

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

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.

Le evidenze 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.

Due ipotesi interpretative

(1) **Ipotesi di immunita' 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'immunita'** (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.

Il punto di vista lamarckiano

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



Due i principi fondamentali della sua teoria evoluzionistica

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.

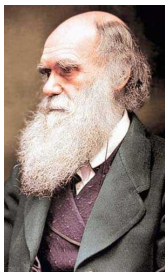
"....tutto ciò che la natura ha fatto acquisire o perdere agli individui per influenza delle circostanze alle quali la loro razza si trova da lungo tempo esposta, di conseguenza, per effetto dell'uso predominante di tale organo o del suo costante non uso, viene conservato attraverso le generazioni ai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

Philosophie zoologique (1809)

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.

Il punto di vista darwiniano

C. Darwin formula la seconda teoria evuzionistica del XIX secolo. Spiega l'evoluzione degli organismi viventi con la *selezione naturale*.



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

In accordo con questa idea, l'interpretazione delle osservazioni sperimentali potrebbe essere:

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

Se, per ipotesi, la spiegazione corretta del fenomeno fosse quella **lamarckiana**, in ogni colonia alcune (**poche**) cellule sopravviverebbero all'attacco del virus, che le ha "fortificate".

In ogni colonia il numero delle cellule sopravvissute dovrebbe essere **casuale e piccolo**.

Come varia questo numero da una colonia all'altra?

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. *Il numero dei sopravvissuti è casuale, cioè non si può prevedere quanti saranno utilizzando un modello deterministico, ma occorre utilizzare uno schema probabilistico: quello di Poisson*

Che cosa è la distribuzione di probabilità di Poisson?

Richiami di probabilità

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, e' 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", ad esempio l'organismo è portatore della mutazione, oppure "insuccesso", ad esempio l'organismo non è portatore della mutazione).

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, si puo' dimostrare che, se la distribuzione di probabilita' e' di Poisson, allora

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

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

Previsione sulla numerosita' dei varianti originari nell'ipotesi di immunita' acquisita (spiegazione di tipo lamarckiano)

All'istante $t = 0$ la colonia ha origine da una sola cellula: $N(0) = 1$

Se t_v e' l'istante in cui il virus viene a contatto con i batteri, il numero dei batteri e'

$$N(t_v) = N(0)e^{t_v} = e^{t_v}$$

(Segue che in C colture identiche vi sono in totale $CN(t_v) = Ce^{t_v}$ batteri).

Dopo l'immissione del virus, si osservano **pochissimi** sopravvissuti (i resistenti). Questi sono **distribuiti in modo casuale** nelle C colture: il numero dei sopravvissuti è una variabile aleatoria discreta che assume inizialmente valori molto piccoli (ad es. in una coltura sopravvivono $r_1 = 10$ batteri, in un'altra ne sopravvivono $r_2 = 5$ batteri ... nella C -esima ne sopravvivono $r_C = 0$ batteri).

Se $r_1(t)$ rappresenta il numero dei resistenti al tempo t nella prima colonia, possiamo affermare che l'evoluzione di $r_1(t)$ è malthusiana ($r_1(t) = r_1(0)e^t$) e che $r_1(0)$ = numero sopravvissuti all'attacco del virus. Quindi, ad esempio, se in una coltura sopravvivono $r_1 = 10$ batteri, $r_1(t) = 10e^t$, se ne sopravvivono $r_2 = 5$ $r_2(t) = 5e^t$ ecc.

Visto che i resistenti sono pochi e casualmente distribuiti nelle colture, segue che la probabilita' p di trovare k resistenti in una coltura e' distribuita con **legge di Poisson** (quindi $\langle X \rangle = V$).

La media aritmetica dei batteri resistenti in C colonie dopo un tempo t e' quindi

$$\langle X \rangle = r_M = \frac{r_1(t) + r_2(t) + \dots + r_C(t)}{C} = \frac{\sum_{i=1}^C r_i(t)}{C}$$

Visto che deve essere $V = \langle X \rangle = r_M$ e quindi $\sigma = \sqrt{V} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^C r_i}{C}}$, si puo' stimare che in ogni coltura il numero di batteri resistenti deve variare nell'intervallo

$$I = [r_M - \sigma, r_M + \sigma] =$$

$$= \left[\frac{\sum_{i=1}^C r_i}{C} - \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^C r_i}{C}}, \frac{\sum_{i=1}^C r_i}{C} + \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^C r_i}{C}} \right]$$

Ad esempio:

Consideriamo $C = 4$ culture generate da una singola cellula.

Il virus viene immesso nella cultura dopo 10 duplicazioni ($t_v = 10$)
(nell'unità di tempo malthusiana)

La numerosità corrispondente è dunque

$$N(10) = N(0)e^{10} = e^{10} \approx 23851$$

cellule in ogni cultura. In $C = 4$ colture si troveranno quindi, in totale,

$$4N(t) \approx 4(23851) = 95404$$

cellule.

Dopo l'immissione del virus il numero delle cellule sopravvissute è piccolo e distribuito in modo casuale da coltura a coltura.

Se dopo l'immissione del virus si osservano, rispettivamente, $r_1 = 50$ $r_2 = 35$ $r_3 = 15$ $r_4 = 20$ cellule resistenti, in totale $S = 120$ cellule resistenti (distribuite casualmente). All'istante iniziale, in media, nelle 4 colture si avranno

$$r_M = (50 + 35 + 15 + 20)/4 = 120/4 = 30$$

cellule resistenti, e la probabilita' di trovare resistenti si può stimare come

$$p(r) = 30/95404 \approx 0.0003$$

(valore molto piccolo).

Dopo 10 cicli vitali quante cellule resistenti dovremmo trovare, in media, in 4 colture?

Visto che

$$r_1(10) = 50e^{10} \approx 1192547, \quad r_2(10) = 35e^{10} \approx 834783,$$

$$r_3(10) = 15e^{10} \approx 357764, \quad r_4(10) = 20e^{10} \approx 477019,$$

il numero medio di cellule nelle 4 colture è

$$r_M = \frac{1192547 + 834783 + 357764 + 477019}{4} \approx 715528$$

La varianza dei resistenti deve essere uguale alla media, quindi $\sigma = \sqrt{V} \approx 846$: il numero delle cellule resistenti deve oscillare tra

$$[715528 - 846, 715528 + 846] = [714682, 716374]$$

(oscillazione, non molto grande, di circa 1700 cellule).

Previsione sulla numerosita' dei varianti originari nell'ipotesi di selezione (spiegazione di tipo darwiniano)

Le cellule possiedono un DNA. Le poche cellule che sopravvivono sono quelle che hanno **subito una mutazione alla resistenza** (in qualche momento della loro evoluzione, anche precedente all'immissione del virus).

Visto che le cellule resistenti evolvono come le altre, malthusianamente, si può prevedere teoricamente quante ce ne saranno in ogni colonia. Si può valutare quindi quante saranno in media e varierà (fluttuerà) la loro numerosità media.

Si dimostra che in questo caso la fluttuazione sarà grande.

PERCHE' ?

Idea della dimostrazione

CASO 1.

t_0 ————— $r = 0$ (no mutazioni, no resistenti)

t_1 — * ————— * ————— $r = 2$ (mutazione, 2 resistenti)

t_2 — *-* ————— *-* — * — (mutazione 1 resistente $r_{tot} = 4 + 1 = 5$ resistenti)

t_3 — *-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-* — (mutazione 2 resistenti $r_{tot} = 12$ resistenti)

Alla generazione t_3 si osservano 12 resistenti

Calcolo del numero dei batteri resistenti ad un qualunque istante t

- Se $r(t)$ è il numero dei batteri resistenti al tempo t , sappiamo che il loro numero varia con legge malthusiana $r'(t) = r(t)$ (la soluzione è $r(t) = e^t$)
- inoltre, ad ogni nuova generazione, una percentuale a (tasso di mutazione) del numero di batteri $N(t)$ della colonia acquisisce, per mutazione, resistenza. Segue che secondo membro bisogna aggiungere $aN(t)$: $r'(t) = r(t) + aN(t)$.

Se t_m è l'istante in cui avviene la prima mutazione, la condizione iniziale è $r(t_m) = 0$.

In definitiva il modello è

$$r'(t) = r(t) + aN(t)$$

$$r(t_m) = 0$$

Visto che la numerosità di tutti i batteri varia in modo malthusiano, si può osservare che $aN(t)$ si scrive nella forma

$$aN(t) = aN(0)e^t = a[N(0)e^{t_m+(t-t_m)}] = a[N(0)e^{t_m}]e^{t-t_m} = aN(t_m)e^{t-t_m},$$

quindi l'equazione diventa

$$r'(t) = r(t) + aN(t_m)e^{t-t_m}$$

$$r(t_m) = 0$$

Si può dimostrare (vedi appunti) che la funzione

$$r(t) = aN(t_m)(e^{t-t_m})(t - t_m) = aN(t)(t - t_m)(*)$$

è **la soluzione** dell'equazione differenziale.

Si verifica che per le popolazioni a batteriche risulta sempre **estremamente basso** (in genere circa uno su un centinaio di milioni).

Si può notare inoltre che il valore di $r(t)$ è proporzionale alla lunghezza dell'intervallo temporale $t - t_m$: tanto maggiore è in una colonia il tempo trascorso dalla prima mutazione, tanto maggiore è il numero dei batteri resistenti. Questo implica che da colonia a colonia il numero dei batteri resistenti potrà variare molto.

Previsione ulteriore: se t e' grande, certamente $t - t_m$ grande e $a(t - t_m) > 1$. Quindi la soluzione $r(t) = aN(t)(t - t_m)$ verifica che

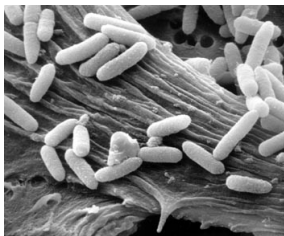
$$r(t) \geq N(t) :$$

Dopo un certo tempo, il numero dei resistenti supera quello dei non resistenti.

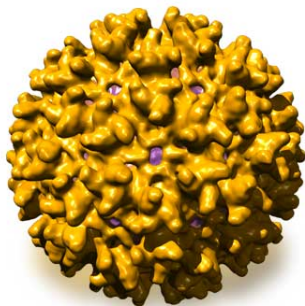
Per decidere quale interpretazione sia corretta bisogna esaminare i risultati sperimentali.

Il protocollo sperimentale.

- I batteri: *Escherichia coli* B



- Il virus batteriofago: di tipo α .



Vengono eseguite serie da 5 e fino a 100 culture in parallelo, con piccoli inoculi uguali. Tutte vengono fatte crescere fino al raggiungimento del titolo massimo.

Le colonie di resistenti vengono individuate in intervalli di tempo diversi, notando che le colonie piu' grandi e piu' piccole vengono osservate rispettivamente dopo 12-16 ore e 18-24 ore dall'incubazione.

Esempio di conteggio dei batteri resistenti effettuato dopo 24-48 ore in una serie di culture

N. culture		100	87	
Batteri resistenti	n. cult	Batteri resistenti	n. cult	
0	57	0	29	
1	20	1	17	
2	5	2	4	
3	2	3	3	
4	3	4	3	
5	1	5	2	
6 - 10	7	6 - 10	5	
11 - 20	2	11 - 20	6	
21 - 50	2	21-50	7	
51 - 100	0	51-100	5	
101-200	0	101-200	2	
201-500	0	201-500	4	
501-1000	1	501-1000	0	
Media per campione	10.12	28.6		
Varianza	6270($\sigma \approx 79$)	6431($\sigma \approx 80$)		
No. resistenti	10 \pm 79	29 \pm 80		

CONCLUSIONE

in ogni esperimento **il numero dei batteri resistenti fluttua molto e il numero medio dei resistenti non e' uguale alla varianza.**

La procedura sperimentale conferma quindi che i batteri, come gli organismi piu' complessi, subiscono mutazioni (devono quindi essere dotati di DNA) e queste possono realizzarsi in ciascuna cellula in qualunque momento dell'evoluzione.

In accordo con l'interpretazione darwiniana, il virus, agendo come fattore selettivo, permette la sopravvivenza solo di quelle cellule che hanno subito la mutazione e della loro progenie.