

IL TEST di FLUTTUAZIONE

(S.E. Luria e M. Delbruck "Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance" (1943) *Genetics* vol.28, pp.491-511).

Il risultato di Luria e Delbruck e' uno dei maggiori contributi allo sviluppo della biologia ed ha significativamente modificato la conoscenza nell'ambito della genetica e della biologia molecolare

Breve introduzione storica al problema

- Nel 1866 le **leggi di Mendel** avevano dimostrato l'esistenza di unità discrete (i "geni") trasmesse da generazione in generazione in modo ereditario.
- Nel 1869 viene isolato per la prima volta l'acido nucleico (J. F. Miescher) e sin dai primi del '900 è noto che i cromosomi sono formati da DNA
- Nel 1901 Hugo de Vries propone di attribuire l'enorme varietà osservabile nel vivente ad un cambiamento improvviso nel patrimonio genetico che chiama **mutazione**

I problemi aperti

Negli anni '40 del '900 non é ancora chiarito il rapporto il DNA e i geni.

Un altro problema ancora irrisolto era quello sulla possibilità di unificazione delle teorie sul mondo vivente: infatti si pensava che solo gli organismi superiori contenessero geni, mentre altri organismi piú "semplici", come i batteri, regolassero la loro riproduzione tramite le sole reazioni chimiche delle sostanze che li componevano.

Fatti sperimentali

Sperimentalmente era noto che una cultura batterica pura, se attaccata da un virus batteriofago, in poche ore diventava limpida come se le cellule sensibili al virus fossero state distrutte.

Dopo una incubazione ulteriore di alcune ore (talvolta giorni), la cultura ritornava però torbida, come se si fosse sviluppato un **variante batterico** resistente all'azione del virus (variante originario).

Questo variante, isolato e liberato dal virus, in molti casi mostrava di mantenere la resistenza all'azione del virus anche se coltivato per molte generazioni in assenza del virus: risultava cioè **stabile**.

Il ceppo sensibile assorbiva velocemente il virus e veniva distrutto mentre il variante resistente non mostrava, in genere, alcuna affinità con quest'ultimo.

Il fenomeno dei varianti batterici appariva anche in culture di cloni derivanti da una singola cellula; sebbene tutti i batteri in questo caso dovessero risultare identici, alcuni sembravano essere sensibili all'azione del virus, altri resistenti.

Questo fatto, osservato negli esperimenti, risultava inspiegabile.

I protagonisti

Max Delbruck (1906-1981) nato a Berlino si era formato come fisico alla scuola di Max Born.



Negli anni '30 del novecento, aveva iniziato ad interessarsi a questioni di biologia nei laboratori danesi del fisico Niels Bohr.

A partire dagli anni '40 si era trasferito in America e nel 1941 aveva incontrato Lurija ed aveva iniziato a collaborare con lui su problemi riguardanti il comportamento delle popolazioni batteriche.

Salvador Luria (1912-1991) nato e laureato in medicina a Torino, aveva inizialmente indirizzato le sue ricerche verso gli studi di radiologia.



A Parigi lavora nel laboratorio dei coniugi Curie sui virus batterici. Si trasferisce in America dove nei laboratori di Cold Spring Harbor tenta di individuare, attraverso l'azione di virus, la natura fisica dei geni dei batteri.

I due studiosi fondano *gruppo del fago* (il virus che attacca la popolazione e' detto batteriofago o semplicemente fago).



Max Delbrück e Salvador Luria al
Cold Spring Harbor Laboratory

Le ricerche di Luria e Delbrück, e la collaborazione dei due con Alfred Hershey, ebbero il massimo riconoscimento del Nobel per la Medicina nel 1969.



Max Delbrück
(1906 - 1981)



Alfred D. Hershey
(1908 - 1997)



Salvador E. Luria
(1921 - 1991)

Due ipotesi interpretative

(1) **Ipotesi di immunità acquisita (ed ereditaria)** (o di tipo LAMARCKIANO).

I batteri interagiscono con il virus ed una piccola frazione, predisposta alla sopravvivenza (e' piu' forte o fisiologicamente piu' attrezzata), supera l'attacco.

La progenie di questi batteri e' resistente e non assorbe mai piu' il virus

(2) **Ipotesi di mutazione ereditaria all'immunità** (o di tipo DARWINIANO)

I batteri originari in qualche momento della loro evoluzione hanno subito una mutazione alla resistenza

in modo del tutto indipendente dalla presenza del virus (quindi anche prima dell'immissione del virus)

I loro discendenti, ereditandone il patrimonio genetico, risultano anch'essi resistenti al virus.

COME MAI QUESTE DUE IPOTESI VENGONO DETTE "LAMARCKIANA" E "DARWINIANA"?

Jean Baptiste Monet, chevalier de Lamarck (1744-1829) fu il primo a formulare in modo completo e coerente una teoria evuzionistica.



Due i principi fondamentali della sua teoria evuzionistica

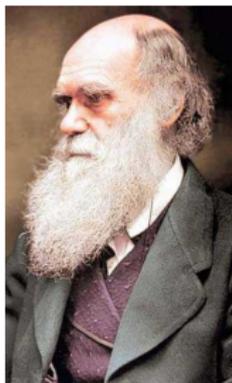
Il principio di uso e non uso degli organi secondo il quale in ogni organismo completamente sviluppato, l'impiego frequente e continuo di certi organi porta alla fortificazione degli organi stessi, mentre l'assenza costante di uso li indebolisce progressivamente e conduce nel tempo alla loro scomparsa.

Principio dell'ereditarietà dei caratteri acquisiti.

"....tutto ciò che la natura ha fatto acquisire o perdere agli individui per influenza delle circostanze alle quali la loro razza si trova da lungo tempo esposta, di conseguenza, per effetto dell'uso predominante di tale organo o del suo costante non uso, viene conservato attraverso le generazioni ai nuovi individui che ne derivano, purché i cambiamenti acquisiti siano comuni ai due sessi o almeno a quelli che hanno prodotto questi nuovi individui".

In accordo con queste leggi, una possibile spiegazione del comportamento delle colture batteriche potrebbe quindi essere la seguente:
la maggioranza dei batteri esposti al virus soccomberebbe (...*per influenza delle circostanze alle quali la loro razza si trova da lungo tempo esposta...*); i sopravvissuti acquisirebbero l'immunità che, essendo comune a tutti gli individui, risulterebbe da quel momento in poi un carattere conservato attraverso le generazioni.

C. Darwin spiega l'evoluzione con la selezione naturale.



La selezione opera favorendo per la sopravvivenza i più adatti all'ambiente. Ovviamente la selezione può favorire solo alcuni se vi sono differenze tra gli individui. Darwin non è in grado di spiegare l'origine delle variazioni individuali, ma coglie il meccanismo fondamentale che spiega perché, nel tempo, alcune caratteristiche del vivente si conservano mentre altre spariscono.

In accordo con questa idea i varianti originari sopravvivono all'azione della selezione operata dal virus perché la mutazione subita in qualche momento del loro ciclo vitale li ha resi più "adatti". Questi batteri sono stabili visto che la resistenza è trasmessa alla progenie.

Luria e Delbruck dimostrano prima teoricamente poi sperimentalmente che solo la spiegazione "darwiniana" del fenomeno risulta possibile

I modelli teorici.

Per formulare due modelli teorici che descrivano il fenomeno in accordo con le due possibili spiegazioni (quella lamarckiana di immunità acquisita e quella darwiniana di mutazione), Lurja e Delbruck osservano che per ipotesi é noto che

(a) se consideriamo C colonie tutte uguali e, in ognuna immettiamo il virus al tempo t_v , l'azione del virus rapidamente distrugge quasi tutte le cellule in tutte le colonie.

(b) dopo un certo tempo in ogni colonia si riforma una nuova colonia dalle poche cellule sopravvissute: come mai alcune cellule sono state risparmiate?

Se la spiegazione corretta del fenomeno é quella lamarckiana, alcune cellule sopravvivono, in **numero casuale e piccolo**, in ogni colonia perché l'attacco le ha "fortificate".

Contando quante sono le sopravvissute possiamo prevedere (con l'aiuto della teoria della probabilità) come varia (fluttua) la loro numerosità media.

Si dimostra che in questo caso la fluttuazione deve essere piccola.

Se la spiegazione corretta é quella darwiniana, alcune cellule (poche) sopravvivono perché hanno **subito una mutazione alla resistenza** in qualche momento della loro evoluzione, anche precedente a t_v . Visto che anche le cellule resistenti evolvono come le altre malthusianamente, si può prevedere quante sono, in ogni colonia, sia le cellule destinate all'estinzione sia quelle resistenti e, anche in questo caso, si può valutare teoricamente come varia (fluttua) la loro numerosità media.

Si dimostra che in questo caso la fluttuazione deve essere grande.

PREMESSE

1. *L'evoluzione dei batteri si descrive con una legge malthusiana*

$$N(t) = N(0)e^{rt}$$

$$N(0) = N_0$$

(r tasso di variazione proprio dei batteri della colonia)

2. *La distribuzione di probabilità di Poisson*

I risultati di misure sperimentali di numerosità, di lunghezza, di durata ecc. vengono, di solito, descritti da variabili numeriche. Ripetendo più volte lo stesso esperimento, accade inevitabilmente, per vari motivi, che i valori ottenuti nelle misure risultino diversi.

In particolare se misuriamo la numerosità di una coltura di batteri originata dal un solo individuo e lasciata evolvere per la stessa quantità di tempo, questa varia da esperimento ad esperimento e ciò dipende non solo dalla precisione degli strumenti che usiamo per il conteggio, ma anche dal fatto che il tempo di fissione può variare da una generazione ad un'altra. In altre parole, per quanto siano accurati gli esperimenti, ripetendo più volte lo stesso esperimento, è praticamente impossibile ottenere le stesse misure ad ogni ripetizione.

Le misure sono **variabili aleatorie**.

Se i valori che assume una variabile aleatoria variano per interi, la variabile aleatoria e' detta **discreta**, se possono assumere tutti i valori reali la variabile e' detta **continua**.

Dato un certo esperimento, supponiamo di aver effettuato un certo numero di misure (variabili aleatorie discrete). Supponiamo che queste misure non siano tutte diverse, ma che alcune di queste, almeno approssimativamente, si ripetano: si puo' calcolare la **frequenza assoluta** di ciascuna misura, cioe' **il numero di volte che la stessa misura si presenta**.

L'informazione sulla frequenza assoluta di una misura non ci dice se questa misura si ripete tante o poche volte; per avere questa informazione bisogna confrontare la **frequenza assoluta della misura con il numero totale delle misure eseguite**: bisogna cioe' calcolare **la frequenza relativa**.

Ad esempio per sapere se una mutazione ad un certo locus é o no frequente in una popolazione é necessario dire quanti individui formano la popolazione. Se N é il numero degli individui della popolazione e $M \leq N$ sono portatori della mutazione, il numero $f = M/N$ e' detto la **frequenza relativa** della mutazione nella popolazione. E' evidente che la frequenza relativa varia da 0 ($M = 0$) a 1 ($M = N$).

Se il numero degli esperimenti che eseguiamo e' molto grande (nell'esempio precedente se $N \rightarrow \infty$), ad ogni particolare misura, cioe' ad ogni valore delle variabili si puo' associare **la probabilita'** con cui questo valore si realizza.

In un certo senso si puo' dire che la probabilita' e' la frequenza relativa su un numero molto grande di prove.

Se ad esempio si dice che la probabilita' di trovare in una coltura esattamente k batteri resistenti ad un certo virus vale 0.002, cio' significa che, considerato un numero molto molto grande di culture, si trovano k batteri resistenti 2 volte ogni mille prove.

Se ad **ogni valore** di una variabile aleatoria si puo' associare la probabilita' con cui questo valore si rileva, si avra' **la legge di distribuzione di probabilita' della variabile aleatoria**. Se la variabile aleatoria e' discreta, la legge di distribuzione sara' discreta.

Gli esempi principali di leggi di distribuzione discrete di probabilita' sono quelli **binomiale o di Bernoulli e di Poisson**.

Nella distribuzione di Bernoulli, dato un certo esperimento, si hanno solo due esiti possibili, incompatibili tra loro (genericamente un "successo", nel secondo un "insuccesso"), se è noto che il successo si realizza con probabilità p , e quindi che l'insuccesso si realizza con probabilità $1 - p$, allora è possibile stimare la probabilità con cui un successo (o insuccesso) si realizza $k = 0, 1, 2, \dots, N$ volte su N ripetizioni dell'esperimento.

Inoltre non è difficile calcolare quante volte, in media, un successo (o un insuccesso) si realizza su N prove (**il valore atteso** del numero di successi). Si può anche valutare **la varianza**

In particolare se X è la variabile aleatoria, nella distribuzione di Bernoulli valore atteso e varianza sono

$$\langle X \rangle = Np \quad V = Np(1 - p)$$

Se siamo interessati alla probabilita' di ripetizione di **eventi molto rari**, cioe' aventi una piccola probabilita' di realizzazione su moltissime ripetizioni ($p \approx 0$, $N \rightarrow \infty$), la legge di distribuzione binomiale diventa la **legge di distribuzione di Poisson**, dal nome del matematico Simeon-Denis Poisson (1781-1840), che per primo l'ha ricavata. Se $\langle X \rangle = m$ e' la media della variabile aleatoria, tale legge e' data da

$$P(X = k) = \frac{m^k e^{-m}}{k!}.$$

Si puo' dimostrare che se la distribuzione di probabilita' e' di Poisson, valgono le seguenti uguaglianze

$$\langle X \rangle = m = V = \sigma^2$$

cioe' se la probabilita' di una variabile aleatoria e' distribuita in accordo con la distribuzione di Poisson, **media e varianza assumono lo stesso valore.**