epidermide del topo al giorno 16.5 della fase embrionale per la periodicità nella posizione e nell'angolatura rispetto l'asse anteriore-posteriore dei follicoli piliferi. Si ritiene che le posizioni dei follicoli siano dovute a processi di sistemi di reazione-diffusione di WNT e Dkk4. Bar, 10 m. A dx: segmentazione del corpo di *Drosophila* dovuto al *pair-rule gene*, che si manifesta a strisce alternate ognuna indipendente dall'altra e dunque con unica identità. L'espressione dei *pair-rule gene* dipende dall'espressione di *gap gene* che interagiscono a loro volta con i gradienti dei geni maternali bicoide e caudale. Immagine di Evan Heller e Elaine Fuchs (Tissue patterning and cellular mechanics)

²Cellule staminali pluripotenti in grado di generare cellule connettivali. [12]

³Una delle tre proteine della famiglia Hedgehog nonché ligando fondamentale per la via di segnalazione SHH, fondamentale per l'organogenesi dei vertebrati. [9]

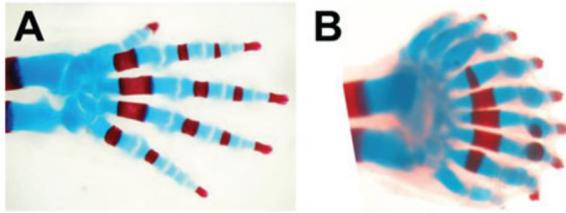


Figura 1.2: Arti di topo. Il numero delle dita aumenta al diminuire della dose distale di Hox. Quando rimane solo una copia funzionale di Hoxa-13 l'inizio delle dita è connesso da una banda ossificata continua (in rosso) e da tessuto cartilagineo (in blu) che formano i bordi distali dell'arto. L'immagine è stata presa dal paper *Mathematically guided approaches to distinguish models of periodic patterning* di Tom W. Hiscock e Sean G. Megason, riprodotta con i permessi di Miura e Shiota (2000b)

1.2 La Meccanica Cellulare e le Vie di Segnalazione

Come già accennato nell'introduzione al Cap.1, a livello locale la formazione di patterning è dettata dalle dinamiche delle CAM e dalle proprietà di adesione. Partiamo dalla struttura cellulare: la forma e gli elementi costituenti variano al variare della tipologia (i.e. eucarioti/procarioti, animali/vegetali) e sono proprio tali elementi a determinare le risposte alle sollecitazioni meccaniche cui la cellula è sottoposta. Le due strutture portanti sono la membrana cellulare e il citoscheletro, che si rivela fondamentale per i meccanismi di adesione intercellulare. Di fatto sono gli elementi del citoscheletro che conferiscono rigidità alle pareti della membrana e capacità di contrazione.

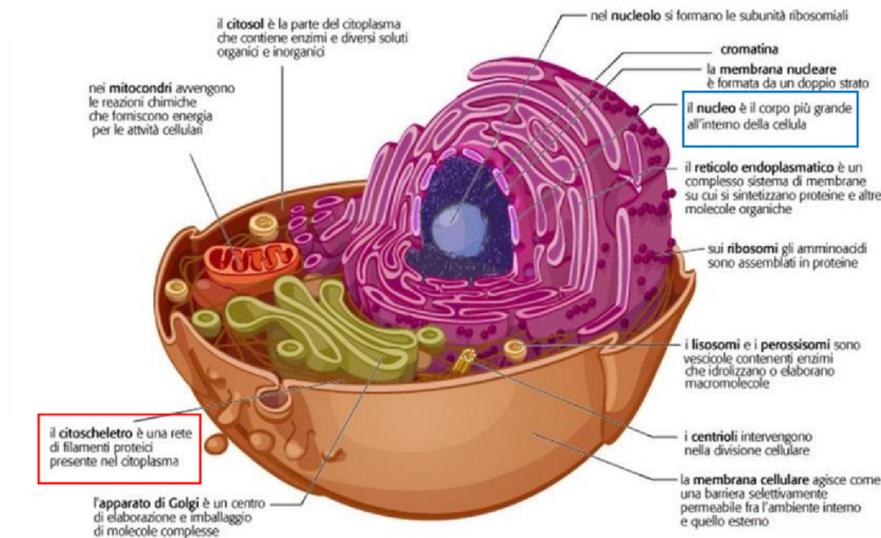


Figura 1.3: Struttura della cellula. Fonte: Curtis et al. *Invito alla biologia*. blu © Zanichelli editore, 2011

Affinché le cellule funzionino correttamente è necessario che siano in grado di organizzarsi nello spazio e che sappiano interagire sia le une con le altre che con l'ambiente che le circonda. Devono essere robuste ma flessibili e avere forme caratteristiche sia per poter migrare che per interagire con l'ambiente esterno. Inoltre, ogni cellula deve poter cambiare forma e modificare le proprie componenti interne per poter

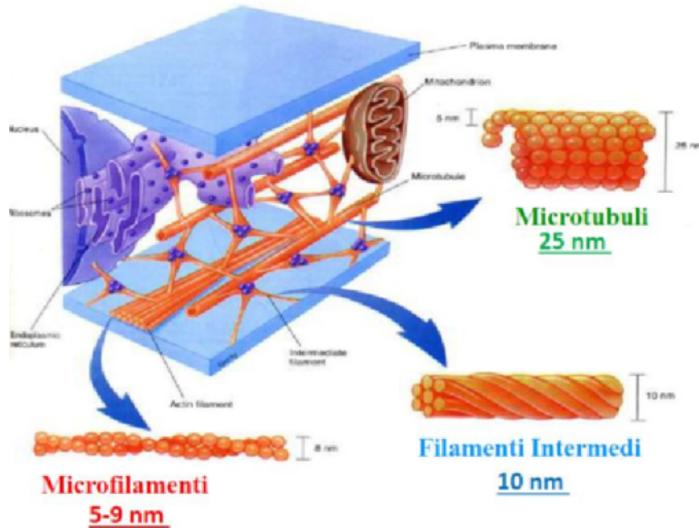


Figura 1.4: Composizione del citoscheletro. Il citoscheletro è formato da tre strutture principali: i microfilamenti, i filamenti intermedi e i microtubuli. L'immagine è stata presa dalla presentazione: Proprietà meccaniche delle cellule (Corso di Caratteristiche meccaniche e tecnologiche dei materiali non convenzionali), A.A. 2018-2019, Unife. A cura di: Daniele Borin, PhD (dborin@units.it)

processare la crescita, la divisione o l'eventuale adattamento a fattori ambientali. Tutte queste funzioni, di natura prettamente meccanica, dipendono dal citoscheletro. Il citoscheletro è costituito da tre famiglie di filamenti proteici: filamenti di actina, filamenti intermedi di proteine fibrose e microtubuli (formati da una proteina globulare detta tubulina), che svolgono ruoli diversi ma sono tutti finalizzati al sostentamento meccanico della cellula⁴. I filamenti di actina (15-20% delle proteine cellulari) determinano la forma della superficie cellulare, conferiscono maggior resistenza agli sforzi di taglio e costituiscono il *cortex*. I microtubuli sono importanti per la resistenza agli sforzi di compressione esercitati sulla cellula e dirigono il moto cromosomico durante la formazione del fuso mitotico, oltre a costituire il sostegno per ciglia e flagelli. Infine, i filamenti intermedi interagiscono coi microfilamenti e i microtubuli per portare ad una maggiore resistenza agli sforzi di trazione e dunque ad una maggiore stabilità meccanica, mantengono in posizione gli organuli del citoscheletro e, estendendosi nel citoplasma e connettendo le giunzioni cellulari, favoriscono i meccanismi di adesione cellula-cellula. Queste tre famiglie di filamenti interagiscono poi con proteine accessorie in grado di regolare e collegare i filamenti stessi ad altre componenti cellulari, oltre che fra sé stessi. Evidenze sperimentali recenti hanno dimostrato come le dinamiche di adesione favorite dall'attività dei filamenti intermedi stiano proprio alla base dell'organizzazione cellulare negli embrioni di *Danio Zabrato*, come verrà approfondito nel Cap.2. I filamenti del citoscheletro, infatti, sono essenziali per i processi adattivi e favoriscono la formazione di strutture dinamiche o stabili secondo necessità. Inoltre sono proprio le dinamiche del citoscheletro a determinare l'organizzazione cellulare e la polarità rispetto gli assi embrionali, polarità strettamente correlata anche alle vie di segnalazione.

Ci si pone dunque l'obiettivo di trovare la correlazione fra meccanica cellulare, vie di segnalazione e patterning, in modo da poter delineare come processi di natura differenti possano concomitare alla formazione di periodicità. In primo luogo definiamo e analizziamo il funzionamento delle vie di segnalazione: in biologia il processo di trasmissione delle informazioni alle cellule è necessario a determinare il loro comportamento e un malfunzionamento potrebbe comportare errori genetici o

⁴[1]

malattie. La trasmissione delle informazioni dall'ambiente esterno a quello interno passa per proteine transmembrana il cui sito di legame si trova in uno spazio extracellulare. La ricezione di segnali esterni innesca una serie di reazioni a cascata da parte delle componenti cellulari, che intervengono sul nucleo attivando o inibendo espressioni geniche che a loro volta modificano i comportamenti delle cellule stesse o le loro proprietà fisiche (i.e. adesione).

Ad esempio, in alcuni organismi sia le vie di segnalazione WNT che le proteine della famiglia TGF- β riducono le proprietà di adesione e aumentano la motilità cellulare, con conseguente differenziazione. Da ciò si evince come la ricezione delle informazioni che passa per le vie di segnalazione comporti una modifica delle proprietà meccaniche o dei comportamenti cellulari. Tuttavia non solo le vie di segnalazione influiscono sulla meccanica cellulare, ma vale anche il contrario: cambiamenti nell'adesione e nella tensione dovuta al contatto cellula-cellula o cellula-matrice extra-cellulare (ECM) può portare le vie locali, sensibili ai cambiamenti meccanici, a modificare le reti di segnalazione su scala globale - come se l'eventuale presenza e/o l'intensità del segnale dipendessero dalle proprietà fisiche cellulari. E' il caso della rete di segnalazione TGF- β che interagisce con numerose vie responsabili della motilità cellulare: le TGF- β sono essenziali per la disgregazione di giunzioni cellulari, ottenuta grazie all'attivazione di Rho. A sua volta i moti direzionati cellulari esercitano una tensione sull'ECM, che favorisce il rilascio delle TGF- β stesse che, a loro volta, favoriscono ulteriori moti cellulari.

Anche le WNT sono in grado di aumentare la motilità e ridurre l'adesione cellulare, che a sua volta porta all'attivazione della via Rho la quale, come anticipato poc'anzi, favorisce la disgregazione delle giunzioni disinibendo i moti cellulari. L'attivazione di Rho sembra poi essere essenziale per la risposta delle vie Hippo/YAP che, a loro volta, innescano una tensione sui tessuti e modulano la segnalazione WNT, contribuendo così alla disgregazione delle giunzioni. Oltre a ciò è stato dimostrato che la via di segnalazione YAP è responsabile anche del rientro delle cellule quiescenti nel ciclo cellulare, il che le conduce ad assumere un destino univocamente definito. I meccanismi che legano le vie WNT e le Hippo/YAP non sono ancora ben noti, se non che le YAP/TAZ sembrano avere un controllo diretto sulla contrazione dei tessuti tramite l'attivazione di Rho attraverso l'ARH-GAP18 (enzima per le reazioni cellulari). Come già detto anche la contrazione dei tessuti è in grado di modificare l'attività delle vie di segnalazione, dunque l'attivazione di Rho attraverso le vie YAP/TAZ potrebbe rappresentare un potenziale responsabile per una modifica delle reti di segnalazione su scala globale. Nonostante le relazioni che intercorrono fra le vie di segnalazione sopracitate siano ancora oggetto di studio, risulta chiaro che la co-partecipazione attiva di tutte queste contribuisca alle meccaniche cellulari dei tessuti.

1.3 La Tensione Corticale nella Riorganizzazione Cellulare

Se siamo riusciti a comprendere almeno in parte l'intima relazione che lega meccanica cellulare e organizzazione dei tessuti dobbiamo ringraziare i lavori di H.V. Wilson dei primi anni del 900: grazie ad alcuni studi condotti sulle spugne di ac-

qua dolce Wilson notò come cellule abemoidi lasciate in condizioni favorevoli alla rigenerazione tendessero a raggrupparsi, portando alla differenziazione. Wilson si accorse poi che i raggruppamenti cellulari non prescindevano da una sorta di *compatibilità*, poiché il processo di differenziazione non prendeva piede se non fra cellule appartenenti alla stessa specie. I lavori di Wilson ispirarono Townes e Holtfreter (1955), che studiarono le capacità di riorganizzazione cellulare di embrioni di anfibio, arrivando ad un risultato analogo a quello di Wilson: mischiando diversi tipi di cellule dissociate, queste si disponevano in modo tale da riprodurre la configurazione *in vivo*. Lo stesso risultato fu ottenuto utilizzando cellule epiteliali: sovrapponendo strati cellulari di neuroectoderma ed endoderma, il neuroectoderma veniva avvolto completamente dall'endoderma - rispecchiando così la configurazione *in vivo* come nel caso degli anfibio. Holtfreter arrivò così ad avanzare l'ipotesi che a guidare l'organizzazione cellulare in tessuti è la compatibilità fra i tessuti stessi, probabilmente dovuta ai processi di meccanica cellulare - ipotesi confermata dai risultati sperimentali più recenti. Bisogna però capire che gli esperimenti *in vitro* non sono una riproduzione accurata di ciò che avviene durante la fase di sviluppo di un organismo, in quanto è molto difficile che le cellule *in vivo* partano da una condizione di mescolamento indifferenziato come invece si verifica nei set sperimentali. Ciononostante quello stesso meccanismo studiato *in vitro* sta alla base della formazione e del mantenimento dei margini dei diversi tessuti biologici.

Non da subito siamo arrivati a capire che i processi di contrazione fossero tanto importanti quanto quelli di adesione: inizialmente infatti l'idea era che le cellule di un aggregato si comportassero come liquidi immiscibili, dove le molecole caratterizzate da un legame più forte (e dunque a più elevata tensione superficiale) si uniscono e si separano dal resto per minimizzare l'energia di superficie libera⁵ per portare il sistema alla stabilità. Tuttavia una teoria costruita sui meccanismi di adesione deve essere incorporata con uno studio approfondito dei processi di contrazione di actina e miosina, che influenzano le proprietà di adesione stesse attraverso la regolazione della tensione superficiale. La contrazione del citoscheletro viene regolata attraverso le dinamiche dell'acto-miosina e attraverso l'accoppiamento del cortex con siti di adesione cellula-cellula o cellula-ECM (si veda il par. 1.2), interdipendenti fra loro: la formazione delle adesioni cellula-cellula o cellula-ECM infatti dipende dalle forze meccaniche esercitate sul citoscheletro, i cui microtubuli connettono le giunzioni cellulari e potenziano le capacità di adesione. Nel caso dell'adesione cellula-cellula, ad esempio, la polimerizzazione dell'actina a livello locale e le proprietà meccaniche di contrazione portano alla fusione di adesioni puntuali in una fascia unica caratteristica delle giunzioni aderenti. Analogamente si verifica per le giunzioni cellula-ECM, attraverso il reclutamento di proteine di scaffold⁶. Questi processi di regolazione di adesione hanno influenza diretta sulla tensione superficiale, che può variare a seconda del processo sottostante e portare a diversi tipi di organizzazione cellulare: di fatto in base alle diverse intensità di adesione, contrastate dalla pressione osmotica di espansione e dalla contrattilità del citoscheletro, le cellule arrivano ad

⁵Nella fisica dei solidi, le superfici devono essere energeticamente meno favorevoli rispetto al raccoglimento massivo di un materiale (le molecole sulla superficie hanno più energia rispetto alle molecole della massa del materiale), altrimenti la formazione di superfici sarebbe favorita rispetto alla formazione di volumi concentrati, eliminando così la massa stessa del materiale. [2]

⁶Proteine che radunano molecole differenti appartenenti alle stesse vie di segnalazione. [18]

occupare spazi e volumi differenti, acquisendo proprietà fisiche e funzioni altrettanto differenti. Questi meccanismi stanno alla base della geometria di impacchettamento del disco immaginale ⁷ dell'ala di *Drosophila*, o dell'organizzazione cellulare del suo occhio per quanto riguarda la disposizione dei pigmenti e dei coni, sia per le specie selvatiche che per quelle mutanti. Nonostante sia ancora argomento di dibattito se la tensione superficiale sia determinata principalmente da meccanismi di adesione piuttosto che di contrazione, in alcuni casi la sola adesione è sufficiente a spiegare la riorganizzazione cellulare - come nel caso dei coni della *Drosophila Ommatidia*.

C'è da sottolineare però che l'idea che le forze di contrazione siano preponderanti rispetto a quelle di adesione proviene dagli studi di Holfreter e Steinberg: il primo osservò che il modo in cui le cellule di ectoderma inglobavano quelle di neuroectoderma ricordava il processo di invaginazione nella formazione del tubo neurale; il secondo dagli studi sulla riorganizzazione cellulare in presenza di Citocalasina B concluse che le forze interne alla cellula fossero rilevanti per la riorganizzazione dei tessuti. La questione è stata risolta da studi più recenti: gli embrioni del *Danio Zebrafish* presentano il comportamento opposto rispetto a quello dei coni della *Drosophila Ommatidia*, dove le cellule dissociate dai tre strati germinali si organizzano più sulla base delle forze di contrazione rispetto a quelle di adesione, portando l'ectoderma a differenziarsi partendo dall'interno. Lavori successivi hanno poi portato a ipotizzare che l'adesione, più che un meccanismo di innesco per la differenziazione, abbia il ruolo di mantenere una differenziazione già innescata - lasciando invece la contrattilità corticale a regolare il livello di tensione superficiale. Bisogna rimarcare il fatto che l'adesione fra tessuti adiacenti e quella intercellulare o cellula-ECM possa essere più significativa di quanto mostrato dagli studi sopracitati. Ad esempio, nel caso *in vitro* della gastrulazione dell'ectoderma, nonostante la riorganizzazione avvenga dall'interno, l'ectoderma rimane sulla superficie più esterna dell'embrione o grazie alle interazioni degli strati germinali con quello avvolgente e il sacco vitellino (andando a coinvolgere i meccanismi di adesione cellula-cellula), o per via dei moti di massa cellulare che regolano i precursori del mesoderma⁸ (andando a coinvolgere le adesioni cellula-ECM).

1.4 La Riorganizzazione Cellulare nella Fase di Sviluppo

I meccanismi di organizzazione cellulare descritti nel paragrafo precedente, compresi quelli antecedenti la differenziazione, giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo di un organismo. Nella blastocisti⁹ dei topi, ad esempio, le cellule dell'epiblasto e le future cellule dell'endoderma si collocano inizialmente in posizioni casuali ma comunque riunite in gruppi distinti. Si pensa che questa fase iniziale abbia un ruolo importante nella determinazione del destino cellulare, in quanto stabilisce le posizioni dei raggruppamenti cellulari all'interno del gradiente di segnalazione in formazione. Poiché le cellule sviluppano funzioni diverse, si ritiene che siano le differenze fra le CAM a mantenerle separate una volta differenziate: dopo la stratificazione

⁷Struttura quiescente dello stadio larvale da cui hanno origine gli organi. [4]

⁸Strato intermedio dei foglietti embrionali: ectoderma, mesoderma ed endoderma. [20]

⁹La blastocisti è un embrione allo stadio di sviluppo di 1 settimana c.a. [17]

del mesoderma e dell'endoderma durante la gastrulazione, infatti, sono le differenze di tensione superficiale a evitare il rimescolamento dei tessuti. A loro volta, come già anticipato nel paragrafo precedente, queste differenze di tensione superficiale sono dettate dalla presenza di vie di segnalazione: nel caso dell'embrione del *Danio Zabrato*, ad esempio, l'epibolia¹⁰ richiede Caderina-E e relativi regolatori di endocitosi¹¹ (come le vie EGF), la cui concentrazione può determinare il comportamento cellulare. Da ciò si evince anche che i raggruppamenti iniziali di cellule prima della formazione dei tessuti (come nella blastocisti dei topi) o i loro movimenti (come nel caso dell'epibolia del *Danio Zabrato*) abbiano una funzione nel guidare o mantenere le strutture formatesi durante la gastrulazione. Infine l'organizzazione cellulare è importante nella polarizzazione dei tessuti rispetto gli assi embrionali: alcuni studi sullo sviluppo dei pulcini hanno mostrato come la formazione degli arti (vincolata dal riferimento agli assi embrionali) parta da un processo di segregazione dal mesoderma somatopleurico¹², innescato dalla segnalazione di FGF¹³ - riconfermando l'importanza delle vie di segnalazione nei meccanismi cellulari. Anche il disco immaginale dell'ala della *Drosophila* è una struttura polarizzata rispetto l'asse anteriore-posteriore e l'asse dorsale-ventrale e richiede una precisa organizzazione cellulare, influenzata dalla segnalazione di Dpp (con funzioni analoghe a quelle di BMP) e di Notch - essenziali alla formazione e al mantenimento dei margini dei tessuti. Un processo simile sembra avvenire per la formazione dei somiti nello sviluppo dei vertebrati, che danno luogo allo scheletro, ai muscoli scheletrici e a parte dei placodi del derma. Altri processi che molto probabilmente contribuiscono alla riorganizzazione cellulare *in vivo* oltre alle vie di segnalazione sono la chemotassi, i differenti tassi di migrazione e l'attrazione (o repulsione) intercellulare. Un esempio di chemotassi è dato dalla formazione del tubo neurale dei vertebrati, per cui si formano domini ben definiti lungo l'asse dorsale-ventrale in seguito alla concentrazione di SHH secreto dalla notocorda. Processi simili avvengono per la formazione dei follicoli piliferi, le striature di melanina dei pesci e la retina della *Drosophila*. Quest'ultima effettivamente è costituita da sequenze di ommatidi¹⁴ impacchettate esagonalmente, ognuna formata da 20 cellule disposte in una maniera precisa e ben definita, secondo la concentrazione di segnale proveniente dal *solco morfogenetico*, un'indentazione del disco immaginale che demarca i foto-ricettori in formazione dalle cellule ancora indifferenziate. In modo analogo studi recenti sui modelli di pigmentazione del *Danio Zabrato* mostrano come la suddivisione a strisce, determinata dalla depolarizzazione di melanofori e xantofori, contribuisce all'ordinamento secondo un processo simile a quello proposto da Turing. Infine, nel caso dei follicoli piliferi sono meccanismi regolatori di Caderina-E e P a iniziare la formazione, anche se ancora non è ben noto se è la riduzione di Caderina-E e il corrispettivo aumento di Caderina-P ad essere rilevante per il processo.

¹⁰Un movimento cellulare della gastrulazione dove uno strato cellulare più esterno si ripiega verso l'interno fino ad avvolgere tutta la superficie interna. [22]

¹¹Processo in seguito al quale la cellula assorbe molecole dall'ambiente extracellulare nella membrana plasmatica. [15]

¹²Lamina che costituisce lo strato ventrale del mesoderma. [16]

¹³Fattore di crescita dei fibroblasti che influenza sia la tensione superficiale che la proliferazione.

[5]

¹⁴Unità elementare degli occhi composti. [11]

1.5 Polarità Planare

Se è vero che la formazione di periodicità è strettamente correlata ai meccanismi di organizzazione cellulare citati nel paragrafo precedente, è anche vero che vi sono altri processi in gioco che possono influire sul pattern - quali ad esempio fenomeni di polarizzazione. Le cellule costituenti i tessuti infatti, causa adesioni locali, sono spesso polarizzate sia l'una rispetto alle altre che rispetto agli assi embrionali. L'importanza di questa polarità, detta planare, risiede nel fatto che permette la trasmissione di informazioni a lunghe distanze (anche in relazione alla presenza di gradienti di segnalazione o gradienti meccanici) attraverso contatti locali. In questo caso specifico si parla di vie di PCP (Polarità Cellulare Planare), comuni ad esseri umani e insetti e innescate da meccanismi cellulari quali contrazione e adesione (dovute principalmente ai comportamenti dell'actina e della miosina).

Studi sulla *Drosophila* e sui vertebrati hanno evidenziato come la conservazione della via di segnalazione PCP¹⁵ sia un fattore comune nella formazione delle periodicità, senza tuttavia aver portato a risultati definitivi. Ciò che si sa è che il meccanismo di polarizzazione si basa sullo stabilire i tre assi coordinati e che i tipi di polarità possono essere due: apicale-basale per quanto riguarda la determinazione dell'asse z - che determina la distinzione fra lume¹⁶ e membrana basale¹⁷; planare per quanto riguarda il piano x-y dove vivono le asimmetrie degli strati epiteliali bidimensionali. Nel caso della *Drosophila* il fenomeno di polarità planare è evidente nella distribuzione dei tricomi su ali e addome, dove i peli sono direzionati verso l'esterno rispetto all'asse centrale del corpo. Per analizzare il modo in cui la via di segnalazione PCP influenza le proprietà fisiche cellulari possiamo riconsiderare gli esempi fatti nel paragrafo precedente. Durante la formazione della retina della *Drosophila* i precursori ommatidiali subiscono una rotazione di 90 gradi per stabilire l'asimmetria rispetto all'asse dorsale-ventrale. Il processo causa un rimodellamento delle adesioni cellula-cellula (nonché delle proprietà di contrazione) e dipende sia dall'espressione di Caderina-E che dall'attività della miosina-II. Eventuali problemi di rotazione ommatidiale sono una caratteristica dei mutanti delle PCP, in cui gli ommatidi sono orientati in modo casuale: ciò manifesta l'importanza della PCP per una più precisa regolazione sia dell'adesione che della contrattilità, in quanto la regolazione dei meccanismi cellulari è strettamente vincolata all'attività di polarizzazione rispetto gli assi embrionali. Ciononostante, *come* le vie PCP regolino queste dinamiche cellulari rimane un mistero. Per quanto riguarda le ali della *Drosophila*, le componenti costituite da actina si orientano rispetto l'asse anteriore-posteriore per direzionare propriamente i flussi d'aria: le vie PCP specificano sia il numero che la posizione dei peli e una carenza di segnalazione potrebbe portare ad un loro disorientamento. Fra le segnalazioni importanti per la morfologia dell'ala c'è anche il ROCK (prodotto finale delle DSH), che regola solo il numero di peli ma non il loro orientamento: una sua carenza implica un eccesso, mentre una sua sovrabbondanza ne determina una riduzione.

¹⁵La PCP regola a livello locale l'attività dell'actina, la contrattilità dipendente dalla miosina-II e la capacità di adesione cellulare. [14]

¹⁶In biologia sinonimo di cavità

¹⁷Strato di ECM di contatto fra un tessuto connettivale e uno non connettivale adibito alla trasmissione dei segnali. [13]

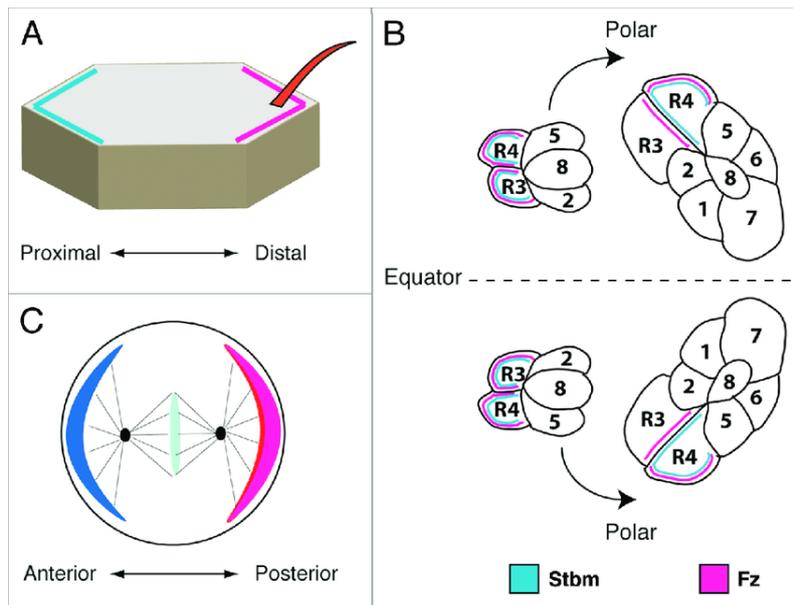


Figura 1.5: Distribuzione asimmetrica di proteine PCP. (A) Nell'ala di *Drosophila* i sotto-raggruppamenti antagonisti si dispongono come segue: sulla superficie distale Fz, Dsh e Dgo si oppongono all'attività di Pk; mentre Pk e Stbm sulla superficie prossimale antagonizzano le Dsh. (B) L'immagine raffigura i 5 sotto-raggruppamenti da cui parte la formazione del disco immaginale dell'occhio: prima di eseguire la rotazione Fz e Stbm sono distribuite equamente nel gruppo R3 e R4, in seguito alla rotazione la distribuzione di queste proteine risulta asimmetrica, come si può vedere dalle concentrazioni espresse in rosa (Fz) e in blu (Stbm). (C) Nelle cellule SOP (precursori degli organi sensoriali) per la futura peluria dell'insetto, le Fz si concentrano sulla membrana posteriore, mentre le Stbm su quella anteriore. Immagine presa da: *Planar Cell Polarity in Drosophila* di Saw Myat Thanda W. Maung e Andreas Jenny.

Infine, l'orientamento dei peli dei mammiferi in cui interi follicoli piliferi (piuttosto che i peli a base di actina nella *Drosophila*) sono globalmente angolati lungo l'asse anteriore-posteriore, dipende in modo simile dall'attività delle proteine PCP.

Altri effettori noti della PCP sembrano invece regolare la differenziazione e il ciclo dei follicoli ma non il loro orientamento. Fuzzy, un effettore che probabilmente proviene dall'attività delle Dsh nell'ala di *Drosophila* per esempio, regola la differenziazione del follicolo pilifero attraverso la formazione delle ciglia primarie e la segnalazione di SHH. I regolatori del citoscheletro come Rac1 e Cdc42, invece, sono necessari per l'integrità del follicolo e la differenziazione delle cellule epidermiche rispetto la posizione del bulbo. Non è ancora chiaro come tutti questi meccanismi siano però collegati esplicitamente alla PCP, se non che i suoi diversi ruoli nella fase dello sviluppo potrebbero essere un punto chiave per studiare la regolazione del citoscheletro, che a livello cellulare gioca un ruolo fondamentale per le dinamiche di adesione locali.

Capitolo 2

Approccio Matematico alle Diverse Cause di Periodicità

La periodicità nei tessuti biologici la maggior parte delle volte si manifesta sotto forma di strisce o macchie di diverse dimensioni. Fra gli esempi più tipici vi sono i follicoli piliferi nell'epidermide del topo, alcuni pattern nella pelliccia di animali e la formazione di dita durante la condrogenesi¹⁸ degli arti. I meccanismi alla base del patterning sono diversi e non sempre ricollegabili ad un modello di reazione-diffusione. Ad esempio, nel caso della *Drosophila* è l'espressione del *pair-rule gene* nell'embrione a determinare la pigmentazione a strisce caratteristica. Un altro modello di generazione periodica a strisce può essere il modello *clock and wavefront*. Ancora, per studiare la formazione dei fotoricettori dell'occhio della *Drosophila* può essere utilizzato il modello *Template Switch*. Tuttavia non è di nostro interesse analizzare questi modelli, quanto più approfondire il modello matematico di reazione-diffusione già descritto nel capitolo precedente, andando a vedere come la soluzione di tale modello permetta di determinare le cause sottostanti il fenomeno di patterning periodico. Di fatto alcuni pattern di tessuti biologici presentano delle biforcazioni fra le strisce o le chiazze, portando a pensare che queste non siano entità distinte e indipendenti le une dalle altre come teorizzato dai modelli alternativi sopracitati, ma piuttosto correlate fra loro e allo spazio ivi immerse. Il modello di Turing cerca proprio questa dipendenza e si rivela utile nello studio delle biforcazioni riscontrate nello *Pterophyllum*, nel già citato *Danio Zebrato* o nelle creste palatine. In ogni caso il modello di diffusione molecolare non è l'unico in grado di generare pattern. Anche i meccanismi cellulari o quelli fondati sull'instabilità meccanica dei tessuti possono innescare periodicità. Evidenze sperimentali hanno messo in risalto questi meccanismi alternativi soprattutto per quanto riguarda la formazione di pattern *in vivo*, come nel caso del *Danio Zebrato* - dove giocano un ruolo di primo piano i processi cellulari; o i villi intestinali - generati da fenomeni prettamente meccanici. Bisogna allora chiedersi se fissata una certa periodicità sia possibile determinarne la causa scatenante (diffusione molecolare, cellulare o meccanica). Avvalendoci di un'equazione differenziale in grado di descrivere aprioristicamente la periodicità data, lo scopo è quello di analizzare la soluzione di tale equazione e risalire - come verrà descritto più dettagliatamente in seguito - al fenomeno scatenante. Va però specificato che progettare esperimenti ad hoc può rivelarsi difficile, in quanto alla

¹⁸Formazione di tessuto cartilagineo

base di un dato patterning possono esserci diverse concause (e dunque interdipendenza fra i diversi meccanismi) o differenti meccanismi possono dare origine alla medesima periodicità. Il modello matematico proposto generalizza la formazione di pattern simili e dimostra come questi possano dare origine alla stessa periodicità, oltre a fornire degli strumenti per una più facile lettura dei risultati sperimentali. Ci sono poi due tipi di approccio sperimentale:

- cercare di classificare il meccanismo (molecolare, cellulare, meccanico) data una periodicità sfruttando il modello matematico
- innescare precisamente un dato meccanismo e verificare che generi una periodicità ipotizzata *a priori*

Va da sé che il modello proposto si basa su descrizioni semplificate di ciò che si verifica a livello biologico e che dunque il corretto approccio sia quello di verificare sperimentalmente la conformità fra la teoria e la pratica. Tuttavia può rivelarsi uno strumento utile ad una più veloce interpretazione dei dati e può facilitare la progettazione degli esperimenti stessi.

2.1 Meccanismi di Patterning nei Sistemi Biologici

Diversi studi confermano che alla base di molti pattern vi sia una caratteristica in comune, già anticipata nel primo capitolo: *attivazione a livello locale, inibizione a lungo raggio*. L'attivazione a livello locale genera un'area ad elevata densità, mentre l'inibizione a lungo raggio garantisce che le diverse aree di attivazione siano intervallate da aree a bassa densità, il tutto con una periodicità ben definita. Queste zone a diversa intensità possono essere innescate sia da processi di diffusione molecolare, sia da processi cellulari, sia da processi meccanici.

2.1.1 Processi Molecolari

Il meccanismo di Turing si basa sull'interazione fra due molecole con tassi di diffusione diversi e in grado di generare spontaneamente il fenomeno del pattern periodico (Turing, 1952). Questo innesco spontaneo è dato dal fatto che in alcuni sistemi biologici lo stato di omogeneità rappresenta un'instabilità, in quanto una piccolissima deviazione dall'omogeneità stessa è sufficiente a far partire le interazioni fra attivatore e inibitore (Turing, 1952). Vi sono però delle varianti, come modelli di interazione fra più di due molecole o modelli che tengono conto di una logica di interazione diversa come nel caso del modello di Gierer-Meinhardt (1972), dove non basta una semplice differenza nel tasso di diffusione a innescare l'interazione fra le due molecole ma è necessaria la presenza di un processo di auto-catalisi a livello locale e poi l'inibizione sulle lunghe distanze. Alcuni esempi di coppie di attivatori/inibitori sono le proteine di segnalazione Nodal/Lefty per determinare l'assimetria destro-sinistra degli organi durante lo sviluppo, le Wnt/Dkk o Eda/BMP per la distribuzione dei follicoli piliferi e le Wnt/BMP per la formazione delle dita negli arti di topo.

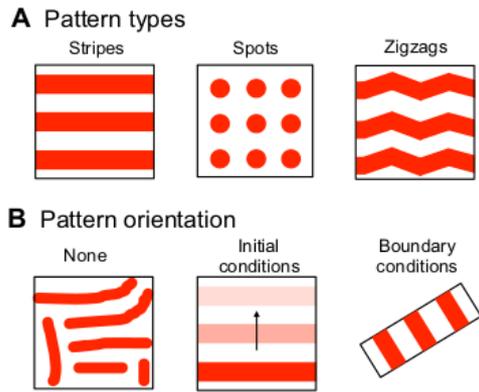


Figura 2.1: Meccanismi diversi possono sottostare sotto la stessa formazione di pattern. (A) Strisce, macchie e zigzag. (B) Le strisce possono essere orientate randomicamente (pattern labirintico) o il loro orientamento può essere determinato da condizioni iniziali e/o al contorno. Immagine di Tom W. Hiscock e Sean G. Megason (Mathematically guided approaches to distinguish models of periodic patterning)

2.1.2 Processi Cellulari

Un esempio di meccanismo alternativo a quello di diffusione è dato dal caso del *Danio Zebtrato*: la fantasia a strisce tipica di questo pesce è dovuta alla mutua interazione fra le cellule dei pigmenti, che si traduce in una migrazione direzionata. La differenza con il modello di Turing in questo caso specifico è proprio la direzionalità: se nel caso di una diffusione molecolare non c'è direzione preferenziale, nel caso del *Danio Zebtrato* le cellule possono essere attratte o respinte da quelle vicine ampliando così le possibilità di formazione di pattern. Un secondo meccanismo di natura cellulare statico prevede che la comunicazione intracellulare a corto raggio avvenga per adesione mentre le informazioni sul lungo raggio si trasmettano grazie alle protrusioni cellulari.

2.1.3 Processi Meccanici

Infine, un terzo tipo di meccanismo che può dare origine al patterning dei tessuti è di natura prettamente meccanica: il tessuto può crescere in uno spazio confinato che lo sottopone ad una compressione e lo porta a sviluppare instabilità. L'effetto combinato della resistenza alla flessione e delle forze compressive esercitate sui margini del tessuto provoca la sua deformazione periodica, come accade per i villi intestinali la cui crescita vincolata porta lo strato epiteliale a ripiegarsi periodicamente e spontaneamente. L'instabilità meccanica poi può coinvolgere anche l'ECM in seguito ai moti migratori delle cellule, come dimostrato da alcuni studi in *in vitro*: la migrazione infatti esercita forze di trazione che portano l'ECM a contrarsi localmente (attivazione) in opposizione alla sua elasticità a lungo raggio (inibizione).

2.2 Meccanismi Diversi Possono Dare Origine a Pattern Simili *in Silico*

E qui arriviamo al cuore del problema: capire quale processo fra i tre citati precedentemente determini un dato fenomeno di patterning. Moltissimi pattern sono stati formalizzati da un modello di reazione-diffusione simile a quello di Turing, come quelli riportati in Fig.2.1. Ciononostante come già anticipato diversi processi possono essere alla base di un dato patterning. Il motivo sta nel fatto che il concetto generico di *attivazione locale e inibizione a lungo raggio* può essere comune a tanti

meccanismi, ognuno di essi generalizzabile dallo stesso modello matematico. Questo modello prevede che la periodicità possa essere innescata spontaneamente a partire da uno stato omogeneo (e dunque instabile) a patto che si verifichi un processo analogo a quello dell'attivazione locale e dell'inibizione sulle lunghe distanze. Inoltre la periodicità può manifestarsi in diverse forme - dalle strisce alle chiazze, a seconda del valore che i parametri del modello matematico assumono. Infine, in assenza di bias, l'orientamento del pattern può essere casuale o labirintico. C'è anche da specificare che la presenza stessa di condizioni al contorno può essere un bias per l'orientamento della periodicità: nel caso della pigmentazione del *Danio Zebrafish*, ad esempio, la prima striscia rappresenta la condizione iniziale per cui tutte le seguenti devono svilupparsi parallelamente ad essa. Bisogna aggiungere anche il fatto che le condizioni al contorno possono influenzare sia l'orientazione del pattern che la sua manifestazione fenotipica e possono determinare il motivo per cui alcuni animali presentano pellicce a chiazze e code a strisce ma non il contrario. Dal momento che queste caratteristiche fenotipiche sono comuni a diversi meccanismi non è possibile utilizzarle per determinare la causa scatenante e le similarità fra i pattern riscontrati *in vivo* e *in silico* non possono essere utilizzate per scremare le ipotesi. Come già detto prima un approccio matematico può facilitare la soluzione al problema ma non può essere la soluzione stessa: l'approccio sperimentale rimane di fondamentale importanza per la comprensione dei meccanismi che stanno alla base della formazione di periodicità. Qui di seguito verranno riportati sia il modello matematico sia i diversi approcci sperimentali che possono essere utilizzati per analizzare il fenomeno di patterning: quelli di categorizzazione di un meccanismo a partire da una periodicità già nota, quelli che mirano a confermare la presenza di un meccanismo (piuttosto che un altro) sottostante un'ipotizzata conseguente periodicità.

2.3 Classificazione dei Meccanismi

Un approccio alla classificazione del meccanismo consiste nel progettare esperimenti fondati su macro-categorie, ovvero analizzare il patterning senza ipotizzare *a priori* la causa scatenante. I progetti sperimentali sono basati sull'osservazione (a) e sulla perturbazione (b) della formazione del pattern. Alle volte la semplice osservazione può portare a scremare delle ipotesi: ad esempio nel caso in cui si noti una notevole migrazione cellulare in concomitanza con la formazione di periodicità, si può pensare ad un meccanismo cellulare. D'altro canto se la mera osservazione può indirizzare alla conferma di un'ipotesi, la perturbazione può aiutare invece ad escluderla: se intervenendo meccanicamente su un tessuto la formazione di patterning risulta inalterata, si può escludere una causa meccanica. Tuttavia alle volte (a) e (b) non bastano a raggiungere risultati significativi e si può dunque sfruttare il modello matematico e le simulazioni informatiche che permettono, al variare dei parametri, di prevedere la formazione di periodicità nonostante non si riesca sperimentalmente a ben definirne la causa. Cionondimeno la variazione dei parametri del modello matematico differisce da categoria a categoria e bisogna trovare un modo per introdurre delle condizioni iniziali.

2.3.1 Risposta alle Perturbazioni

Il primo approccio per introdurre delle condizioni iniziali al modello matematico è quello di identificare le perturbazioni che hanno un'influenza sulla formazione di pattern per un dato meccanismo, senza però influenzare gli altri. Partiamo dal modello molecolare sfruttando l'analisi dimensionale, sapendo che l'equazione finale che descrive la periodicità deve avere le dimensioni di una lunghezza. I parametri che possono fungere da condizioni iniziali saranno allora una *costante di diffusione* D (m^2/s), il *tempo di dimezzamento molecolare* τ (s) e la *reaction sensitivity* (adimensionale). Per definire un'equazione in grado di riprodurre la periodicità spaziale λ (m), è necessario per conseguenze dimensionali che $\lambda \propto (D\tau)^{1/2}$, che porta a comprendere che la variazione nel patterning dipenda da una variazione di D e τ . Questa previsione ovviamente è valida per tutti i processi di diffusione, anche se poi ogni processo sarà caratterizzato da una propria costante e da un'interazione fra un diverso tipo e/o numero di molecole. Ragionamenti analoghi si possono fare anche per i processi di natura cellulare e quelli di natura meccanica. Inoltre, andando a variare i parametri caratteristici di ogni singolo processo (simulando dunque una perturbazione sul sistema biologico) e osservando la variazione della formazione di pattern è possibile classificare in macro-categorie la causa sottostante. In tab 2.1 vengono forniti i parametri per i vari tipi di processo e le relative analisi dimensionali: i pedici A e I indicano rispettivamente l'attivatore e l'inibitore, mentre \mathbf{h} rappresenta la *reaction sensitivity*.

Meccanismi di Patterning	Analisi per λ	Parametri da Perturbare
Molecolare (Reazione-Diffusione)	$\lambda \sim (D_A\tau)^{1/2}f(D_I/D_A, \tau_I/\tau_A, \mathbf{h})$	D, τ
Cellulare (Migrazione)	$\lambda \sim (D_A\tau)^{1/2}f(\eta_I/\eta_A, \tau_I/\tau_A, \mathbf{h})$	η, τ
Cellulare (Adesione)	$\lambda \sim L_{protrusione}f(\mathbf{h})$	$L_{protrusione}$
Meccanico (Crescita Cellulare)	$h(E_{strato}/E)^{1/3}f(g)$	Spessore, Rigidità (del Tessuto)
Meccanico (Migrazione Cellulare)	$hf(\sigma_{tract.}/E, \nu)$	Spessore, Rigidità (del Tessuto)

Tabella 2.1: Qui sono riportati i parametri che influenzano la periodicità spaziale del patterning e che ne permettono la previsione, ottenuti grazie all'analisi dimensionale. $f(x, y)$ è una funzione ignota.

Perturbare le condizioni iniziali può risultare più semplice nelle sperimentazioni *in vitro*, prestando particolare attenzione all'ambiente extracellulare. Un modo per controllare tale ambiente passa per l'utilizzo di hydrogel che permettono di regolare la diffusività delle molecole, la mobilità di diversi tipi di cellule nonché le proprietà fisiche delle relative ECM. Qui di seguito verrà analizzato un esempio per la distinzione dei diversi meccanismi che possono sottostare la formazione di pattern periodici per lo sviluppo delle dita dei vertebrati.

La formazione delle dita negli arti dei vertebrati

Il patterning per la formazione degli arti dei vertebrati risulta dalla presenza di gradienti di morfogeni. Evidenze sperimentali recenti hanno portato alla luce come una semplice perturbazione possa però portare alla formazione di nuove e differenti

periodicità. I modelli di Turing sono in grado di riprodurre tali periodicità *in silico*, inclusi pattern presenti nei mutanti di topi. Fra le molecole candidate ad assumere la funzione di attivatore e inibitore vi sono rispettivamente le Wnt e le BMP: un modello matematico elaborato dal team di Raspopovic ha comprovato la teoria che un sistema di reazione-diffusione in cui reagiscono molecole Wnt-BMP sia responsabile della formazione di pattern per le dita. Le simulazioni informatiche prevedevano che la distanza fra le dita sarebbe aumentata nel caso di riduzione di Wnt e di inibizione di ricettori BMP e ciò è stato confermato dai risultati sperimentali. Nonostante un riscontro fra i risultati *in silico* e quelli *in vivo* porti a confermare la teoria molecolare, questi non escludono la possibilità di un processo cellulare - che può portare anch'esso alla formazione del pattern riscontrato *in silico*. Ad esempio un'altra ipotesi prevede che le perturbazioni sulle molecole Wnt/BMP alterino la motilità cellulare, come è stato poi verificato in diversi sistemi. La questione rimane aperta, tuttavia utilizzare l'analisi dimensionale per perturbare certi parametri e osservare le risposte del sistema, come già accennato precedentemente, può aiutare a scremare le ipotesi.

2.3.2 Dinamiche di Formazione

Anche se una qualsiasi interazione definita da un' *attivazione locale e un'inibizione a lungo raggio* può dar luogo alla formazione di pattern, è anche vero che cause diverse (molecolari, cellulari, meccaniche) portano a funzioni di periodicità differenti. I segnali molecolari vengono ammorbiditi gradualmente, mentre i processi cellulari che coinvolgono le protrusioni sono caratterizzati da una funzione ben definita e le forze meccaniche sono in grado di generare instabilità periodiche sulle lunghe distanze.

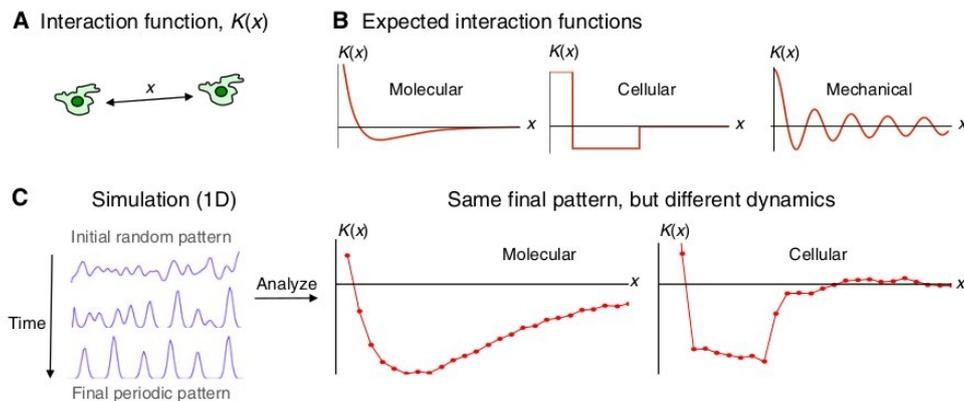


Figura 2.2: Dinamiche di formazione. La dinamica di interazione può essere utilizzata per risalire alle cause di patterning. (A) Una cellula risponde a quelle vicine in funzione della distanza e la risposta viene tradotta matematicamente con una funzione di interazione $K(x)$. L'interazione è tanto maggiore quanto minore è la distanza (*attivazione locale*) e tanto minore quanto maggiore è la distanza (*inibizione a lungo raggio*): per questo motivo la funzione è positiva per valori piccoli di x (dove x rappresenta il modulo della distanza) e negativa per valori grandi. (B) Le funzioni di interazione attese per meccanismi diversi (molecolare, cellulare, meccanico) assumono forme diverse. (C) Simulazione di formazione di patterning: a sx il processo è molecolare, a dx il processo è cellulare. Per dettagli più approfonditi sulla funzione di interazione si rimanda al Cap.3 e 4. Immagine di Tom W. Hiscock e Sean G. Megason (Mathematically guided approaches to distinguish models of periodic patterning)

Ricavando la funzione di interazione è possibile risalire al tipo di processo. Più nello specifico, ogni funzione che descrive una macro-categoria di meccanismi dipenderà da parametri differenti - elencati in Tab.2.1, che permette di descrivere interazioni di *attività locale e inibizione a lungo raggio* senza tuttavia conoscere altre componenti specifiche del sistema. Ciononostante c'è una limitazione: senza misurare o perturbare i parametri di cui sopra, la classificazione del processo dipende qualitativamente dal confronto fra i risultati ottenuti dalla simulazione con una funzione di interazione attesa e dunque la risposta non è definitiva. Trovare invece la funzione di interazione di un processo già noto può invece aiutare a confermare un'ipotesi, come nel caso della pigmentazione del *Danio Zebtrato*.

Pigmentazione del Danio Zebtrato

I mutanti genetici del *Danio Zebtrato* presentano moltissime varietà nella pigmentazione della pelle, alcune delle quali si possono notare in Fig.2.3. Moltissime fantasie periodiche di questo pesce sono state riprodotte con successo dalle simulazioni di modelli reazione-diffusione. Tuttavia evidenze sperimentali recenti sembrano indicare che le cause scatenanti non siano molecolari, quanto più legate a dinamiche cellulari. Infatti la rimozione di alcuni tipi di cellule ¹⁹, avvenuta attraverso mutanti genetici o ablazione laser (distruzione di un tessuto con laser), ha portato a scoprire che la pigmentazione potrebbe essere dovuta ai meccanismi di adesione cellulare - comunque consistenti con il modello di *attivazione locale e inibizione a lungo raggio*. Sicuramente in questi meccanismi un ruolo essenziale lo hanno i movimenti cellulari direzionati, che sono determinanti per la formazione di patterning negli stadi giovanili e in quelli di rigenerazione.

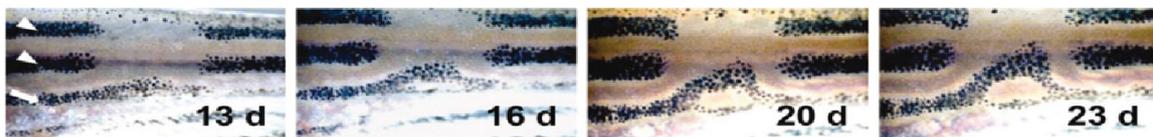


Figura 2.3: Rigenerazione di pigmentazione. I movimenti cellulari sono importanti nel meccanismo di rigenerazione di pattern: in seguito all'ablazione laser di alcuni melanofori nella regione centrale, le cellule migrano nella zona ablata per ricostruire la pigmentazione. La lettera **d** indica i giorni dopo l'ablazione. Immagine di Yamaguchi et al. (2007).

Ci si pone ora la questione di capire quali tipi di segnale orientino i movimenti cellulari: la prima ipotesi si fonda sulla segnalazione Delta-Notch, attraverso contatto diretto o protrusioni per controllare i movimenti di cellule vicine. Un'altra ipotesi prevede un tipo di segnale molecolare (ancora non conosciuto) che guida i movimenti cellulari; un'altra ancora si basa sulle instabilità meccaniche che agiscono sulle ECM influenzando i moti cellulari. Tutte queste ipotesi possono essere varate utilizzando simulazioni informatiche - come nel caso del processo di rigenerazione, o usando modelli *in vitro*. Più nello specifico, studiando la dinamica del sistema è possibile determinare come queste interagiscano le une con le altre (si rimanda

¹⁹nello specifico: melanofori, xantofori e iridofori. I cromatofori sono le cellule adibite alla pigmentazione dell'organismo. [3]: i melanofori contengono pigmenti scuri (neri o marroni), gli xantofori contengono pigmento giallo e gli iridofori determinano l'iridescenza.

a Fig.2.2.). Nella pratica però risulta difficile isolare coppie di cellule per analizzarne l'interazione: è per questo motivo che risulta necessaria l'implementazione di un algoritmo in grado di tener conto delle diverse interazioni all'interno di sistemi costituiti da molte cellule (per l'algoritmo si rimanda al Cap.3). Se l'interazione risulta forte solo sul corto raggio allora è molto probabile che il pattern dipenda da contatti cellula-cellula; d'altro canto se l'intensità di interazione risulta consistente anche sulle lunghe distanze si può allora classificare il processo come molecolare, cellulare o meccanico.



Figura 2.4: Esempi di *Danio Zebrafish* A sx. Autore: Lynn Ketchum, Copyright: © 2012 Oregon State University; A dx. Autore: Simon Colmer, Copyright: Simon Colmer (immagine presa da Google Immagini)

2.4 Conferme di Ipotesi *A Priori*

L'approccio più corretto sarebbe quello di sfruttare il modello matematico per confermare un'ipotesi *a priori*. Solitamente si parte dallo studio di mutanti con patterning anomali, o si analizzano le espressioni di particolari geni (o le posizioni di particolari cellule) e la loro evoluzione nel tempo. In questo modo è possibile fare ipotesi e determinare i parametri necessari a descrivere la funzione di interazione, tuttavia sono poi necessari esperimenti per verificare la teoria di partenza. Nei paragrafi seguenti verranno riportati alcuni esempi di esperimenti in grado di aiutare a determinare i meccanismi sottostanti i processi di formazione di periodicità.

2.4.1 Vincoli Dei Parametri

Vi sono diversi meccanismi di patterning che sono stati simulati da modelli matematici. Come già anticipato il modello matematico non permette di trovare una soluzione definitiva, tuttavia si possono fare predizioni quantitative ammesso che siano noti i parametri rilevanti alla descrizione del sistema. Un primo problema è che per definire le caratteristiche dei pattern periodici è necessaria l'introduzione di parametri non lineari. Un esempio di non-linearità è dato dal modello di reazione-diffusione molecolare. Prevedere con accuratezza la formazione di pattern *in silico* richiederebbe una conoscenza quantitativa di queste interazioni non lineari, incluse

curve dose-risposta²⁰ in relazione alle concentrazioni molecolari, per cui l'alternativa migliore è quella di *ipotizzare* il loro valore quantitativo. Dal momento che la scelta arbitraria delle non-linearità potrebbe influire sulla simulazione e rendere difficile contraddire un'ipotesi piuttosto che un'altra, bisogna trovare un modo per rendere queste non-linearità poco influenti per il modello matematico. Generalmente la capacità di un meccanismo di generare periodicità è una caratteristica facilmente prevedibile anche senza caratterizzare quantitativamente le non-linearità, tuttavia bisogna imporre delle condizioni al contorno affinché il processo possa avvenire per formare il pattern. Alcuni vincoli possono essere scelti in modo tale da non dipendere dalle non-linearità, altri in modo tale da inglobare le non-linearità stesse in un unico parametro più facile da misurare rispetto le non-linearità stesse: tale parametro prende il nome di *sensitivity*. Invece che misurare l'intera curva di risposta al segnale, la *sensitivity* parametrizza la variazione percentuale del tasso di produzione di una specie chimica all'aumentare percentuale della concentrazione dell'altra. La *sensitivity* viene misurata osservando le variazioni in uscita corrispondenti alla variazione di un singolo parametro in entrata. Utilizzandola è possibile scremare ipotesi misurando i valori dei parametri relativi a un dato meccanismo e vedere se la variazione rispetta le condizioni iniziali imposte. Se la variazione comporta un mancato rispetto dei vincoli imposti sui parametri stessi ciò porta a rivedere la teoria. Inoltre il progresso sperimentale recente ha portato ad una maggiore accuratezza nella rivelazione di parametri quali costanti di diffusione, tassi di degradazione molecolare e proprietà dei materiali con le relative *sensitivity* anche *in vivo*. Qui di seguito verrà riportato l'esempio dei follicoli piliferi nei mammiferi: gli studi sui topi più recenti hanno utilizzato il modello di reazione-diffusione per descrivere un processo molecolare in cui le Wnt e le Dkk fungono rispettivamente da attivatore e inibitore. Il meccanismo proposto da Sick et al. (2006) su tale modello ha mostrato come la densità dei follicoli venga ridotta in seguito ad un incremento delle Dkk, mentre le segnalazioni Wnt sono condizione necessaria e sufficiente alla produzione di follicoli. Ciò però non basta a definire sistemi di Wnt/Dkk come causa scatenante del pattern di follicoli, in quanto potrebbero essere conseguenza di altri processi o agire in concomitanza con altri meccanismi. Quello che si può verificare è che le molecole scelte come attivatori o inibitori rispettino alcuni vincoli che garantiscano l'*attivazione locale e l'inibizione a lungo raggio*. Per quanto riguarda il caso della coppia Wnt/Dkk, si può studiare la *sensitivity* di auto-attivazione delle Wnt: questa deve assumere un valore >1 all'aumentare percentuale di Wnt, se ciò non accade non si può assistere alla formazione di pattern e il sistema Wnt/Dkk si rivelerebbe inadeguato e bisognerebbe trovare altre coppie di attivatori/inibitori come Eda/BMP o perfino ipotizzare diversi processi scatenanti la periodicità. Un altro esempio è dato dall'esperimento condotto da Müller et al. (2012): i coefficienti di diffusione Nodal/Lefty hanno mostrato che $D_{\text{Nodal}} < D_{\text{Lefty}}$ negli embrioni di *Danio Zebrafish*, che si sono quindi dimostrati essere buoni candidati per la coppia di attivatore-inibitore nella determinazione di asimmetrie degli organi nel pesce.

²⁰La curva che descrive l'intensità di risposta di un organismo all'esposizione (o dose) di uno stimolo o di un agente stressante chimico prolungata nel tempo.[6]

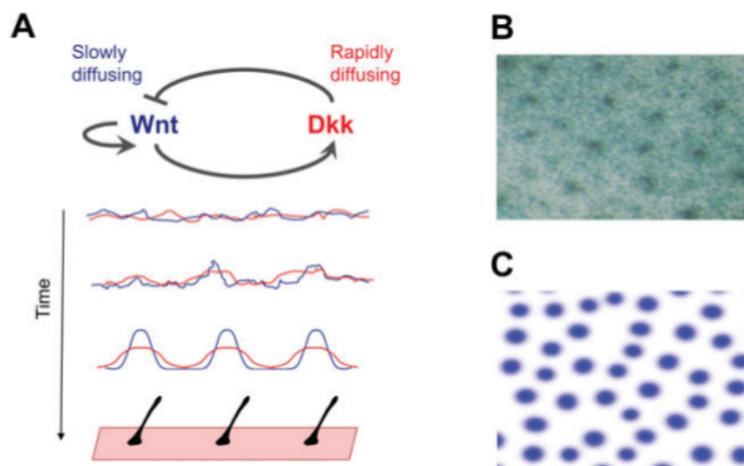


Figura 2.5: Schema del follicolo pilifero mediante un sistema di reazione-diffusione. (A) Reazione-diffusione per una coppia di presunti attivatore/inibitore: Wnt/Dkk. Nel tempo, le fluttuazioni di concentrazioni di Wnt/Dkk sono amplificate dall'attivazione locale e l'inibizione a lungo raggio finché non si innesca la periodicità caratteristica (ovvero il profilo di concentrazione non ha picchi regolarmente distanziati) (Meinhardt e Gierer, 2000). Questi picchi definiscono la posizione dei futuri follicoli piliferi. (B) Modello in vivo dei follicoli piliferi murini. La colorazione blu mostra un gene reporter Wnt che segna la posizione dei follicoli piliferi. (C) Simulazione di follicoli piliferi. (B,C) (Riprodotta con il permesso di Sick et al. (2006)).

2.4.2 Risposta alle Perturbazioni

Oltre a classificare i processi di patterning in relazione alle condizioni al contorno si può agire sulle componenti del sistema per vedere come questo risponde a eventuali perturbazioni: ad esempio, se variando una componente la periodicità rimane inalterata, allora questa può essere esclusa per la descrizione del processo di patterning, andando eventualmente ad eliminare alcune ipotesi. Cionondimeno, se la variazione di una componente ha effetti sulla periodicità, l'interpretazione del dato può risultare controversa. In primo luogo molte perturbazioni applicate ai pattern periodici vanno a influire su termini non lineari, come nel caso molecolare in cui la perturbazione può comportare un'alterazione della curva di risposta citata precedentemente. Come anticipato interpretare o misurare le non-linearità può rivelarsi difficile e bisogna capire come l'alterazione della non-linearità vada ad agire sulla formazione del pattern. In secondo luogo è difficile stabilire *a priori* come e quanto queste non-linearità vadano ad influenzare la struttura finale. Per risolvere il problema ci si può avvalere dell'analisi dimensionale (Tab.2.1) che ha portato a formalizzare un modello indipendente dalle non-linearità, come ad esempio nel caso $\lambda \propto (D_a \tau)^{1/2}$, dove la singola interazione fra due molecole (non lineare) non è rilevante alla descrizione del fenomeno di patterning. Di conseguenza basta osservare se ad un incremento delle costanti di diffusione si assiste ad un incremento della lunghezza d'onda che descrive il pattern per verificare la bontà di un sistema di reazione-diffusione: di fatto le perturbazioni sui parametri modificano la scala caratteristica del pattern. Le costanti di diffusione molecolare possono essere perturbate aggiungendo modulatori di diffusione extra-cellulari o attraverso l'uso di fusion tag²¹. Un

²¹fusione di una piccola proteina o di un peptide ad una proteina di interesse. [23]

altro problema di natura sperimentale, per quanto riguarda i sistemi biologici, è che il pattern può essere innescato da diverse concause motivo per cui una singola perturbazione potrebbe influire su più componenti del sistema. In aggiunta, in un sistema biologico complesso, queste perturbazioni possono portare a pleiotropia su altri parametri oltre che la molecola direttamente perturbata. Bisogna poi considerare che diversi meccanismi rientrano nella categoria *attivazione locale e inibizione a lungo raggio*, per cui la stessa variazione di pattern si può assistere in concomitanza della variazione di diversi parametri sottostanti: ad esempio, un cambio da strisce a chiazze nella pigmentazione potrebbe essere dovuta sia a processi di diffusione molecolare sia a processi meccanici. Pertanto è difficile stabilire se il cambio fenotipico è dovuto al diretto effetto della perturbazione o conseguenza indiretta di un effetto pleiotropico - rendendo dunque difficile stabilire se vi sono meccanismi diversi dalla diffusione concomitanti alla periodicità innescata piuttosto che il singolo processo molecolare. Un modo per superare questa difficoltà è quello di progettare perturbazioni mirate a componenti specifiche del sistema. Un altro approccio invece potrebbe essere quello di utilizzare l'analisi dimensionale, studiando come la scala di patterning varia al variare dei parametri del sistema: analizzare la variazione di scala del pattern permette di risalire alle cause indipendentemente dai valori che assumeranno i parametri singolarmente, ciò permettendo di testare le ipotesi eludendo i problemi sopra elencati. Come sfruttare l'analisi dimensionale? Ad esempio in un sistema reazione-diffusione $\lambda \propto D^{1/2}$, dunque l'osservazione di un esponente di scala $k=1/2$ nella funzione che descrive il pattern conduce ad avvalorare l'ipotesi di un processo di diffusione. Se al contrario ciò non si verifica, le possibili problematiche sono due: il meccanismo è di natura molecolare ma il trasporto non è prettamente diffusivo (come accade nel caso di avvezione) o la variazione del pattern è irregolare per via di effetti indiretti della perturbazione sull'ECM o sulla motilità cellulare, dinamiche che dovrebbero essere oggetto di ulteriore approfondimento.

Capitolo 3

Modello per il Caso Molecolare

Come già ripreso più volte lo scopo della trattazione è quello di elaborare un algoritmo informatico in grado di confermare teorie *a priori* sulla formazione di pattern periodici o al più capace di predirne i comportamenti - tuttavia ben consci del fatto che tale modello *non* è sufficiente a comprendere *in toto* il fenomeno della formazione di periodicità. Tra i diversi meccanismi possibili, in questo lavoro si è scelto di analizzare il processo di diffusione molecolare. Si noti tuttavia che la metodologia descritta può essere usata in modo analogo per i processi di natura cellulare o meccanica (al più sarà necessario rivedere alcune funzioni che descrivono la periodicità innescata). Come anticipato, è possibile creare un modello matematico che descriva *l'attivazione locale e l'inibizione a lungo raggio* prescindendo dal tipo di meccanismo sottostante, purché in funzione di alcuni parametri (si veda Tab.2.1), ricavabili sperimentalmente. Tale modello è un'equazione differenziale scritta in forma matriciale la cui soluzione può essere ottenuta attraverso la trasformata di Fourier e la convoluzione di funzioni. Per simulare i dati verrà utilizzata la soluzione del modello proposto, per verificare, in ultima istanza, che la funzione di interazione ipotizzata per il caso molecolare porti effettivamente alla formazione di periodicità. Dopodiché vengono calcolati i valori di K in funzione della distanza reciproca fra le molecole e si fa un confronto fra la funzione teorica attesa e i valori di K ottenuti dalla simulazione.

3.1 Cenni sulla Funzione di Interazione per il Caso Molecolare

La chiave per la comprensione dell'algoritmo risiede nella definizione di $K(\mathbf{x})$, la funzione che descrive l'interazione fra molecole (o cellule, a seconda del tipo di processo). Rimandando la spiegazione intuitiva del *perché* la forma matriciale sia così definita al Cap.4, riportiamo l'equazione differenziale da risolvere:

$$\frac{\partial}{\partial t} \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} D_A & 0 \\ 0 & D_I \end{pmatrix} \nabla^2 \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} h_{AA}/\tau_A & h_{AI}/\tau_A \\ h_{IA}/\tau_I & h_{II}/\tau_I \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} \tau_A^{-1} & 0 \\ 0 & \tau_I^{-1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} \quad (3.1)$$

In un modello di diffusione A e I rappresentano l'attivatore e l'inibitore, D_A e D_I

rappresentano i corrispettivi coefficienti di diffusione, τ_A e τ_I sono i tempi di dimezzamento e un generico h_{ab} (*sensitivity* di a) rappresenta l'incremento del tasso di produzione della specie a all'aumentare percentuale della specie b . La soluzione alla (3.1) ha andamento esponenziale, più nello specifico è della forma:

$$\phi_q = \begin{pmatrix} A_{q,0} \\ I_{q,0} \end{pmatrix} e^{\mu_q t} \quad (3.2)$$

dove $q=2\pi/\lambda$ rappresenta il vettore d'onda introdotto dalla trasformata di Fourier per passare da una PDE a una ODE (si rimanda al Cap.4) e μ_q rappresenta il tasso di crescita dell'esponenziale. Utilizzando le proprietà della trasformata di Fourier sulla (3.1) e riferendoci al problema degli autovalori (4.11) riportato nel Cap.4, possiamo dire che μ_q rappresenta le soluzioni all'equazione caratteristica di:

$$\det[\mathbf{M} - \mathbf{I}\mu_q] = 0 \quad (3.3)$$

dove \mathbf{I} è la matrice identità e \mathbf{M} rappresenta la matrice:

$$\begin{pmatrix} (h_{AA} - 1)/\tau_A - D_A/q^2 & h_{AI}/\tau_A \\ h_{IA}/\tau_I & (h_{II} - 1)/\tau_I - D_I/q^2 \end{pmatrix} \quad (3.4)$$

mentre (3.2) rappresenta la classe di autovettori per (3.4) una volta determinati i valori di μ_q . Ora, siamo partiti da (3.1) nel dominio reale per arrivare, con Fourier, a (3.2) nel dominio del vettore d'onda. Bisogna capire come questo cambio di coordinate permetta di determinare la funzione di interazione $K(x)$ e, di conseguenza, l'evoluzione spaziale del sistema soggetto a perturbazione. Riallacciandoci alla (3.2) si ha:

$$\frac{\partial}{\partial t} \phi_q = \mu_q \phi_q \quad (3.5)$$

e applicando l'anti-trasformata sulla (3.5) per passare al dominio reale otteniamo:

$$\begin{aligned} \mathcal{F}^{-1} \left[\frac{\partial}{\partial t} \phi_q \right] &= \mathcal{F}^{-1} [\mu_q \phi_q] = \frac{\partial}{\partial t} \phi_{x,t} \\ \mathcal{F}^{-1} [\mu_q \phi_q] &= f(x, t) * g(x, t) \\ f(x, t) * g(x, t) &= \int_{-\infty}^{+\infty} g(x, t) f(x' - x) dx \end{aligned} \quad (3.6)$$

dove $f(x)$ e $g(x)$ sono rispettivamente le anti-trasformate di μ_q e ϕ_q . Dunque da una semplice proprietà matematica che lega la trasformata alla convoluzione si coglie la relazione che intercorre fra il tasso di crescita dell'esponenziale e la funzione di interazione fra le molecole. Se la convoluzione può essere interpretata infatti come la risposta del sistema lineare in seguito ad una perturbazione (si veda il Cap.4), allora si può associare la funzione di ingresso (o la perturbazione) a $K(x)$ e la risposta del

sistema alla variazione di concentrazione $\frac{\partial}{\partial t}\phi(x, t)$. A questo punto la relazione che lega la funzione di interazione al tasso di crescita dell'esponenziale, passando per Fourier, è data da:

$$K(x) = \frac{\partial}{\partial t}\phi(x, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} \mu_q e^{-iqx} dq \quad (3.7)$$

Per poter integrare in dq tuttavia è necessario conoscere l'espressione per μ_q , che si può ricavare facendo delle considerazioni sugli autovalori di (3.4). In primis, per garantire la formazione di patterning uno dei possibili autovalori μ_q deve essere positivo (o nel caso complesso la sua parte reale deve essere positiva) e, per comodità, possiamo supporre che la perturbazione sia dominata rispetto a una direzione spaziale preferenziale scegliendo l'autovalore maggiore. In secondo luogo, affinché la funzione d'onda rappresenti un'effettiva periodicità, si suppone che μ_q sia invariante per traslazione - in accordo anche con le proprietà degli LTIS²². In aggiunta, anche se non è una condizione necessaria, si ha che nella maggior parte delle equazioni di diffusione μ_q è piccata. Alla luce di queste considerazioni una possibile funzione per μ_q è data dalla seguente:

$$\mu_q = a \left[1 - k \left(\frac{q^2 - q_0^2}{q_0^2} \right)^2 \right] \quad (3.8)$$

dove a è un parametro che indica l'altezza del picco, k modula l'ampiezza della funzione e q_0 rappresenta la posizione del picco. Questi parametri possono essere ricavati imponendo le condizioni al contorno e regolano l'evoluzione spaziale del sistema in risposta alla funzione di interazione. Non verrà approfondito come questi vengano determinati, in quanto non necessario per comprendere l'algoritmo descritto nel paragrafo successivo. Tuttavia, si può accennare al fatto che tali condizioni vengono imposte in funzione del polinomio caratteristico della (3.4). Prima di definire la funzione di interazione per il caso molecolare bisogna fare un'ulteriore considerazione: il fenomeno della periodicità nei tessuti dipende da una variazione di concentrazione locale di molecole o, in altre parole, da una variazione di densità spaziale in funzione dei parametri d'onda (i.e. $\lambda = 2\pi/q$). Questo implica la presenza di zone nel tessuto a più alta densità (i.e. cunette) intervallate fra loro in modo regolare nello spazio. Pertanto la formazione di pattern dipende dalla distanza di interazione $|x|$ e, come si evince dalla (3.2), da μ_q . Bisogna capire come esprimere la dipendenza da μ_q in funzione di λ , dato che la periodicità innescata è di natura puramente spaziale. Un ragionamento valido può essere questo: la lunghezza d'onda rappresenta la regolarità spaziale secondo cui si manifestano le irregolarità (o l'aumento di concentrazione delle molecole). Questo implica che λ rappresenta un fattore di scala per la lunghezza e che convenga suddividere lo spazio in unità di λ per misurare la distanza di interazione fra le molecole. In virtù di ciò si può dire che l'argomento della (3.2) espresso nello spazio reale è $\propto |x|/\lambda$. Fatte queste premesse, per calcolare i valori di λ ci si può affidare all'analisi dimensionale considerando i parametri coinvolti nel processo studiato (nel nostro caso molecolare) e facendo in modo che la dimensione coincida con una lunghezza (si veda Tab.2.1). Riprendiamo

²²Linear Time Invariant Systems, si veda Cap.4

ora le equazioni di diffusione-reazione nel caso molecolare:

$$\begin{cases} \frac{\partial}{\partial t} A = D_A \nabla^2 A - \frac{A}{\tau_A} + f_{A\phi} \\ \frac{\partial}{\partial t} I = D_I \nabla^2 I - \frac{I}{\tau_I} + f_{I\phi} \end{cases} \quad (3.9)$$

che rappresentano la (3.1) nel caso uni-dimensionale per l'attivatore e l'inibitore. In (3.9) $f_{A,I}$ rappresenta la funzione di reazione e dipende anche dalle *sensitivity* delle due molecole. Applicando la trasformata alla (3.9) si ottiene:

$$K(x) = K_A e^{\frac{-|x|}{\lambda_A}} - K_I e^{\frac{-|x|}{\lambda_I}} \quad (3.10)$$

dove λ è definita come da Tab.2.1 e può essere ricavata sperimentalmente. La (3.10) sarà la funzione che utilizzeremo per la simulazione di diffusione molecolare per verificare che generi periodicità.

3.2 Simulazione e Risultati

Nel Cap.2 è stato detto che gli approcci sperimentali per verificare la teoria sono due: il primo che consta nel confermare un'ipotesi *a priori* simulando un processo e verificando che i risultati siano conformi alla tesi di partenza, il secondo che invece parte da un processo di cui non si conosce la causa sottostante e che si cerca di categorizzare utilizzando gli strumenti matematici forniti da una teoria generalizzata. Il programma utilizzato per la trattazione è stato scritto in Python e serve a dimostrare che la funzione studiata nel caso molecolare descritta da (3.10) è in grado di generare periodicità nei tessuti. La prima parte si focalizza sulla simulazione informatica di un processo di diffusione molecolare nota la funzione di interazione. Dopodiché, una volta generati i dati, si studiano le posizioni e le velocità delle molecole coinvolte nella diffusione per risalire a ritroso alla $K(x)$. Nonostante l'apparente tautologia, si tratta di un approccio molto utile nel caso in cui si disponga di dati sperimentali e si abbia una teoria *a priori* da confermare o, eventualmente, da negare.

Parte I

In primo luogo sono stati creati dati sintetici di un processo di diffusione (caso uni-dimensionale) utilizzando la (3.10), dopodiché sono state misurate le posizioni delle molecole in diversi istanti temporali e le corrispettive distanze relative. Ciò che si può notare è che prima dell'avvio della simulazione, quando le molecole sono disposte casualmente, le distanze relative seguono la distribuzione della funzione `numpy.random.rand()` - che genera le posizioni casuali distribuite uniformemente prima del processo. Finita la diffusione invece le molecole si raggruppano ad intervalli regolari, mostrando come la funzione di interazione ipotizzata sia in grado di generare periodicità. Il codice è così strutturato: una parte dove vengono definiti i valori dei parametri di diffusione, una parte in cui viene costruita una matrice che salva i

dati delle posizioni e dei tempi delle molecole e un'ultima parte in cui si costruiscono i grafici per vedere come sarà la configurazione finale una volta che il sistema raggiunge lo stato stazionario. Vengono ora riportati i grafici della simulazione, seguiti da una descrizione qualitativa.

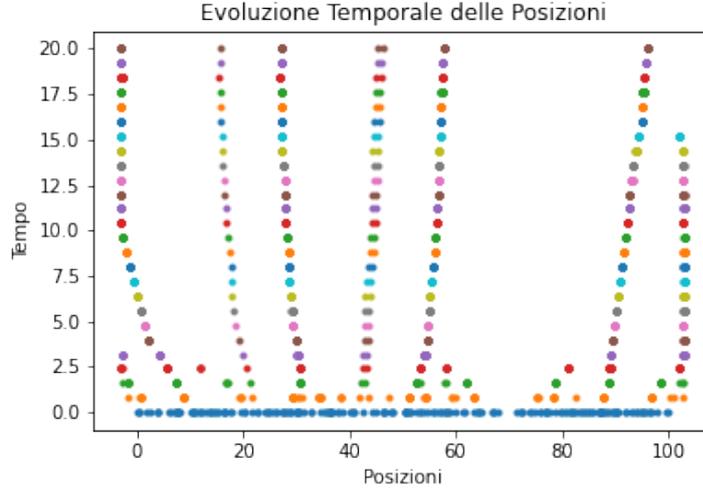


Figura 3.1: Evoluzione temporale delle posizioni delle molecole durante il processo di diffusione. Ogni riga colorata rappresenta la disposizione delle molecole a istanti diversi.

Per completezza riportiamo qui di seguito i valori utilizzati per i parametri del codice:

- $\lambda_A = 5.53$
- $\lambda_I = 13$
- $K_A = 17.26$
- $K_I = 15$

Osservando Fig.3.1 e Fig.3.2, dove sono riportate le posizioni delle molecole e dove viene riportata l'evoluzione della loro distribuzione rispettivamente, si può notare come partendo da una configurazione indistinta si arrivi ad una configurazione periodica. Ad esempio, da Fig.3.1 che rappresenta l'evoluzione spaziale delle molecole durante tutta la diffusione, si può notare come queste si distribuiscano nello spazio formando zone a più elevata densità alternate a zone a più bassa densità come previsto dalla teoria (ogni punto colorato rappresenta in realtà più molecole concentrate nello stesso punto). Ancora, studiando l'istogramma delle distanze relative per $t=19.99$ si può notare un'elevata frequenza di molecole molto vicine fra loro (a distanza quasi nulla o comunque inferiore alla metà della lunghezza totale dello spazio di diffusione) e una minor frequenza di molecole molto distanziate (la cui distanza relativa supera la metà della lunghezza totale dello spazio di diffusione). Sapendo che ogni picco dell'istogramma rappresenta un raggruppamento e vedendo come i picchi si distribuiscano abbastanza regolarmente rispetto le distanze relative, si può affermare qualitativamente che i singoli raggruppamenti molecolari siano distanziati

da intervalli periodici - confermando l'ipotesi che una funzione del tipo (3.10) possa dare origine alla formazione di pattern.

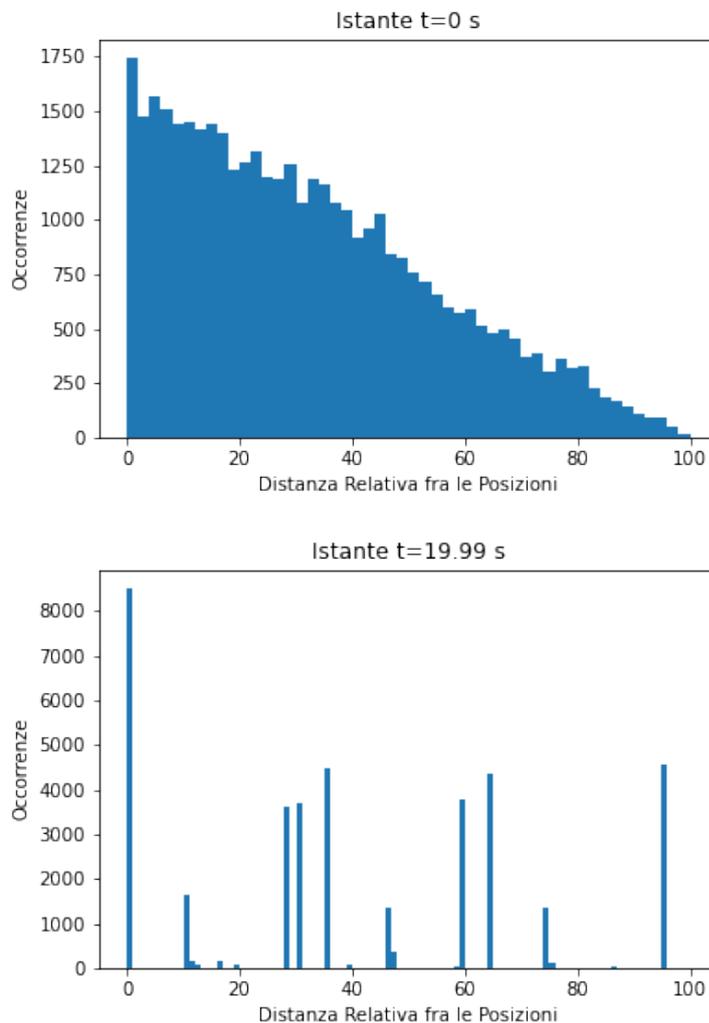


Figura 3.2: Istogrammi delle distanze relative in funzione del tempo durante il processo di diffusione. In alto sono riportate le distanze relative fra le particelle la cui posizione casuale viene generata da un generatore di numeri (pseudo) casuali distribuiti uniformemente fornito dalla libreria numpy di Python. In basso le distanze relative finito il tempo della simulazione.

Nel codice si è anche tenuto conto delle condizioni al contorno: dal momento che il processo avviene all'interno di uno spazio unidimensionale finito, per evitare che in seguito alla diffusione le molecole si disperdano oltre lo spazio prestabilito è stata inserita una barriera di potenziale definita dalla funzione di Heaviside: il dominio rappresenta il margine entro cui le particelle possono fuoriuscire rispetto la lunghezza totale, mentre l'altezza del gradino rappresenta la forza repulsiva subita dalle molecole all'avvicinarsi verso le estremità dello spazio cui sono confinate. E' a causa di queste condizioni al contorno che la frequenza di molecole prossime ai bordi è bassa (10% circa), come si può vedere da Fig.3.2.

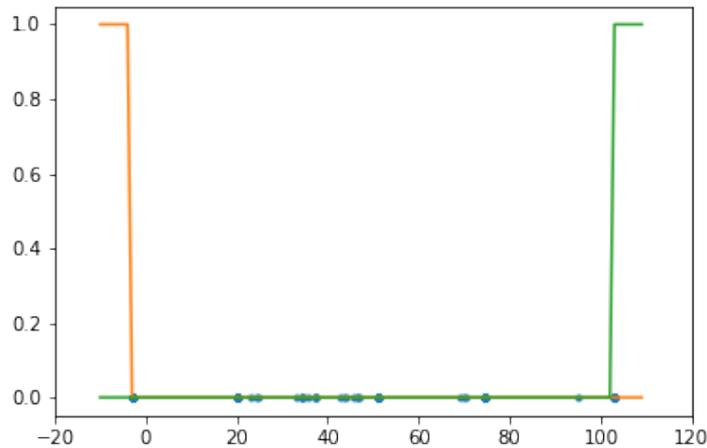


Figura 3.3: Barriera di potenziale alle estremità dello spazio di diffusione. I parametri usati per costruire la funzione gradino sono stati scelti arbitrariamente in quanto l'intensità delle condizioni al contorno non va ad inibire la formazione periodicità (al più potrebbe modificarne la frequenza).

Inoltre la non perfetta regolarità a cui si presentano i picchi delle distanze relative in Fig.3.2 può essere interpretata dal fatto che il processo è ostacolato dal moto randomico delle molecole, tradotto a livello informatico con un rumore che va ad interferire con la funzione di interazione (modificando dunque la regolarità che presenterebbe la soluzione di (3.10) nel caso ideale senza considerare i moti browniani).

Alla luce di quanto detto fin'ora le simulazioni generate sembrano confermare la teoria che un processo molecolare descritto da un'equazione del tipo (3.10) possa innescare una periodicità all'interno del tessuto, dove zone a più elevata intensità (attivazione locale) si alternano ad altre a minor densità (inibizione a lungo raggio), come effettivamente previsto dalla teoria di Turing.

Parte II

La seconda parte del codice sfrutta la relazione fra le velocità di risposta e le posizioni molecolari secondo la (3.7), che nel caso discreto diventa:

$$\mathbf{v}_i = \sum K(|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j|) \frac{(\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j)}{|\mathbf{x}_i - \mathbf{x}_j|} \quad (3.11)$$

Una volta costruita la matrice delle posizioni e delle velocità è possibile definire la $K(|x|)$ come un sistema di equazioni lineari risolvibile tramite l'inversione fra matrici. Si può poi procedere plottando i risultati ottenuti da (3.11) per verificare che la funzione di interazione definita da (3.10) sia effettivamente responsabile del processo di diffusione. Riportiamo il grafico relativo ai valori ottenuti per $K(x)$ sovrapposto alla funzione teorica attesa da (3.10).

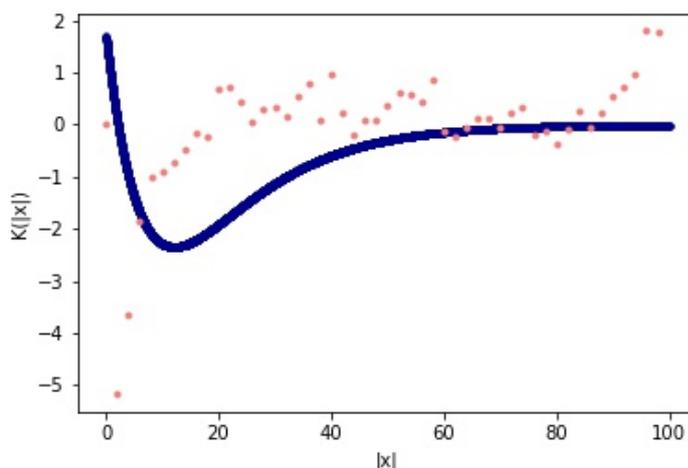


Figura 3.4: Grafico con i valori di K in funzione della distanza reciproca fra le molecole. I punti color corallo indicano i valori di K , la linea blu rappresenta il plot della (3.10) che rappresenta la previsione teorica per l'andamento della funzione di interazione.

Il discostamento dalla (3.10) può essere dovuto alla presenza del rumore inserito per simulare il moto casuale delle molecole in assenza di diffusione oppure alla scelta arbitraria dei parametri. Non solo, il codice utilizzato ha considerato le molecole come puntiformi, tuttavia in un caso reale queste, dotate di una propria dimensione, non possono occupare esattamente la stessa posizione - come invece può verificarsi nel codice. Ciò implica che la funzione di interazione ricavata per le molecole molto vicine a sua volta non tiene conto del problema dimensionale, risultando pertanto quantitativamente inaccurata al diminuire della distanza reciproca. Osservando Fig.3.4, effettivamente, le deviazioni maggiori si verificano per distanze minori o pari alla metà della lunghezza totale: come si può vedere da Fig.3.2 il processo di diffusione porta le molecole nella maggior parte dei casi a disporsi a distanze minori della metà dello spazio di diffusione, così portando ad una possibile sovrapposizione e sovrastima delle occorrenze per ragioni dimensionali - influenzando pertanto i valori di K . Inoltre a livello informatico si pone il problema dell'approssimazione allo zero per molte distanze reciproche dell'ordine di 10^{-4} , che per evitare problemi con l'inversione di matrice vengono direttamente eliminate riducendo così il numero di dati a disposizione per il grafico della funzione di interazione. Per quanto riguarda invece il discostamento dalla previsione teorica per le distanze prossime alla lunghezza totale si può ragionevolmente ipotizzare che la barriera di potenziale imposta nella prima parte di codice abbia un'influenza sul riposizionamento e sulle velocità delle molecole stesse, portando ad una repulsione che si intensifica ai bordi e che incrementa a sua volta il valore di interazione di K fra le molecole vicine alla barriera. Cionondimeno una formazione periodica che riproduca la teoria basata sull'*attivazione locale e l'inibizione a lungo raggio* si palesa nei raggruppamenti di Fig.3.1 e 3.2, mentre l'andamento "oscillatorio" dei punti relativi alla K (color corallo) intorno alla previsione teorica (linea continua blu) di Fig.3.4 lascia pensare che variando i parametri di diffusione e tenendo presente la dimensione delle molecole sia possibile fare una stima più accurata dei valori di interazione.

3.3 Conclusioni

In questa tesi siamo partiti da uno studio qualitativo dei processi biologici sottostanti la formazione di pattern e siamo giunti, quantitativamente, alla descrizione di una funzione che possa rendere conto dell'evoluzione di un sistema quando questo viene perturbato dal suo stato di equilibrio - per arrivare, nello stato stazionario, ad assumere una configurazione periodica nello spazio.

Nel primo capitolo sono stati descritti sinteticamente le principali cause di innesco di periodicità nei sistemi biologici, dai processi di diffusione molecolare proposti da Turing a quelli di informazione posizionale di Wolpert. Sono stati inoltre descritti meccanismi alternativi a quelli di diffusione, legati principalmente alle dinamiche cellulari e alle proprietà di contrazione e di adesione, che su larga scala influenzano la polarità rispetto gli assi embrionali di un organismo in via di sviluppo.

Dopo questa breve introduzione biologica, nel secondo capitolo ci siamo soffermati sulla categorizzazione dei processi scatenanti periodicità nei tessuti, in particolare quelli riconducibili a un modello matematico più generale di equazioni differenziali parziali. La soluzione a tale modello, poste eventuali condizioni al contorno, permette di dare una spiegazione alla formazione di pattern e di trovare una funzione d'interazione fra le componenti del sistema perturbato in grado di prevedere l'andamento della periodicità innescata. L'utilità di questo modello sta nel poter elaborare esperimenti *ad hoc* per studiare la disposizione periodica delle cellule nei tessuti o, eventualmente, per simularla qualora non si possa procedere di verifica empirica (anche se l'approccio consigliato è quello di affidarsi ai risultati sperimentali concreti per poi confrontarli con le previsioni del modello).

Nell'ultimo capitolo sono stati accennati gli strumenti matematici utilizzati per la formalizzazione del modello matematico ed è stata realizzata una simulazione di diffusione molecolare basata sulla teoria costruita nel capitolo precedente. Per quanto riguarda i risultati ottenuti dalla prima parte del programma, ciò che è evidente è che la funzione di interazione scelta porta il set di molecole iniziali, disposte casualmente ma in modo uniforme nello spazio, a raggrupparsi alternando intervalli a più alta densità a intervalli a più bassa densità, riproducendo quanto previsto da Turing. La seconda parte del programma, che dovrebbe comparare i valori della K ottenuta dalla simulazione con la funzione teorica attesa, lascia più spazio di interpretazione e fornisce meno certezze riguardo la teoria: problemi di cut-off, problemi di natura dimensionale e la completa arbitrarietà dei valori dei parametri sono tutte possibili concause del risultato approssimativo ottenuto. Fiduciosi però che tale risultato venga migliorato in futuro in seguito ad ulteriori indagini.

Capitolo 4

Compendi

Questo è un capitolo di approfondimenti riguardo quanto riportato nel Cap.3. In particolare si accennerà *in maniera non formale ma intuitiva* agli strumenti matematici utilizzati per risolvere i sistemi di reazione-diffusione e si darà una breve interpretazione dell'equazione che li descrive.

4.1 Stabilità

Il primo concetto chiave per capire il problema alle radici è quello di stabilità. Affinché possa avvenire una periodicità all'interno dei tessuti è necessario infatti che il sistema studiato presenti, nello spazio, un'instabilità locale che permane anche nello stato stazionario - quando la perturbazione al sistema è cessata. Se così non fosse una volta finita l'interazione fra le molecole (o le cellule, a seconda del tipo di meccanismo studiato) i tessuti ritornerebbero alla loro condizione iniziale e il pattern sarebbe solo temporaneo. Prima ancora di parlare di stabilità (o instabilità) di un sistema però è necessario definire il sistema stesso e le equazioni che descrivono il processo di perturbazione rispetto la condizione di equilibrio. Per questo motivo in questo primo paragrafo si parlerà di sistemi dinamici e meccanismi di linearizzazione, che permettono di semplificare notevolmente i conti. Questi meccanismi di linearizzazione sono strumenti matematici: la già citata (e più volte nel Cap.3) trasformata di Fourier e la convoluzione di funzioni, che verranno spiegate a seguire.

4.1.1. Linearizzazione delle ODE

Come già anticipato per avere un'idea intuitiva di cosa rappresentino le equazioni del Cap.3 è necessario parlare dei sistemi dinamici, delle equazioni che li descrivono e del loro stato di eventuale stabilità o instabilità. Consideriamo un sistema molto semplice, descritto da due equazioni del tipo:

$$\begin{cases} \dot{x}_1(t) = f_1(x_1, x_2) \\ \dot{x}_2(t) = f_2(x_1, x_2) \end{cases} \quad (4.1)$$

che in notazione più compatta, definendo $F = (f_1, f_2)$ e $X = (x_1, x_2)$, può essere riscritto come:

$$\dot{X} = F(X) \quad (4.2)$$

La prima cosa da fare è risalire ai valori di X per cui la derivata è nulla, ovvero trovare le condizioni per cui le variabili di stato del sistema non variano nel tempo (si dice in questo caso che il sistema è stazionario): indichiamo tali stati con x_{10} e x_{20} , che in notazione più compatta assumeranno la forma X_0 . Per tali valori si avrà:

$$\dot{X} = F(X_0) = 0 \quad (4.3)$$

La teoria prevede che il sistema sia stabile per $X = X_0$. Ma cosa succede se valutiamo lo stato del sistema in un intorno di X_0 in seguito ad una piccola perturbazione? Sono due le possibili risposte: potrebbe ritornare alla posizione di equilibrio oppure deviare definitivamente. Per studiare il problema delle piccole oscillazioni attorno alla posizione di equilibrio ci si può avvalere della teoria perturbativa - che al primo ordine si può dimostrare coincidere con la serie di Taylor arrestata anch'essa al primo ordine. Riconsideriamo lo stato di equilibrio e riscriviamolo in funzione della perturbazione ϵ :

$$\begin{cases} x_1(t) = x_{10} + \epsilon x_1^*(t) \\ x_2(t) = x_{20} + \epsilon x_2^*(t) \end{cases} \quad (4.4)$$

Le variabili stellate indicano la direzione di perturbazione mentre $|\epsilon| \ll 1$ rappresenta l'intensità, di modo tale che non risulti troppo grande rispetto al valore della posizione di equilibrio. E' importante rimarcare in questo caso la dipendenza delle variabili stellate da t , in quanto sarà in seguito alla perturbazione che assisteremo ad un'evoluzione temporale del sistema (il che si traduce in un temporaneo stato di instabilità). Riscriviamo tutto nuovamente in forma vettoriale, con la promessa che non si tratta di un semplice esercizio stilistico ma che semplificherà notevolmente la nozione di instabilità:

$$X = X_0 + \epsilon X^* \quad (4.5)$$

Sostituiamo ora la (4.5) nella (4.1), arrivando così ad ottenere, all'equilibrio perturbato:

$$\begin{cases} \epsilon \dot{x}_1^*(t) = f(x_{10}, x_{20}) + \epsilon x_1^* \frac{\partial f_1}{\partial x_1}(x_{01}, x_{02}) + \epsilon x_2^* \frac{\partial f_1}{\partial x_2}(x_{01}, x_{02}) \\ \epsilon \dot{x}_2^*(t) = f(x_{10}, x_{20}) + \epsilon x_1^* \frac{\partial f_2}{\partial x_1}(x_{01}, x_{02}) + \epsilon x_2^* \frac{\partial f_2}{\partial x_2}(x_{01}, x_{02}) \end{cases} \quad (4.6)$$

trascurando gli $o(\epsilon^2)$.

Possiamo poi anche porre $f(x_{10}, x_{20})=0$ in virtù della (4.3) e semplificare dunque gli ϵ da entrambi i lati delle equazioni, arrivando a:

$$\dot{X}^* = \mathbf{J}X^* \quad (4.7)$$

dove \mathbf{J} rappresenta la matrice jacobiana, i cui elementi sono le derivate parziali della funzione vettoriale rispetto alle due variabili. Quello che abbiamo appena ottenuto è un sistema lineare di equazioni differenziali ordinarie la cui soluzione è di tipo esponenziale:

$$X^* = Ae^{bt} \quad (4.8)$$

dove A e b rappresentano delle costanti moltiplicative. Nell'espressione A può essere ricavata imponendo le condizioni iniziali ed è definita come $A = (A_{01}, A_{02})$. Facciamo ora un'osservazione su b (*tasso di crescita dell'esponenziale*): per $b < 0$ l'esponenziale è decrescente e per tempi prossimi all'infinito si annulla. Questo implica che il sistema raggiunge una stabilità. Viceversa, per $b > 0$ il sistema è instabile e dunque si potrà assistere alla formazione di periodicità. Il μ_q utilizzato nel Cap.3 è un analogo di b per il caso dei sistemi biologici. Sostituendo la (4.8) in forma estesa nella (4.7) si ottiene:

$$bA = \mathbf{J}A \quad (4.9)$$

la nota equazione dall'algebra lineare per la risoluzione del problema agli autovalori. Una soluzione banale per la (4.9) è $A = 0$, che però fisicamente implica, per (4.8), una perturbazione nulla e dunque una stabilità del sistema. Se A non è nulla d'altro canto non sempre potrebbe essere possibile ricavare una soluzione: in tal caso bisogna cercare dei valori di b tali che la (4.9) venga soddisfatta. Il significato dell'equazione, da un punto di vista algebrico, risulta ora più chiaro (ed è anche chiaro perché sia stato fatto uso pedante della notazione vettoriale): l'autovettore rappresenta la perturbazione, l'autovalore determina invece la risposta del sistema e, di conseguenza, il pattern innescato. Tutto ciò ci porta dunque a voler determinare due cose: il *tasso di crescita dell'esponenziale* e la *perturbazione* esercitata sul sistema:

$$(\mathbf{J} - b\mathbf{I})A = 0 \quad (4.10)$$

dove \mathbf{I} rappresenta la matrice identità. Gli autovalori si ricavano dall'equazione del polinomio caratteristico:

$$\det[\mathbf{J} - b\mathbf{I}]A = 0 \quad (4.11)$$

Il polinomio caratteristico può avere tuttavia diverse soluzioni, il che può essere interpretato come il fatto che il sistema può essere perturbato in più direzioni (gli autovettori relativi alle soluzioni della (4.11)), e a diverse intensità (i diversi valori di b). Fra i diversi valori di b , è sufficiente che *uno solo* sia positivo per garantire l'instabilità del sistema. La perturbazione totale sarà scritta come una combinazione lineare di tutti gli autovettori per le direzioni spaziali (indipendenti fra loro) ricavati dalla (4.10), così come la risposta totale del sistema.

4.1.2. Linearizzazione delle PDE con Fourier

Come abbiamo appena visto la stabilità di un sistema è definita in base alla sua risposta ad una perturbazione infinitesima rispetto le posizioni di equilibrio: se tutti i b sono negativi è stabile, altrimenti si dice instabile. Nella trattazione fatta fin'ora abbiamo solo considerato autovalori reali, ma nulla vieta che questi possano essere complessi. In tal caso la condizione necessaria affinché si verifichi l'instabilità è che la parte reale di uno degli autovalori possibili sia positiva (le componenti immaginarie indicano una variazione temporale piuttosto che una spaziale, ma nel caso più semplice del processo di diffusione si considera solo la variazione spaziale). Bisogna fare una precisazione: se tutte le parti reali degli autovalori sono negative ciò significa che il sistema è stabile *rispetto a piccole perturbazioni*, cionondimeno la stabilità non è garantita per perturbazioni maggiori. Non è scopo della trattazione quello di analizzare questo secondo caso (di fatto le equazioni di diffusione-reazione del Cap.3. si riferiscono ad uno studio del sistema le cui perturbazioni sono molto piccole) ma la precisazione era doverosa. Quanto appena detto implica che le condizioni sufficienti a garantire l'instabilità sono meno stringenti di quelle per garantire la stabilità: se $b > 0$ è sufficiente a *garantire* l'instabilità, $b < 0$ è necessaria (ma non sufficiente) *per avere* stabilità. Il processo di linearizzazione descritto poc'anzi dunque, in virtù del fatto che si basa su perturbazioni infinitesime, si presta bene per la descrizione di fenomeni la cui natura è *locale*, il che funge da ponte di raccordo con lo studio di sistemi descritti da processi di *attivazione locale* e *inibizione a lungo raggio* come quelli di diffusione-reazione. Il *come* una funzione esponenziale del tipo (4.8) possa descrivere andamenti periodici per tempi prossimi all'infinito verrà spiegato più nel dettaglio nei paragrafi successivi quando, analizzando l'equazione di reazione-diffusione, verranno approfondite le implicazioni del termine reattivo e di quello diffusivo. Allo stato attuale delle cose è necessario fare un piccolo atto di fede, consci del fatto che verrà fornita una spiegazione per lo meno intuitiva della dinamica di tali equazioni. Fatta questa premessa, prima di studiare il caso dei modelli di Turing, è necessario fornire alcuni strumenti matematici indispensabili: la nozione di *Convoluzione* e di *Trasformata di Fourier*.

4.1.2.a. Intuizioni sulla Convoluzione

Prima di addentrarci nell'utilizzo della convoluzione di funzioni per i sistemi lineari di reazione-diffusione facciamo un preambolo di natura matematica. Consideriamo due semplici funzioni polinomiali del tipo:

$$\begin{cases} f(x) = 3x^2 + 8x + 9 \\ g(x) = 9x^2 + 2x + 5 \end{cases} \quad (4.12)$$

Moltiplichiamo ora le due funzioni fra loro, ottenendo:

$$(f * g)(x) = (3x^2 + 8x + 9)(9x^2 + 2x + 5) \quad (4.13)$$

che porterà ad un equazione del tipo:

$$\alpha(4)x^4 + \alpha(3)x^3 + \alpha(2)x^2 + \alpha(1)x + \text{costante} \quad (4.14)$$

Ci chiediamo quale sia il valore di $\alpha(2)$. Per farlo sarà sufficiente sommare fra loro tutti i contributi che portano ad ottenere $\alpha(2)x^2$, ovvero: $(3)(5) + (8)(2) + (9)(9)$. E' interessante notare che se definiamo $f = f_2x^2 + f_1x + f_0$ e $g = g_2x^2 + g_1x + g_0$ otteniamo:

$$\alpha(2) = f_2g_0 + f_1g_1 + f_0g_2 \quad (4.15)$$

dove si nota che la somma dei pedici per ogni termine che contribuisce ad $\alpha(2)$ deve essere pari a 2. Scritto in notazione più compatta si avrà:

$$\alpha(2) = \sum_{k=0}^2 f_k g_{(2-k)} \quad (4.16)$$

e questo è verificabile per qualsiasi coefficiente di qualsiasi ordine per qualsiasi polinomiale. Nel caso più generale quindi:

$$\alpha(x) = \sum_y f_y g_{(x-y)} \quad (4.17)$$

che, nel caso continuo, porta a:

$$(f * g)(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(y)g(x-y) dy \quad (4.18)$$

che è proprio la definizione di convoluzione di due funzioni. Fatta questa premessa matematica bisogna ora capire come la convoluzione si riallacci alla teoria dei sistemi lineari. Consideriamo un sistema dinamico lineare stazionario (LTIS ²³), ovvero un sistema i cui parametri non dipendono dal tempo. Un LTIS riceve una funzione in ingresso (come ad esempio una perturbazione) e produce una risposta (come nel caso della (4.8)), che varia a seconda del tipo di sistema. E' importante precisare che l'espressione *i parametri non dipendono dal tempo* può essere fuorviante: nel caso della convoluzione infatti lo studio che viene fatto sul sistema si concentra sulla risposta ad uno stimolo in un preciso istante, surgelando tutti gli altri e riferendo dunque la soluzione ad un fissato T (ciò non toglie che le variabili che descrivono il sistema possano variare istante per istante). Dato un certo LTIS l'obbiettivo della convoluzione è quello di ricavare la funzione di risposta per qualsiasi tipo di input. Per farlo si sfruttano le proprietà caratteristiche degli LTIS, ovvero tutto ciò che segue dalla loro linearità: se si sommano due input diversi, la risposta finale sarà data dalla somma dei due corrispettivi output. Ciò implica che basta conoscere la risposta ad un input impulsivo (UIR²⁴) per ricavare la risposta finale del sistema per un qualsiasi T fissato: infatti ogni funzione d'ingresso può essere scomposta in una somma di impulsi, portando la funzione in uscita a poter essere descritta a sua volta come la somma di singoli UIR. Il procedimento non differisce da quanto fatto per il formalismo adottato nella costruzione degli integrali di Riemann: l'output finale,

²³Linear Time Invariant System

²⁴Unit Impulse Response

fissato un dato istante $t = T$, sarà dato dall' area sottesa dal grafico della funzione in uscita - che nel passaggio dal discreto al continuo si traduce nell'integrazione rispetto ad una nuova variabile τ appartenente al dominio dell'output. Bisogna capire come effettivamente venga definita questa nuova variabile: definiamo $\tau = t-T$, dove T rappresenta l'istante temporale surgelato in cui si vuole determinare la risposta del sistema ($UIR(\tau)$) e t il tempo totale di ingresso della perturbazione (FI o funzione di ingresso). Data poi la relazione che sussiste fra output, τ e t del tipo:

$$\begin{cases} output \propto UIR(\tau) \\ output \propto FI(t - \tau) \end{cases} \quad (4.19)$$

da cui:

$$output(\tau) = UIR(\tau)FI(t - \tau) \quad (4.20)$$

si ottiene che la risposta del sistema che dipende sia dalla funzione di ingresso FI che dal singolo UIR (per ogni τ) sarà data nel passaggio dal discreto al continuo da:

$$(UIR * FI) = \int_{-\infty}^{+\infty} UIR(\tau)FI(t - \tau) d\tau \quad (4.21)$$

Riassumendo quanto appena detto (e sarà più che sufficiente per comprendere quanto scritto nel Cap.3), nella teoria dei sistemi lineari la convoluzione rappresenta uno strumento matematico in grado di farci ottenere la risposta del sistema quando questo viene perturbato da una funzione in ingresso. In particolare nel modello di diffusione la risposta del sistema biologico sarà la variazione di concentrazione locale ($UIR*FI$) dovuta alla presenza della funzione $K(x)$ (la funzione in ingresso o FI) che descrive la reciproca interazione fra le molecole che diffondono (da cui si evince che la perturbazione viene innescata in seguito all'inserimento di un termine diffusivo in un'equazione del tipo (4.1), come verrà spiegato in seguito).

4.1.2.b. *Trasformata di Fourier e Proprietà*

Passiamo ora al secondo strumento necessario per comprendere quanto fatto nel Cap.3: la *Trasformata di Fourier*. Anche in questo caso la spiegazione non sarà approfondita ma getterà i rudimenti per l'intuizione alla funzione di interazione $K(x)$. Partiamo con la definizione di *trasformata*: qualitativamente possiamo definire la trasformata come una mappa fra due domini distinti di una stessa funzione che descrive un processo o un fenomeno. Insomma, una sorta di dizionario bilingue che permette di tradurre le parole da un sistema di riferimento all'altro: basta aprirlo per poter esporre un concetto in due modi formalmente diversi. Nel caso della fisica ad esempio, un'onda piana viene descritta da alcune grandezze caratteristiche come la frequenza ν , il periodo T o la pulsazione w . Tale funzione può essere espressa in termini di T come in termini di ν , sapendo che la relazione che intercorre fra le due grandezze vale $\nu = 1/T$. Fourier si accorse che una qualsiasi funzione continua (anche non periodica) nel dominio temporale poteva essere espressa con una combinazione lineare di funzioni sinusoidali. La bellezza in tale scoperta risiede nella

facilità descrittiva delle sinusoidi: bastano tre parametri (ampiezza, fase e periodo) per descrivere un fenomeno (periodico o anche non periodico, purché continuo) e prevederne l'evoluzione temporale. Un altro vantaggio delle funzioni sinusoidali è che, se soggette ad un LTIS, non cambiano forma (non verrà fornita una dimostrazione a riguardo). Dato un segnale in ingresso continuo, dunque, è possibile scomporlo in una somma di funzioni sinusoidali, dipendenti ad esempio dalla frequenza. Se invece che esprimere il segnale in funzione della frequenza volessimo esprimerlo in funzione del periodo però non basta più la relazione $\nu = 1/T$, valido per la singola sinusoidale, ma bisogna passare per la trasformata. Riportiamo ora la definizione formale di Trasformata di Fourier della funzione $f(x)$:

$$\mathcal{F}[f(x)] = f(p) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x)e^{-ipx} dx \quad (4.22)$$

mentre l'anti-trasformata viene definita da:

$$\mathcal{F}^{-1}[f(p)] = f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} f(p)e^{ipx} dp \quad (4.23)$$

L'utilità della trasformata sta (oltre a tutto ciò che segue dalla sua linearità) nelle proprietà di derivazione e di prodotto (usate a piè sospinto nel Cap.3), che elenchiamo qui di seguito senza dimostrare:

$$\mathcal{F}\left[\frac{\partial}{\partial t}f(x)\right] = \frac{\partial}{\partial t}\mathcal{F}[f(x)] \quad (4.24)$$

$$\mathcal{F}[\partial_{x,\alpha}f(x)] = (ip)^\alpha \mathcal{F}[f(x)] \quad (4.25)$$

$$\mathcal{F}[f(x) * g(x)] = \mathcal{F}[f(x)]\mathcal{F}[g(x)] \quad (4.26)$$

$$f(x) * g(x) = \mathcal{F}^{-1}[\mathcal{F}[f(x)]\mathcal{F}[g(x)]] \quad (4.27)$$

dove $\partial_{x,\alpha}$ rappresenta la derivata rispetto a x effettuata α volte. Queste proprietà possono essere utilizzate per trasformare equazioni differenziali parziali (PDE) in equazioni differenziali ordinarie (ODE), togliendo quindi la dipendenza da entrambe le variabili di derivazione e semplificando notevolmente i conti. Per essere più chiari, verrà riportato a titolo d'esempio il calcolo necessario per passare dalla (3.1) alla (3.4) (passando dal dominio di λ a quello di q):

$$\frac{\partial}{\partial t} \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} D_A & 0 \\ 0 & D_I \end{pmatrix} \nabla^2 \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} h_{AA}/\tau_A & h_{AI}/\tau_A \\ h_{IA}/\tau_I & h_{II}/\tau_I \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} \tau_A^{-1} & 0 \\ 0 & \tau_I^{-1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} \quad (4.28)$$

da cui, sostituendo la (3.2) nella (4.28) e applicando le proprietà di (4.26) e (4.27) si ottiene:

$$\phi_0 e^{\mu_q t} \mu_q = -q^2 \begin{pmatrix} D_A & 0 \\ 0 & D_I \end{pmatrix} \phi_0 e^{\mu_q t} + \begin{pmatrix} (h_{AA} - 1)/\tau_A & h_{AI}/\tau_A \\ h_{IA}/\tau_I & (h_{II} - 1)/\tau_I \end{pmatrix} \phi_0 e^{\mu_q t} \quad (4.29)$$

che, tornando in notazione vettoriale per riallacciarci al problema degli autovalori descritto in (4.1.1), porta alla seguente:

$$\mu_q \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} (h_{AA} - 1)/\tau_A - D_A/q^2 & h_{AI}/\tau_I \\ h_{IA}/\tau_I & (h_{II} - 1)/\tau_I - D_I/q^2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} \quad (4.30)$$

e da cui risulta che $(A, I)^T$ è l'autovettore per la matrice di (4.30) e μ_q il relativo autovalore, che si ottiene attraverso il calcolo del polinomio caratteristico. Per garantire la formazione di periodicità, ovviamente, valgono tutti i ragionamenti fatti nel par.4.1.1.

4.2 Legge di Fick ed Equazione di Reazione-Diffusione.

Questo paragrafo spiegherà brevemente la legge di diffusione e darà un primo indizio sul perché l'equazione di reazione-diffusione arrivi alla forma (3.1). Nella prima parte (4.2.1) verrà spiegato brevemente il perché del termine diffusivo, nella seconda (4.2.2) invece il perché di quello reattivo.

4.2.1 Legge di Fick

Consideriamo una sezione cilindrica come quella di Fig.4.2, all'interno della quale diffondono un numero indefinito di molecole massive. Supponiamo inoltre che lo spessore della sezione sia trascurabile e che dunque la densità di massa sia di natura lineare. Possiamo definire la densità lineare di massa come:

$$u(x, t) = \frac{\Delta M}{\Delta x} \quad (4.31)$$

Dal momento che il processo di diffusione segue un gradiente di concentrazione, si avrà una distribuzione massiva dalle concentrazioni maggiori alle concentrazioni minori e la variazione temporale potrà essere espressa come:

$$\frac{\Delta M}{\Delta t} = J(x, t) - J(x + \Delta x, t) \quad (4.32)$$

dove J rappresenta il flusso di molecole che attraversa la sezione. Definiamo ora la legge di Fick e utilizziamo (4.31) e (4.32) per per ottenere l'equazione di diffusione. La legge di Fick è data dalla:

$$J(x, t) = -D \frac{\partial}{\partial x} u(x, t) \quad (4.33)$$

dove D rappresenta il coefficiente di diffusione. Intuitivamente, la (4.33) può essere spiegata dal fatto che il flusso è direzionato dalle zone a concentrazione maggiore a quelle a concentrazione minore, ovvero da zone a più alta densità a zone a minor

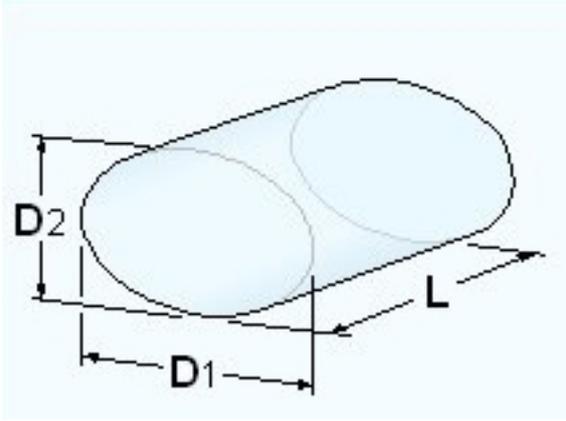


Figura 4.1: Immagine di un cilindro ellittico. D_1 e D_2 rappresentano i diametri nel piano xy ed L rappresenta la lunghezza del cilindro.

densità (da cui il segno meno e la dipendenza dalla variazione di concentrazione $u(x,t)$). D è una costante moltiplicativa e viene detta *di diffusione*. Dalla (4.32) e (4.33) si ha:

$$\begin{aligned} \frac{\Delta M}{\Delta t} &= J(x,t) - J(x + \Delta x, t) = \\ &= -D \frac{\partial}{\partial x} u(x,t) + D \frac{\partial}{\partial x} u(x + \Delta x, t) = \\ &= D \left[\frac{\partial}{\partial x} u(x + \Delta x, t) - \frac{\partial}{\partial x} u(x, t) \right] \end{aligned} \quad (4.34)$$

Tuttavia per la (4.31) vale anche:

$$\frac{\Delta M}{\Delta t} = \frac{u(x,t)\Delta x}{\Delta t} \quad (4.35)$$

pertanto otteniamo, nel $\lim_{\Delta x \rightarrow 0}$:

$$\frac{\partial}{\partial t} u(x,t) = D \frac{\partial^2}{\partial x^2} u(x,t) \quad (4.36)$$

Questa è l'equazione di diffusione, che tuttavia non tiene conto del termine reattivo espresso nella (3.1), che introdurremo in seguito. Riportiamo ora il primo termine della (3.1), per permettere di cogliere l'analogia con (4.36):

$$\frac{\partial}{\partial t} \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} D_A & 0 \\ 0 & D_I \end{pmatrix} \nabla^2 \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} \quad (4.37)$$

Come si può notare sia in (4.36) che in (4.37) si vede la dipendenza che intercorre fra la variazione di concentrazione delle molecole rispetto al tempo e quella rispetto allo spazio. L'unica differenza fra le due sta nel fatto che mentre nella (4.36) il processo di diffusione coinvolge un solo tipo di molecole, nella (4.37) ne coinvolge due tipi (l'attivatore e l'inibitore), potendo dunque essere vista come la notazione compatta di un'equazione del tipo (4.1). Nel paragrafo successivo si vedrà invece una spiegazione intuitiva degli altri due termini che costituiscono la (3.1), cercando

di capire come una soluzione di natura esponenziale (si veda Par. 4.1) possa dare origine a periodicità spaziali e formare i pattern caratteristici descritti nel Cap.2.

4.2.2 Sistemi lineari di diffusione-reazione.

Partiamo considerando il caso di un sistema stazionario in cui non vi è diffusione e supponiamo che A e I siano le concentrazioni di due molecole caratterizzate da tassi di diffusioni differenti: in assenza di diffusione le concentrazioni di A e I variano solamente in funzione della componente reattiva dell'equazione di diffusione-reazione e il sistema può essere scritto nella forma (4.1), sostituendo le generiche variabili x_i con A e I. Possiamo riscrivere (4.1) in funzione delle nuove variabili come segue:

$$\begin{cases} \dot{A}(t) = f(A, I) \\ \dot{I}(t) = g(A, I) \end{cases} \quad (4.38)$$

dove f e g sono generiche funzioni che esprimono la variazione di concentrazione delle molecole A e I in risposta all'aumento del corrispondente antagonista (una funzione che tiene conto anche della *sensitivity* citata nel Cap.3). Come abbiamo visto dai paragrafi precedenti le proprietà delle due funzioni allo stato stazionario sono (in analogia con quanto detto per (4.3)):

$$\begin{cases} \dot{A}(t) = f(A, I)_0 = 0 \\ \dot{I}(t) = g(A, I)_0 = 0 \end{cases} \quad (4.39)$$

Chiaramente nel caso della (4.38), non essendoci nessuna dipendenza dal gradiente, la soluzione sarà omogenea nello spazio - almeno per quanto riguarda il caso stazionario. Supponiamo inoltre che il sistema sia stabile (ovvero che gli autovalori associati siano tutti negativi) e aggiungiamo l'equazione di diffusione (4.36). Aggiungere l'equazione di diffusione implica aggiungere una dipendenza spaziale in funzione di un gradiente di concentrazione. Tuttavia lo scopo dei processi diffusivi è quello di omogeneizzare la concentrazione delle molecole rispetto lo spazio e dunque omogeneizzare i gradienti piuttosto che crearne di nuovi. La questione che ci si pone è se inserendo una parte diffusiva all'equazione (4.38), dove è già presente un termine reattivo, si possa destabilizzare il sistema e generare dunque pattern periodici. Se la risposta è affermativa bisogna ritrovare quelle condizioni per cui ciò avvenga, ovvero quelle condizioni per cui la diffusione possa essere trattata al pari del termine perturbativo ϵ aggiunto in (4.4). Ovviamente le soluzioni per il caso stazionario sono valide anche con l'aggiunta del termine diffusivo, imponendo come condizione al contorno che $\frac{\partial A}{\partial x} = \frac{\partial I}{\partial x} = 0$ per $x = 0, L$ (ovvero flusso nullo agli estremi della sezione in cui avviene la diffusione). Ricollegandoci al problema degli autovalori descritto nel par.4.1 e procedendo allo stesso modo (ricavando dunque la matrice associata al sistema e calcolando il polinomio caratteristico) sostituendo la (4.6) con:

$$\begin{cases} \frac{\partial}{\partial t} A^* = D_A \frac{\partial^2}{\partial x^2} f(A, I)_0 + \frac{\partial}{\partial A} f(A, I)_0 + \frac{\partial}{\partial I} f(A, I)_0 \\ \frac{\partial}{\partial t} I^* = D_I \frac{\partial^2}{\partial x^2} g(A, I)_0 + \frac{\partial}{\partial A} g(A, I)_0 + \frac{\partial}{\partial I} g(A, I)_0 \end{cases} \quad (4.40)$$

si ottiene una soluzione analoga alla più generale (4.8):

$$\begin{cases} A^* = A_0 e^{bt} + \sin(\alpha x) \\ I^* = I_0 e^{bt} + \sin(\alpha x) \end{cases} \quad (4.41)$$

dove b rappresenta l'autovalore relativo alla matrice associata al nuovo sistema e le funzioni sinusoidali sono state aggiunte per esprimere l'evoluzione del sistema in funzione di una dipendenza puramente spaziale. Sostituendo la (4.41) nella (4.40) e semplificando si arriva in forma vettoriale alla:

$$b \begin{pmatrix} A_0 \\ I_0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{\partial f}{\partial A} - b^2 D_A & \frac{\partial f}{\partial I} \\ \frac{\partial g}{\partial A} & \frac{\partial g}{\partial I} - b^2 D_I \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A_0 \\ I_0 \end{pmatrix} \quad (4.42)$$

come riportato in forma più compatta anche in (4.10). Dal momento che i coefficienti della nuova matrice Jacobiana dipendono anche dalle costanti diffusive è chiaro che la stabilità o l'instabilità del sistema, che dipende dal valore degli autovalori, dipende a sua volta dai valori delle costanti D_A e D_I . Nel caso di due sole equazioni si può dimostrare che a garantire l'instabilità è sufficiente che la traccia sia negativa e il determinante sia positivo (non verrà dimostrato, ma si può dire che dipende dal segno degli autovalori soluzione alla forma quadratica del polinomio caratteristico). Riassumendo quanto appena detto le condizioni affinché si verifichi un'instabilità generatrice di pattern in seguito all'introduzione del termine diffusivo sono:

$$\begin{cases} D_A \frac{\partial g}{\partial I} + D_I \frac{\partial f}{\partial A} > 0 \\ \frac{\partial f}{\partial A} + \frac{\partial g}{\partial I} < 0 \end{cases} \quad (4.43)$$

che rappresentano i vincoli sul determinante e sulla traccia rispettivamente. Per quanto riguarda la condizione sulla traccia le opzioni sono due: o entrambi i termini della disequazione sono negativi oppure devono presentare segno opposto. Nel primo caso non viene rispettata la prima di (4.43) (i coefficienti di diffusione sono positivi) pertanto bisogna ipotizzare che le derivate rispetto alle due variabili abbiano segno opposto e cercare dei valori che soddisfino anche la condizione sul determinante. Per convenzione scegliamo che la derivata rispetto ad A sia positiva e che quella rispetto a I sia negativa e in tal caso le implicazioni a livello teorico sulla (4.38) sono le seguenti: se la concentrazione di A aumenta, aumenta pure il tasso di reazione, mentre all'aumentare della concentrazione di I diminuisce il tasso di reazione. Questo porta a identificare le molecole A e I con l'attivatore e l'inibitore rispettivamente: l'attivatore catalizza la reazione sia per sé stesso che per l'inibitore mentre l'inibitore riduce l'attività dell'attivatore. Quanto appena visto ci porta a capire come una soluzione di natura esponenziale come la (4.41) che permette di utilizzare l'algebra lineare per ricavare le condizioni di instabilità del sistema comporti l'effettiva formazione di periodicità - a patto che la (4.43) venga rispettata. Ecco dunque che riportiamo per completezza gli altri due termini della (3.1) per confrontarli con quanto appena esposto:

$$\begin{pmatrix} h_{AA}/\tau_A & h_{AI}/\tau_A \\ h_{IA}/\tau_I & h_{II}/\tau_I \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} \tau_A^{-1} & 0 \\ 0 & \tau_I^{-1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ I \end{pmatrix} \quad (4.44)$$

Il primo termine della (4.44) rappresenta effettivamente un sistema puramente reattivo analogo a (4.38), dove le generiche f e g vengono sostituite da relazioni di dipendenza dalla *sensitivity* e dai tempi di dimezzamento delle molecole - compatibile con il fatto che la reazione dipende dal tasso di reattività delle due specie ed è inversamente proporzionale alla loro vita. Per quanto riguarda il secondo termine, intuitivamente può essere visto come una componente aggiuntiva all'equazione che esprime il tasso di degradazione delle due specie, a prescindere dalla sensibilità reattiva dovuta alla presenza dell'antagonista. Riunificando la (4.37) con la (4.44) dunque si ottiene un'equazione che descrive la perturbazione (termine diffusivo) di un sistema lineare di reazioni molecolari (le matrici dipendenti dalla *sensitivity* e dalla vita molecolare) attorno ad una posizione di equilibrio (si veda (4.6)) in grado di generare, a patto che vengano rispettati certi vincoli (si veda (4.43)), periodicità spaziali.

Capitolo 5

Grazie non è mai scontato

5.1 Alla Famiglia

C'è una sfilza di persone che devo ringraziare per il supporto psicologico, fisico ed emotivo di cui ho avuto bisogno negli ultimi mesi. Ringrazio i miei genitori per avermi supportata e sopportata dall'inizio alla fine, non solo economicamente ma anche umanamente parlando - a volte spronandomi a superare i miei limiti, altre raccogliendo i cocci dei danni fatti quando non ascoltavo i loro consigli. Vorrei dire grazie anche a mio fratello Michele, che diversi anni fa mi aiutò a preparare l'esame di maturità e che non riuscii a ringraziare pubblicamente come invece posso fare ora. Grazie anche a te, Michi. Voglio nominare anche il mio cane Pongo, che mi accompagna ad ogni passo quando sono in casa: grazie per seguirmi incondizionatamente ovunque e per volermi bene disinteressatamente. Grazie per ogni festa che mi hai fatto nell'ultimo periodo, quando presa dalla tesi non ti ho considerato molto.

5.2 Agli amici di Prometeo

C'è poi anche una serie di amici la cui menzione è doverosa, senza di loro non avrei mai superato le ultime sessioni d'esame e non sarei riuscita a scrivere questa tesi. Ringrazio Esmeralda Sali e Oussama Dib per aver studiato con me ore, giorni, settimane, mesi interi anche solo per tenermi compagnia nella frustrante attesa della verbalizzazione dell'esame di turno. Sono stati per me come una seconda famiglia, mi hanno coccolato come se fossi una sorella minore anche quando non sapevo di averne bisogno. Cito anche i fratelli di Oussama, Mohammed e Taha, che mi hanno regalato momenti di ironia e spensieratezza quando mi sentivo triste o giù di morale. Grazie anche a voi.

5.3 Agli amici di Fisica

Vorrei poi ringraziare Giulia Vecchioni e Mirko Paganoni, che negli ultimi giorni di redazione della tesi si sono prestati ad ascoltare ogni mio dubbio, esistenziale e non, e che mi hanno fatto rilassare e riposare il cervello dopo intere giornate passate

a scrivere come fossi una matta in preda a deliri di onnipotenza. Grazie, perché mi avete aiutato a ritrovare un'umanità che non sapevo nemmeno di aver perso. Ah, Mirko: grazie per avermi sistemato il pc, senza di te non avrei avuto gli strumenti necessari a scrivere la tesi...

Vorrei anche ringraziare Shinichi Okamura, che, come Mirko, ha passato giorni a smattare insieme a me davanti al codice, cercando di indirizzarmi su come migliorarne l'efficacia. Arigatou Shinichi, non fosse stato per te avrei impiegato il triplo del tempo.

Per quanto riguarda l'introduzione biologica della tesi, vorrei ringraziare due persone che hanno trascorso ore a spiegarmi cose per dare un senso a tutto il lavoro che stavo facendo. Il primo è Janko Petkovic, che mi ha introdotto magistralmente al mondo del DNA e delle vie di segnalazione di cui purtroppo ho parlato ben poco in quanto la tesi è fisica e non biologica (ma grazie mille J!). Il secondo è Francesco Nanni, che mi ha prestato il suo manuale di biologia molecolare e ha passato ore a rileggere i miei paragrafi cercando di correggerli e/o eventualmente modificarli. Grazie mille anche a te.

5.4 A Graziano Servizi

Infine, ultimo ma non per importanza, vorrei ringraziare il Prof.re Graziano Servizi, che insieme a Mirko è stato il primo ad accendere in me l'interesse per l'informatica (nonostante non fossi poi così portata) e che fino alla fine si è sempre prodigato a spiegare a me, come a tantissimi altri studenti, un qualsiasi argomento legato alla fisica. Mi ha insegnato tanto anche a livello umano ed è diventato il modello cui aspiro diventare io un giorno: una persona che *sa* e una persona che *sa spiegare*, anche a mia nonna potenzialmente. Grazie per avermi insegnato che anche solo il duro lavoro può trasformarsi in talento, e che non esistono persone stupide ma solo persone pigre. Avrei voluto che mi vedessi con la corona d'alloro in testa e che leggesti il frutto di tutti i miei sforzi, perché sei stato tu ad educarmi alla pazienza e alla perseveranza. Grazie anche per avermi fatto capire che dietro ad un buon programma sta in realtà un buon programmatore, che i computer non sono altro che il potere illimitato di un essere limitato nelle mani limitate di un essere potenzialmente illimitato. Per tutto questo, *Grazie Graziano*.

Bibliografia

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, D. Morgan, M. Raff, P. W. Keith Roberts, et al. *Molecular biology of the cell*. 2018.
- [2] M. Arenz, S. Gilb, and U. Heiz. *In The Chemical Physics of Solid Surfaces; Woodruff*. PhD thesis, D., Ed, 2007.
- [3] J. T. Bagnara. Cytology and cytophysiology of non-melanophore pigment cells. In *International review of cytology*, volume 20, pages 173–205. Elsevier, 1966.
- [4] J. V. Beira and R. Paro. The legacy of drosophila imaginal discs. *Chromosoma*, 125(4):573–592, 2016.
- [5] W. H. Burgess and T. Maciag. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annual review of biochemistry*, 58(1):575–602, 1989.
- [6] K. Crump, D. Hoel, C. Langley, and R. Peto. Fundamental carcinogenic processes and their implications for low dose risk assessment. *Cancer research*, 36(9 Part 1):2973–2979, 1976.
- [7] S. F. Gilbert. The epidermis and the origin of cutaneous structures. *Developmental biology*, 6, 2000.
- [8] E. Heller and E. Fuchs. Tissue patterning and cellular mechanics. *Journal of Cell Biology*, 211(2):219–231, 2015.
- [9] D. Heymann and R. Binns. Mutations affecting segment number and polarity in drosophila. *Nature*, 287:795, 1980.
- [10] T. W. Hiscock and S. G. Megason. Mathematically guided approaches to distinguish models of periodic patterning. *Development*, 142(3):409–419, 2015.
- [11] C. H. Müller, A. Sombke, and J. Rosenberg. The fine structure of the eyes of some bristly millipedes (penicillata, diplopoda): additional support for the homology of mandibulate ommatidia. *Arthropod structure & development*, 36(4):463–476, 2007.
- [12] N. B. Nardi and L. da Silva Meirelles. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. In *Stem cells*, pages 249–282. Springer, 2008.
- [13] A. Pozzi, P. D. Yurchenco, and R. V. Iozzo. The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biology*, 57:1–11, 2017.

- [14] T. P. Rao and M. Kuhl. An updated overview on wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circulation research*, 106(12):1798–1806, 2010.
- [15] R. Rieger, A. Michaelis, and M. M. Green. *Glossary of genetics: classical and molecular*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [16] P. Rosati. *Embriologia generale dell'uomo*. Edi. Ermes, 2000.
- [17] A. Russo, C. VanPutte, and J. Regan. Seeley's anatomy & physiology, 2017.
- [18] A. S. Shaw and E. L. Filbert. Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nature Reviews Immunology*, 9(1):47–56, 2009.
- [19] D. L. Stemple. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development*, 132(11):2503–2512, 2005.
- [20] P. Susan Wainwright. Langman's medical embryology. *Journal of Physical Therapy Education*, 24(3):81, 2010.
- [21] C. L. VanPutte, J. L. Regan, and A. F. Russo. *Seeley's anatomy & physiology*. McGraw-Hill Education, 2017.
- [22] E. Voronina. Biob 301.01: Developmental biology.
- [23] C. L. Young, Z. T. Britton, and A. S. Robinson. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology journal*, 7(5):620–634, 2012.