

Batteri, virus, mutazioni e statistica: l'esperimento di Luria e Delbrück

Roberto Chignola^[1,2], Edoardo Milotti^[2,3]

Una delle più belle pagine della biologia e della statistica applicata è stata scritta da un medico italiano, Salvatore Edoardo Luria (1912-1991), e da un fisico tedesco con la passione per la biologia, Max Delbrück (1906-1981), sullo sfondo della seconda guerra mondiale. Fu grazie ad Enrico Fermi se il primo, ebreo torinese ed amico di Renato Dulbecco e di Rita Levi Montalcini, poté fuggire dall'Europa delle persecuzioni nazi-fasciste ed incontrare negli Stati Uniti il secondo, un berlinese doc già assistente di Lise Meitner e collaboratore di Wolfgang Pauli e di Niels Bohr.

Già alla fine del XIX secolo era chiaro che i batteri potessero avere caratteristiche ereditabili e trasmissibili alla progenie. Queste caratteristiche potevano comparire all'improvviso in una popolazione "pura" di batteri, ed era proprio l'improvvisa comparsa di nuove varianti batteriche a costituire un serio problema scientifico di cui non si aveva alcuna spiegazione. Il punto chiave era (ed è) infatti il seguente: per poter "vedere" ed isolare le nuove varianti batteriche, lo sperimentatore era costretto a far crescere i batteri in un terreno selettivo in grado di eliminare i batteri che non avevano subito variazioni. Da un lato, dunque, era possibile che queste varianti insorgessero nella popolazione come effetto del caso; dall'altro era parimenti possibile che la varianti insorgessero come effetto di un adattamento alla spinta selettiva. Il lettore attento riconoscerà in queste considerazioni la famosa diatriba tra Darwin e Lamarck sulle forze che determinano l'evoluzione delle specie: secondo Darwin le specie variano casualmente ed è poi l'ambiente a selezionare tra tutte le varianti quelle più adatte; secondo Lamarck è l'ambiente che in qualche modo costringe i singoli individui di una specie a rispondere con adattamenti adeguati i quali, poi, si fissano nella popolazione. Furono Luria e Delbrück a fornire (e non solo) la prima prova sperimentale della correttezza della teoria di Darwin [B.1], e per questo furono entrambi insigniti del premio Nobel per la Medicina e la Fisiologia nel 1969.

Il problema biologico

È possibile far crescere i batteri in un terreno di coltura semisolido in modo tale che ciascun batterio cresca isolato dagli altri e formi così una colonia di batteri che costituiscono la progenie di una e una sola cellula. Questa colonia può essere poi prelevata e fatta espandere a piacere per successive generazioni. Esistono poi virus in grado di aggredire i batteri fino ad ucciderli. Supponiamo allora di aver fatto crescere una colonia di batteri. Ad un certo punto aggiungiamo un certo numero di virus e analizziamo quante colonie sopravvivono all'attacco. Osserviamo che nessun batterio sopravvive. Propaghiamo ancora la coltura originaria e aggiungiamo il virus dopo aver atteso più a lungo. Questa volta osserviamo che un certo numero di colonie sopravvive all'attacco. Isoliamo queste colonie, le espandiamo, aggiungiamo di nuovo il virus e osserviamo che tutte le colonie resistono ora al trattamento. Ripetiamo l'esperimento diverse volte con differenti colonie di batteri, e osserviamo che il numero di batteri resistenti varia. Inoltre, osserviamo che le i batteri resistenti ad un tipo di virus sono comunque sensibili, e muoiono, se li esponiamo a un diverso virus.

Che cosa possiamo concludere?

1. nelle colture batteriche attaccate da un virus occasionalmente qualche batterio sopravvive;
2. la resistenza al virus è una caratteristica batterica specifica e può essere trasmessa alla progenie;

3. i batteri resistenti possono essere isolati a partire da batteri sensibili dopo averli coltivati per un certo tempo, e dunque la resistenza al virus è una caratteristica nuova.

Resta ancora da capire se la resistenza al virus sia una caratteristica che compare nella popolazione a seguito dell'aggiunta del virus (ipotesi lamarckiana) o indipendentemente dall'aggiunta del virus (ipotesi darwiniana).

Il modello statistico

Le osservazioni sperimentali possono essere ricondotte, dopo approfondita ponderazione (si veda a questo proposito la bellissima introduzione del lavoro originale), a due sole ipotesi che, per brevità, indichiamo con H1 ed H2:

H1: c'è una probabilità finita, per quanto piccola, che ciascun batterio possa sopravvivere ad un attacco virale. Se il batterio sopravvive trasmette questa caratteristica alla discendenza.

H2: c'è una probabilità finita, per quanto piccola, che ciascun batterio nella popolazione possa mutare e diventare così resistente all'attacco del virus. Non importa se la resistenza sia dovuta all'incapacità del batterio di interagire fisicamente con il virus o a qualche altro meccanismo. Ciò che importa è che la resistenza si trasmette alla progenie (a meno che un batterio non muti nuovamente ritornando ad essere sensibile, ma questa possibilità è estremamente piccola e può essere trascurata in esperimenti sufficientemente brevi come per altro mostra l'esperienza);

Il caso più semplice da trattare è ovviamente H1 e dunque iniziamo da questo. Se p è la probabilità che un singolo batterio possa sopravvivere ad un attacco del virus in un esperimento, allora la probabilità che k batteri in una colonia di n batteri riescano a sopravvivere all'attacco è data da:

$$P_k = \frac{n!}{k!(n-k)!} p^k (1-p)^{n-k}$$

Consideriamo il numero medio di batteri che sopravvivono all'attacco, $\lambda = n \cdot p$, e supponiamo che p sia molto piccola mentre il numero di batteri sia molto grande, $n \gg 1$: con queste condizioni la distribuzione delle probabilità P_k è approssimativamente Poissoniana, e quindi, nell'ipotesi H2 le probabilità sono

$$P_k \approx \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

e la varianza del numero di batteri resistenti in diverse colonie è uguale al valore medio λ .

Per contro, nel caso H2 osserviamo che un batterio ha una certa probabilità (piccola) di mutare ad un qualunque istante *prima* dell'aggiunta del virus: questo fa sì che le fluttuazioni vengano amplificate dal processo di crescita (si veda anche la figura in fondo all'articolo). Ora, per capire come cambino le fluttuazioni nell'ipotesi H2, riproduciamo sinteticamente il ragionamento di Luria e Delbrück. Fino all'aggiunta del virus, i batteri crescono esponenzialmente secondo la legge data da:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \beta \cdot N(t)$$

dove $N(t)$ è il numero di batteri (o se si preferisce la dimensione della popolazione) al tempo t , e β è la costante cinetica di proliferazione. Naturalmente, nulla ci assicura che i batteri resistenti e i batteri sensibili crescano con lo stesso tasso di proliferazione, ma è tuttavia possibile eliminare la costante β nell'equazione precedente prendendo il tempo riscalato $T = \beta t$, dove β è l'opportuna costante cinetica. T è una quantità adimensionale, e in questo modo è possibile considerare per tutti i batteri la legge di crescita universale:

$$\frac{dN(T)}{dT} = N(T)$$

la cui soluzione è $N(t) = N_0 e^{at}$ (N_0 è il numero di batteri al tempo $T = 0$).

A questo punto facciamo le seguenti ipotesi:

1. ogni batterio ha una certa probabilità di mutare durante un suo qualunque ciclo di divisione. Se consideriamo una popolazione batterica, anziché un singolo batterio, questa probabilità diviene a tutti gli effetti la probabilità media di mutazione spontanea per unità di tempo, che indichiamo con a ;

2. le mutazioni in batteri diversi sono indipendenti tra loro. Se ora indichiamo con $\rho(T)$ il numero di batteri mutati al tempo T , ne segue che la dimensione della popolazione non mutata è $N(T) - \rho(T)$, e che in un (piccolo) intervallo di tempo ΔT si verificano

$$\Delta m \approx a [N(T) - \rho(T)] \Delta T$$

nuove mutazioni: poiché la frequenza di mutazioni è piccola e gli eventi sono indipendenti tra loro, la statistica di Δm è Poissoniana, e dunque

$$\text{var } \Delta m = \Delta m$$

Quindi, l'equazione differenziale che regola la crescita della popolazione mutata è

$$\frac{d\rho}{dT} = a [N(T) - \rho(T)] + \rho(T)$$

con la condizione $\rho(0) = 0$, la cui soluzione è

$$\rho(T) = aT \cdot N(T) = aT N_0 e^{aT} = aN(T) \ln \frac{N(T)}{N_0}$$

Poiché assumiamo che gli eventi di mutazione siano indipendenti, e che la popolazione mutata sia piccola, la varianza totale di $\rho(T)$ è data dalla somma delle varianze dei singoli eventi di mutazione, amplificati per il fattore di crescita della popolazione nel tempo che intercorre tra evento di mutazione e osservazione:

$$\begin{aligned} \text{var}[\rho(T)] &\approx \int_0^T e^{2(T-T')} dm(T') = \int_0^T e^{2(T-T')} aN(T') dT' \\ &= aN_0 \int_0^T e^{2(T-T')} e^{aT'} dT' = aN(T) (e^T - 1) \\ &\approx a \frac{[N(T)]^2}{N_0} \end{aligned}$$

(il fattore esponenziale è al quadrato nell'integrale, perché per qualunque variabile aleatoria x , $\text{var}(\gamma x) = \gamma^2 \text{var}(x)$, dove γ è una costante).

A questo punto possiamo riassumere i risultati che abbiamo trovato: nel caso dell'ipotesi H1 (Lamarck)

$$\frac{\sqrt{\text{var}[\rho(T)]}}{\rho(T)} \approx \frac{1}{\sqrt{N(T)}}$$

mentre nel caso dell'ipotesi H2 (Darwin)

$$\frac{\sqrt{\text{var}[\rho(T)]}}{\rho(T)} \approx \frac{\sqrt{a[N(T)]^2/N_0}}{aN(T)[\ln N(T) - \ln N_0]} \sim \frac{1}{\ln N(T)}$$

Queste formule mostrano che l'ampiezza relativa delle fluttuazioni in funzione della dimensione della popolazione di batteri decresce più velocemente nel caso dell'ipotesi H1 che nel caso dell'ipotesi H2, e quindi l'osservazione delle fluttuazioni permette di discriminare tra le due ipotesi.

Risultati

Luria e Delbrück condussero esperimenti preliminari per mostrare le compatibilità del metodo con la teoria, e verificarono che non introducesse ulteriori fluttuazioni impreviste. I risultati dell'esperimento chiave mostrarono che l'ipotesi H1 (ipotesi lamarckiana) doveva essere rigettata in

quanto, inevitabilmente, il rapporto tra varianza e media di batteri resistenti risultava sempre significativamente più elevato dell'unità.

Infine, grazie alla teoria sviluppata, i due autori riuscirono a stimare sperimentalmente, per la prima volta, la costante cinetica di mutazione spontanea dei batteri. Questo risultato fu determinante negli anni successivi per la genetica quantitativa e per l'intera biologia, perché permise finalmente di quantificare la distanza evolutiva tra molecole ed organismi riportando così la biologia nell'alveo delle scienze quantitative.

Conclusioni

Speriamo con questo breve articolo di aver suscitato qualche curiosità attorno al bellissimo, e per certi versi, insuperato, lavoro di Luria e Delbrück. L'articolo merita un'attenta lettura anche per lo stile della scrittura e per la rigosità del ragionamento, ed è un vero peccato sia poco conosciuto. Del resto, ancora oggi i corsi di biologia a livello accademico sono tra i pochi che non prevedono lezioni di storia delle scoperte scientifiche.

Questo lavoro mostra quanto sia importante la matematica per la biologia e, quanto sia fondamentale la collaborazione tra esperti di diverse discipline. Anche modelli relativamente semplici possono portare a dirimere importanti questioni biologiche, e infatti, come ama dire uno di noi: "c'è molta più matematica di quanto sia necessario alla biologia". Ma far dialogare biologi, matematici, fisici, ecc., non è affatto un'impresa semplice.

[1] Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona, [2] Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Sezione di Trieste, [3] Dipartimento di Fisica, Università di Trieste: roberto.chignola@univr.it, edoardo.milotti@ts.infn.it

Bibliografia: [B.1] S.E. Luria and M. Delbrück, Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance, *Genetics* (1943) **28**, 401. Il lavoro è disponibile online al sito: <http://www.genetics.org/cgi/reprint/28/6/491>.

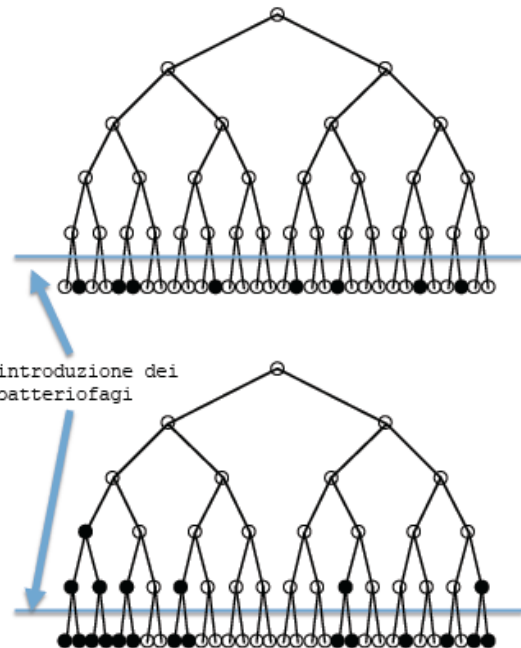


Figura: i due alberi binari rappresentano schematicamente i processi di proliferazione di due popolazioni di batteri (il tempo scorre verso il basso). Nel caso dell'ipotesi H1 (in alto), alcuni batteri rispondono all'introduzione dei virus acquisendo resistenza all'attacco virale (i pallini scuri rappresentano i batteri resistenti); nel caso dell'ipotesi H2 (in basso) le mutazioni sono precedenti all'introduzione dei virus, e le fluttuazioni statistiche sono maggiori, perché vengono amplificate dal processo di crescita.