



**Dottorato di Ricerca in Biologia Vegetale  
XX Ciclo (2004-2007)**

**Modellizzazione e Simulazione di Sistemi  
Biologici: lo Sviluppo della radice di  
*Arabidopsis thaliana***

Coordinatore

**Prof. Aldo Musacchio**

Tutors

**Prof.ssa Maria Beatrice Bitonti**

**Prof. Salvatore Di Gregorio**

Candidato

**Dr. Pietro Brunetti**

Settore scientifico disciplinare: BIO/01

PhD thesis, Doctorate Research Program in Plant Biology Ecology  
Department – University of Calabria XX Cycle (2004-2007)  
Coordinator Prof. Aldo Musacchio

## **Indice**

Introduzione.....	3
1 Il Sistema biologico.....	6
1.1 Anatomia della radice di <i>Arabidopsis</i> .....	6
1.2 Le cellule staminali dell'apice della Radice.....	8
1.3 Lo sviluppo embrionale della radice e del R.A.M.....	11
1.4 La generazione del pattern longitudinale di tessuti.....	12
1.5 La generazione del pattern radiale di tessuti.....	15
1.6 SHORT-ROOT.....	17
1.7 SCARECROW.....	18
1.8 Il circuito SHR-SCR .....	21
2 Il modello computazionale sviluppato.....	27
2.1 Descrizione informale.....	27
2.2 Il Formalismo matematico.....	29
2.3 La funzione di transizione e funzioni di gestione globale.....	34
2.3.1-Variazione di concentrazione delle sostanze.....	35
2.3.2- Lo scambio di sostanze fra automi.....	39
2.3.3 La differenziazione dell'automa.....	40
2.3.4 Duplicazione cellulare – prima parte.....	40
2.3.5 Crescita di dimensioni.....	41
2.3.6 Morte cellulare.....	42
2.3.7 Duplicazione cellulare – seconda parte.....	42
3 Implementazione e simulazione.....	43
4 Conclusioni.....	47
Appendice A – Note implementative.....	54
Descrizione delle classi usate.....	54
Inizializzazione del programma e parametri globali.....	56
La simulazione, ordine dei processi e descrizione.....	57
Appendice B: Elenco pubblicazioni Pietro Brunetti.....	63

**Bibliografia**.....64

## ***Introduzione***

I sistemi biologici sono sistemi complessi il cui “comportamento” è generato da interazioni non lineari fra le parti che li costituiscono. Il comportamento di questi sistemi non è facile da “descrivere” e ancora meno da “predire”, se non in maniera “grossolana”. Nei sistemi biologici, infatti, il comportamento è diverso dalla “somma” dei comportamenti delle singole parti ed **emerge** dalle reciproche interazioni fra queste. Inoltre, in tali sistemi è impossibile, o è possibile a costo di grosse semplificazioni, “slegare” una data situazione da quello che è stata la storia del sistema fino a quel momento. Insomma, sembra che l'essenza del sistema biologico sia legata indissolubilmente alla dinamica dello stesso attraverso le interazioni fra le parti che ne costituiscono l'insieme.

Tale complessità ha comportato che la stessa Biologia si sia sviluppata più come disciplina scientifica a carattere per lo più descrittivo. Le Scienze Naturali, come parte della *Philosophia naturalis*, acquisiscono via via maggiore identità a partire dalla diffusione del sapere laico e dalla creazione delle università nel Medio Evo; la nascita avviene nell'Europa del tardo Rinascimento ed è influenzata dalla riforma religiosa, dall'affermarsi dei moderni mercati, dalla distinzione delle arti liberali (Geymonat 1970). La povertà degli strumenti formali a disposizione di questa scienza ha portato ad un approccio talvolta riduzionista, volto a fornire schemi interpretativi al livello più elementare possibile, introducendo le opportune semplificazioni. Più tardi, la prima rivoluzione industriale rafforzerà queste caratteristiche nel senso di accentuare il suo approccio riduzionista a fronte di una maggiore standardizzazione delle metodologie scientifiche ed un perfezionamento delle strumentazioni di laboratorio.

I sistemi biologici, visti nella loro interezza, descrivono, come accennato,

realità dinamicamente complesse. Fino adesso questi fenomeni sono descritti solo fornendo diverse interpretazioni per ogni scala a cui avvengono: molecolare, cellulare, organismale, fisiologica, evolutiva e via dicendo. La stessa teoria dell'evoluzione si basa molto sulla descrizione e sull'elencazione di prove fisiche che la dimostrino. Solo recentemente è stato possibile per tale teoria fornire strumenti di calcolo (Arbesman et al 2003, per esempio) che riescono ad emulare approssimativamente l'evoluzione animale. Una lenta rivoluzione sta, comunque, portando il biologo ad approfondire i metodi delle sistematica, anche solo per fornire un mezzo o un indice per orientarsi attraverso l'enorme quantità di descrizioni e dati accumulati (si guardi per esempio ai progetti genoma). Mai come oggi, quindi, nella biologia abbiamo bisogno di modelli che non siano più descrittivi, ma predittivi, perché poter prevedere un fenomeno significa sperare di averlo compreso e di poterlo spiegare.

Il mio lavoro di dottorato si basa prevalentemente sulla creazione di un modello di calcolo che fornisca una possibile spiegazione per il fenomeno della differenziazione dei tessuti *cortex* ed *endoderme* nella radice di *Arabidopsis thaliana*. Durante il mio dottorato sono stato coinvolto anche nella creazione di un modello per la simulazione dei processi di infestazione della mosca olearia nelle colture di olivo, per la descrizione della quale rimando al lavoro citato nell'appendice.

Nella parte principale della tesi si discute comunque del modello di formazione del pattern radiale nel meristema radicale (RAM) di *Arabidopsis*. Tale parte è divisa in sezioni.

Nella prima sezione viene presentato lo stato della ricerca sullo sviluppo della radice. In particolare, dalla descrizione anatomica si passerà a chiarire come alcuni fattori di trascrizione permettano il differenziarsi dei diversi tessuti a partire da un gruppo di cellule staminali presenti nella zona meristemica.

Nella seconda sezione viene quindi descritto il modello sviluppato,

specificandone le caratteristiche e spiegando quali siano le funzioni usate per la descrizione dei processi elementari. Come il modello sia stato implementato in linguaggio C++ sviluppando il complesso di programmi è riportato in apposita appendice.

Nella terza parte viene illustrato come siano state implementate ed eseguite alcune simulazioni esemplificative.

Nelle conclusioni sono avanzate alcune critiche riflessioni sulla possibilità che il modello creato, sviluppato e implementato possa evolvere verso un programma che simuli efficacemente lo sviluppo del cortex e dell'endoderme.

## ***1 Il Sistema biologico***

### **1.1 Anatomia della radice di *Arabidopsis***

La radice primaria di *Arabidopsis thaliana* presenta una simmetria isolaterale ed è quindi possibile descriverne l'organizzazione sia in direzione longitudinale sia radiale.

Come tutte le radici, sulla base della attività organogenetica e del gradiente differenziativo, si possono, infatti, in essa distinguere tre zone trasversali. Procedendo in senso basipeto, esse sono:

- zona meristemica,
- zona di distensione,
- zona di specializzazione.

La zona meristemica, posta distalmente, corrisponde all'apice della radice col suo meristema (Root Apex Meristem acronimo **R.A.M.** ), la **caliptra**, e le immediate derivate, che stanno per intraprendere la differenziazione. La caliptra, a sua volta, è formata dalla **columella** (**C.R.C.** per Columella Root Cap), posta centralmente, e dalla fiancata laterale (**L.R.C.** per Lateral Root Cap), toro che circonda l'intera zona meristemica. Ruolo principale della zona meristemica è la produzione reiterata ed organica di cellule derivate, che andranno incontro a differenziazione e origineranno i diversi tessuti. Nella caliptra, la columella premette la percezione della direzione del campo gravitazionale, mentre la fiancata protegge da sollecitazioni meccaniche la zona meristemica, facilitando la penetrazione della radice nel terreno grazie allo sfaldamento delle cellule le cui pareti sono ricche di mucillagini. La zona di distensione, contigua a quella meristemica, è caratterizzata dall'aumento della lunghezza delle singole cellule. In posizione prossimale, infine, è possibile trovare la zona in cui le cellule acquistano la piena differenziazione (emergono i tricomi dell'epidermide e si formano i fasci vascolari), detta **zona di**

**specializzazione o di struttura primaria** (Schieffelbein and Benfey 1991).

L'organizzazione radiale della radice primaria in questa crucifera appare molto semplificata, potendo distinguere tre tessuti esterni concentrici monostratificati, **epidermide**, **cortex** e **endodermide**, ed un cilindro vascolare interno, che contiene, a sua volta, esternamente il **periciclo**, anch'esso monostratificato, che ne delimita i contorni e racchiude la **stele** ad organizzazione diarcata. (Dolan et al. 1993).

Le radici secondarie, che emergono dalla primaria, a partire dalla zona di struttura primaria, nel corso dello sviluppo post-embrionale, conservano grosso modo la topologia appena descritta (Dolan et al. 1993).

Analizzando nel dettaglio il R.A.M. è possibile individuare:

- le cellule del centro quiescente (**Q.C.**), caratterizzate da un ciclo cellulare prolungato e quindi da infrequente divisione cellulare;
- le **cellule iniziali**, che originano i vari tessuti e perpetuano se stesse e si possono, quindi, definire come cellule staminali;
- le cellule precursori di quelle differenziate.

In *Arabidopsis thaliana* il numero delle cellule iniziali è pressoché costante (Dolan et al. 1993 e Kidner et al. 2000) e l'istologia del RAM può essere descritta con molta precisione. In particolare, nel RAM troviamo:

- quattro cellule, poste sullo stesso piano, che vanno a costituire il **centro quiescente** (*Quiescent Centre cell* o **QCc**);
- otto cellule iniziali che circondano il QC e da cui si originano sia le cellule dell'endodermide sia quelle del cortex (**C.E.I. *Cortex/Endodermis Initial***);
- dodici cellule iniziali della columella (*Columella Root Cap Initial*, **C.R.C.I.**), quattro centrali circoscritte da altre otto, tutte poste inferiormente al QC;
- sedici cellule iniziali sia della fiancata sia della epidermide (*Lateral Root Cap/Epidermis Initial*, **L.R.C.E.I.**), poste ad angolo tra le C.E.I.s e le iniziali della columella;
- Le cellule iniziali del cilindro centrale o stele (*Stele Initial*, **S.I.**), poste



superiormente al QC (circa otto sono le cellule iniziali del periciclo, mentre il numero di quelle interne è di dodici).

Il confronto tra la descrizione del RAM fatta da Dolan e colleghi (Dolan et al. 1993) con quella riportata nei lavori “classici” sull'anatomia della radice, non è affatto facile (Baum et al. 2002). Secondo questi lavori, in particolare, è possibile distinguere all'interno della radice delle file di cellule (**cell files**) del medesimo tipo, generate dalle cellule iniziali più “vicine” all'apice. Nel caso di *Arabidopsis*, essendo le iniziali della caliptra diverse da quelle del resto della radice, il meristema è classificato come **chiuso**. Anche se appare piuttosto ambigua la relazione fra *dermatogeno* e il *caliptrogeno* (rispettivamente il tessuto da cui deriva il protoderma e le iniziali della caliptra) e “stona” la presenza del centro quiescente in seno al *periblema* (da cui deriva il cortex). Si preferisce, salvo precisazioni, quindi, fare sempre riferimento al modello descritto da Dolan e colleghi nel 1993 (Dolan et al. 1993). In sezione longitudinale, sulla base della similitudine funzionale, è possibile distinguere, inoltre, degli “strati” di cellule (il termine originale è **tiers**) Spesso, in questa tesi, “cell files” e “tier” saranno preferiti alle corrispettive traduzioni italiane.

## ***1.2 Le cellule staminali dell'apice della Radice***

Dalla descrizione effettuata appare chiaro come, in virtù della sua organizzazione, il R.A.M. assicuri una produzione coordinata e continua dei tessuti fondamentali della radice. Ciò avviene grazie all'attività delle cellule iniziali presenti nel RAM, che originando i vari tessuti e perpetuando se stesse possedendo, come detto, caratteristiche di cellule staminali. Una cellula staminale è, infatti, definita tale per la sua capacità da una parte di auto-perpetuarsi, mantenendo una sorta di specifica identità, dall'altra per la sua potenzialità a differenziare nei diversi tipi cellulari (Weigel and Jurgens 2002). Ogni nuova cellula generata da una cellula staminale può a sua volta o rimanere staminale o differenziare. La differenziazione è determinata da una serie di cambiamenti nel pattern di espressione genica che portano ad una

specializzazione fenotipica e ad una divergenza funzionale. Vi è poi una popolazione di cellule intermedia tra cellule staminali e la loro progenie differenziata; sono le cosiddette “**transit amplifying cells**” (TA cells), ancora capaci di dividersi ma ormai determinate, quindi con una ristretta capacità differenziativa. Esse servono ad amplificare le cellule prodotte da una singola cellula staminale.

Alla base del comportamento di una cellula staminale c'è la sua capacità di andare incontro a **divisione cellulare asimmetrica (A.C.D.)** (McCulloch and Till 2005, Spradling et al. 2001 e Stahl and Simon 2005). Nella divisione asimmetrica, delle due cellule derivate una resta staminale e l'altra differenzia o diventa cellula TA, il destino cellulare è determinato sulla base di un'asimmetrica ripartizione dei determinanti interni o da diversi segnali provenienti dall'intorno cellulare. Tale strategia può essere applicata a livello di singola cellula, o di intere popolazioni cellulari. In questo secondo caso, l'identità di cellula staminale è mantenuta a livello di popolazione cellulare dove ogni singola cellula staminale può dare origine a due cellule staminali, o a due cellule che procedono verso la differenziazione, o una staminale e l'altra differenziata.

Considerata l'immobilità della cellule vegetali, dovuta alla presenza della parete cellulare, la divisione cellulare asimmetrica è il principale meccanismo sfruttato dalle piante per poter promuovere la formazione di tessuti differenti a partire dallo zigote (Horvitz and Herskowitz 1992; e Scheres and Benfey 1999). La formazione del cortex e dell'endoderme avviene, così, tramite due divisioni cellulari asimmetriche. Nella prima di queste divisioni ogni C.E.I, dividendosi secondo un piano anticlinale all'asse di simmetria radiale della radice, dà origine ad una nuova C.E.I. e ad una seconda cellula (nell'originale “*daughter cell*”) “precursore” dell'endoderme e del cortex (C.E.P.) La divisione asimmetrica della C.E.P. secondo un piano periclinale, porta poi alla formazione della cellula “precursore” del cortex e di quella “precursore” dell'endoderme. Anche la formazione dell'epiderme e delle fiancate laterali avviene per A.C.D. (Dolan et al. 1993).

Come avremo modo di vedere, a livello di popolazione è attivo uno stretto controllo intrinseco che definisce i limiti della popolazione di cellule staminali e regola il potenziale di cellule figlie che mantengono lo stato di cellule staminali. Da questa descrizione, appare chiaro come, già nella sua organizzazione il R.A.M. permetta una produzione coordinata dei tessuti fondamentali della radice.

L'idea è che le cellule staminali siano, in questi casi, mantenute in “micro-ambienti” comunemente indicati come **nicchie di cellule staminali** (Spradling et al. 2001 e Watt and Hogan 2000). In ogni nicchia di cellule staminali un gruppo di cellule esprime delle molecole segnale, che percepite dalle cellule staminali ne impediscono la differenziazione. Alla nicchia di cellule staminali appartengono le cellule che producono le molecole segnale e le cellule staminali lo percepiscono.

Nelle piante le cellule staminali risiedono principalmente nei meristemi (Scheres 2007), zone della pianta che permettono la formazione reiterata degli organi. Il meristema dell'apice della radice (RAM) possiede anch'esso la sua nicchia di cellule staminali. Come vedremo, in esso le cellule del centro quiescente costituiscono la sorgente del segnale di non differenziazione e le cellule staminali a diretto contatto, dette iniziali, sono le cellule staminali della nicchia (Sabatini et al. 2003).

Si noti che, nel RAM è possibile distinguere due popolazioni diverse di cellule staminali:

- prossimale, cui appartengono le cellule staminali che duplicandosi generano cellule che possono continuare a dividersi e di fatto costituiscono la zona meristemica della radice, da cui poi si differenzieranno l'epidermide, il tessuto basale e quello vascolare;
- distale, cui appartengono cellule che dividendosi generano cellule che, a loro volta, differenziando formano la columella (van der Berg et al. 1995).

### 1.3 Lo sviluppo embrionale della radice e del R.A.M.

L'ontogenesi di *Arabidopsis*, così come quella di tutte le piante, può essere divisa convenzionalmente in stadi (Jürgens and Mayer 1994), ed è possibile seguire, attraverso questa processione, lo sviluppo di un singolo organo. Subito dopo la fecondazione, lo zigote va incontro alla prima divisione asimmetrica, generando due cellule dal diverso destino ontogenetico; di queste, la cellula detta **E** sarà progenitrice della maggior parte dell'embrione e la restante cellula, denominata **S**, genererà il **sospensore** e l'**ipofisi** (Mansfield and Briaty 1991).

La cellula E e le sue discendenti vanno, infatti, incontro a divisioni cellulari che avvengono in tutti i piani dello spazio, conferendo forma sferica all'embrione. In questo sono inizialmente identificabili due strati di cellule: uno superiore (**upper tier** o u.t.) ed uno inferiore (**lower tier** o l.t.). Successivamente, attraverso divisioni periclinali dal l.t. si originano tre distinti strati concentrici con un numero definito di cellule: protoderma (sedici cellule), promeristema (otto cellule) e periciclo (quattro cellule) (Scheres et al. 1995).

La cellula S e le sue derivate, invece, si dividono sempre lungo lo stesso piano dello spazio, generando una fila di cellule. La prima di queste, in contatto con le derivate della cellula E, costituisce l'**ipofisi**, le altre formano il sospensore. L'ipofisi a sua volta si divide asimmetricamente generando la cellula lenticolare, "precursore" del QC e, inferiormente, quella "precursore" delle iniziali della columella. Entrambe, nelle successive fasi di sviluppo, si dividono periclinalmente in maniera simmetrica (Mansfield and Briaty 1991).

Gli eventi descritti avvengono nello stadio di sviluppo embrionale definito **globulare** (Scheres et al. 1995).

Lo stadio successivo è definito **triangolare** ed è caratterizzato dalla proliferazione delle cellule dell'u.t., che incominciano a formare i **cotiledoni**. Lo strato inferiore, in questo stadio, appare diviso ulteriormente in due strati: uno superiore-inferiore (**upper lower tier** o **u.l.t.**) ed uno inferiore-inferiore (**lower lower tier** o **l.l.t.**). Nella l.l.t. le quattro cellule del procambio subiscono

divisione periclinale, formando quattro cellule del periciclo e quattro cellule del primordio del cilindro vascolare. Le divisioni delle quattro cellule procambiali nel u.l.t. sono, invece, irregolari (Scheres et al. 1995).

L'embrione, entrando nello stadio **a cuore**, possiede gli abbozzi dei cotiledoni e mostra i due assi embrionali. In tale fase, l.l.t. differenzia l'**ipocotile**, la radice embrionale e il meristema della radice. Nell'ipocotile le cellule del promeristema si dividono. Per divisione anticlinale, contemporaneamente, le cellule del protoderma raddoppiano, arrivando al numero finale di cellule dell'epidermide. Le cellule a contatto con i precursori del QC generano i vari tipi di iniziali (Scheres et al. 1995).

Iniziando la fase a **torpedo**, l'embrione possiede un promeristema della radice, con tutte le iniziali e le derivate, tra cui le C.E.P., ed un primordio di sistema vascolare (Scheres et al. 1995).

#### ***1.4 La generazione del pattern longitudinale di tessuti***

Illustreremo brevemente come è determinata verticalmente la posizione della nicchia di cellule staminali del RAM e cosa stabilisce la fine della zona meristemica della radice. Vedremo che alcuni ormoni hanno un ruolo molto importante in tale processo e che esistono similitudini sorprendenti con quanto accade all'apice del germoglio.

Il più importante fattore nella determinazione della posizione verticale della nicchia di cellule staminali è l'auxina. Questa sostanza è un ormone vegetale che media molti processi e risposte fisiologiche tra cui: la risposta ai tropismi o la formazione dei meristemi. Il metodo con cui l'auxina è veicolata nella pianta è detto **trasporto polare**. Nell'apoplasto, comparto costituito dallo spazio intercellulare e pareti, per via del pH acido (5,5), l'auxina, che è un acido debole (acido 3-indol acetico), si trova prevalentemente in forma neutra. In tale forma essa è diffusibile attraverso le membrane e quindi, può passare nel protoplasto, cioè la parte di cellula vegetale delimitata dal plasmalemma, per

libera diffusione. L'eventuale forma anionica presente nell'apoplasto è importata attraverso i trasportatori AUX1. Il protoplasto ha pH neutro (7,0) e l'auxina in tali condizioni tende a dissociarsi in anione ed in un idrogenione. Attraverso pompe protoniche la cellula rimuove dal protoplasto l'idrogenione  $H^+$ , favorendo la dissociazione. In forma anionica dell'auxina non può più attraversare il plasmalemma se non tramite i trasportatori PIN, che sono posizionati direzionalmente nella cellula, ossia solo in alcuni lati della membrana cellulare. Tale disposizione determina il verso al trasporto dell'auxina attraverso la pianta (Michniewicz et al.).

La disposizione dei trasportatori PIN nella radice, di seguito riportata, permette l'accumulo di auxina nella regione presuntiva della nicchia di cellule staminali:

- PIN1 è espresso alla base (cioè verso l'apice della radice) delle cellule vascolari;
- PIN2 è espresso sulla superficie (cioè verso l'apice del germoglio) delle cellule del epidermide e della fiancata e verso la base delle cellule del cortex;
- PIN3 è espresso nei primi due tiers della columella e nel periciclo della zona di distensione, senza particolari direzioni;
- PIN7 segue la distribuzione di PIN3;
- PIN4 è espresso intorno la QC e nelle cellule staminali del cilindro vascolare verso la base.

Tale disposizione permette all'auxina proveniente dal germoglio attraverso il cilindro vascolare di accumularsi verso i primi due tiers della columella e da lì essere trasportata verso il germoglio attraverso l'epidermide e il cortex (Blilou et al. 2005).

Il trasporto polare dell'auxina può essere bloccato utilizzando acido 1-N-

naftilftalamico o NPA. L'uso di concentrazioni molto piccole di NPA ( $10 \mu\text{M}$ ) nel mezzo di coltura porta alla alterazione morfologica della radice, con strati ectopici di cellule che presentano statoliti (tipici della columella) intorno alla parte meristemica del cilindro centrale. Anche i marker molecolari associati al centro quiescente, al cortex e alla fiancata laterale sembrano espressi in maniera anomala. I piani delle divisioni cellulari della radice, inoltre, sono anormali, quindi il blocco della auxina cambia perfino il modo le cellule si dividono. Tale comportamento è ancora più evidente a concentrazioni maggiori di NPA ( $50 \mu\text{M}$ ) nel mezzo di coltura in cui molte più cellule partecipano alla divisione. Se si effettuano delle ablazioni laser del QC, come quelle che descriveremo a breve, si può notare che, dove si accumula la concentrazione massima di auxina si differenzia un nuovo QC. Questo comportamento spiega le disfunzioni tissutali osservate con l'applicazione di NPA (Sabatini et al. 1999).

Due proteine che sono tipicamente espresse nella nicchia di cellule staminali quali

- PLETHORA1 (PLT1) e
- PLETHORA2 (PLT2).

hanno pattern d'espressione coincidenti col massimo di auxina. L'espressione ectopica di questi geni, attraverso promotori generici “tessuto specifici” oppure “forti”, porta a trasformazioni omeotiche delle piante, con radici che si formano nell'ipocotile o nell'apice (Aida et al. 2004). PLT1 e PLT2 inducono a loro volta l'espressione dei geni per i trasportatori PIN, permettendo di instaurare un circuito rafforzativo, in cui la posizione di massima concentrazione di auxina della radice è fortemente regolata e stabilizzata. Sembrerebbe che queste due proteine permettano la localizzazione della nicchia di cellule staminali nella radice (Blilou et al. 2005).

A PLT1,2 si devono aggiungere altre due proteine:

- PLETHORA3 (PLT3) e

- BABY-BOOM (BBM).

Tutte e quattro le proteine appartengono alla stessa famiglia di fattori di trascrizione la loro localizzazione è simile e il loro effetto sembra additivo, ovvero tutte e quattro sinergicamente influenzano la stessa rete regolativa. I mutanti per questi geni mostrano fenotipi tanto più “gravi”, ovvero con regione meristemica della radice tanto più ridotta, quanto il numero di questi geni risulta inespresso. Il quadruplo mutante *null* ha un fenotipo simile ai mutanti che hanno compromesso il sistema di trasduzione dell'auxina cioè non presenta né radice né ipocotile. Questi quattro geni, inoltre, permettono l'instaurarsi di un gradiente di concentrazione dei relativi fattori di trascrizione. A tale gradiente è connessa la zonatura longitudinale della radice, come dimostrano le variazioni omeotiche indotte dalla perturbazione di questo (Galinha et al. 2007).

Infine, anche le citochinine hanno un ruolo nel pattern longitudinale della radice. In particolare questi ormoni delimitano la grandezza della zona meristemica, inducendo la differenziazione. Ciò si traduce in un ruolo antagonista a quello dell'auxina, che induce la proliferazione cellulare (Dello Ioio et al. 2007).

### ***1.5 La generazione del pattern radiale di tessuti***

Fin ora si è chiarito come:

- Il meristema della radice si forma durante l'embriogenesi;
- Il pattern radiale dei tessuti della radice deriva dalla attività proliferativa delle iniziali;
- La radice secondaria presenta lo stesso pattern di quella principale.

L'informazione che permette questa organizzazione può essere generata dall'apice della radice, attraverso specifici geni, oppure può essere generata nell'embrione e perdurare durante la vita della pianta. Se la prima di queste teorie dovesse essere vera, allora, si concluderebbe che esistono due sistemi genetici che regolano l'organizzazione radiale della radice: il primo attivo



nell'embriogenesi e il secondo presente nella vita adulta. Se la seconda teoria, invece, dovesse risultare corretta, dovrebbero essere presenti dei determinanti nelle pareti cellulari che permetterebbero alle cellule di riconoscere la topologia del proprio intorno. In questo secondo caso, potrebbe anche succedere che i tessuti adulti agiscano da stampo nell'organogenesi attraverso segnali “top-down” (Scheres et al. 1994).

Nel meristema della radice di *Arabidopsis*, l'ablazione di cellule con luce laser conduce, nella maggioranza dei casi, alla sostituzione della cellula con una vicina, che acquista le funzioni (o **fato**) della cellula ablata, dimostrando che la differenziazione, in questo caso, non è dipendente dalla linea cellulare, ma dalla posizione. Due sono i casi verificati:

- Eliminando una C.E.P. si ha che la cellula del C.E.I. tramite divisione anticlinale rimpiazzata la cellula perduta e questa in seguito effettua l'ACD.
- Eliminando, invece, tre cellule C.E.P. contigue, una C.E.I. è isolata dalle cellule C.E.P.; si ha allora che questa C.E.I. si divide in modo anticlinale, ma le cellule generate sono incapaci di eseguire ACD. (van den Berg et al. 1995)

Il pattern di differenziazione tissutale delle radici si mantiene grazie a due tipologie di comunicazione: una a corto raggio, che agisce sulla differenziazione cellulare, ed un'altra a lungo raggio, proveniente dai tessuti maturi, che influisce sulla “*determinazione del fato*” delle cellule. Scheres e Berleth, in una review del 1998, insistono sull'idea che possa esistere un “**channeling**” tra le cellule della zona meristema radicale (Scheres and Berleth 1998). Questi autori definiscono channeling, in senso lato, qualunque forma di segnale che sia il risultato di interazioni regolatrici tra le cellule o che derivi da costrizioni fisiche, includendo nella definizione anche la comunicazione cellulare tramite **plasmodesmi**. Ad esempio, abbiamo visto come una fonte di comunicazione top-down sia il trasporto dell'auxina nella radice.

L'influenza a corto raggio è invece mostrata chiaramente da esperimenti

di ablazione laser delle cellule del QC (van den Berg et al. 1997). L'ablazione di tutte e quattro le cellule del centro quiescente porta al rimpiazzo di queste da parte delle iniziali della stele; se, al contrario, viene eliminata una sola di queste quattro cellule, viene influenzato anche il destino delle iniziali della columella, che toccano direttamente il QC. L'iniziale della columella, sottostante alla cellula del QC uccisa, smette infatti di dividersi e differenzia, come è dimostrato dalla formazione in questa cellula degli **statoliti**. Anche le C.E.I.s in contatto con la cellula ablata del QC differenziano, andando incontro a divisione periclinale asimmetrica, come tipicamente succede per la C.E.P. L'ablazione di una cellula del Q.C., al contrario, non induce effetti sulle iniziali della fiancata e dell'epidermide, che non sono a contatto con il QC. Il QC, quindi, inibisce la differenziazione delle cellule a diretto contatto con esso; inducendo le cellule ad effettuare la divisione cellulare anticlinale. Tale inibizione dipende dal citoplasma e non da fattori presenti nella parete cellulare, che rimane illesa dalla ablazione con il laser. Ciò lascia ipotizzare che i plasmodesmi rivestano un ruolo importante nelle comunicazioni a corto raggio. Quest'ultimo esempio è un'ulteriore dimostrazione di come il QC e le iniziali a diretto contatto con esso siano una **nicchia di cellule staminali**.

## 1.6 SHORT-ROOT

**SHORT-ROOT** (*shr*) è una mutazione recessiva di *Arabidopsis thaliana*, isolata e caratterizzata da Benfey e colleghi nel 1993 (Benfey et al. 1993), che determina nella radice la perdita della capacità di crescita indeterminata, una vistosa riduzione di lunghezza della radice primaria ed un contemporaneo aumento del numero di radici laterali, mentre, a livello istologico, si ha la scomparsa di un layer di tessuto dal pattern radiale della pianta. Lo strato mancante nei mutanti *shr* è quello dell'endodermide, essendo assenti la **banda del Caspary**, tipica di questo tessuto. L'espressione di marker tipici del cortex, comunque, dimostra che questo non scompare nel mutante. A causa della perdita dell'endodermide, queste piante non sono capaci di percepire la

direzione della gravità, ovvero sono **agravitotrope**.

È stato anche rilevato che i mutanti *shr* possiedono meno cellule iniziali della stele e nelle rimanenti i marker molecolari tipici si esprimono solo in alcune di esse (Levesque et al. 2006).

A seguito dell'isolamento e del sequenziamento di **SHORT-ROOT** (Helariutta et al. 2000), è stato possibile verificarne l'omologia con SCARECROW, GIBBERELLIN-INSENSITIVE e REPRESSOR of *ga1-3*, e definire la famiglia GRAS a cui questi geni appartengono (Pysh et al. 1999).

Nelle piante adulte wild-type, il gene *SHR* è espresso solo nella stele. L'espressione di questo gene negli stadi embrionali è coerente con quella riscontrata nella pianta adulta. I primi segnali d'espressione, in particolare, si riscontrano, in trada fase globulare, nel procambio del lower tier; tale pattern d'espressione rimane immutato nella fase triangolare. Negli stadi successivi, l'espressione di *SHR* nel procambio coinvolge i cotiledoni (Helariutta et al. 2000).

Facendo esprimere il gene *SHR* sotto il controllo del promotore forte *CaMV35S* (*p35S::SHR*), si generano delle piante che, pur non mostrando alcun alterazione nella stele, producono strati soprannumerari, in gran parte positivi ai marcatori dell'endoderme. Questi strati soprannumerari si trovano intorno alla stele ed esprimono tutti, in maniera ectopica *SHR* (Helariutta et al. 2000).

## 1.7 SCARECROW

La mutazione **SCARECROW**, o *scr*, isolata e tipizzata da Scheres e colleghi nel 1995 (Scheres et al. 1995), risultò successivamente essere co-allelica ad un'altra mutazione detta **pinocchio** o *pic*; queste furono chiamate *scr1* e *scr2* (Di Laurenzio et al. 1996).

Come i mutanti *shr*, anche i mutanti *scr* perdono uno strato di tessuto nella organizzazione radiale e manifestano una ridotta crescita della radice (Scheres et al. 1995). L'analisi dei marker tessuto specifici suggerì che venisse

perso selettivamente il cortex (Scheres et al. 1995), ma studi successivi dimostrarono che, in realtà, si formava un unico tessuto misto, che possedeva caratteristiche antigeniche sia dell'endoderme sia del cortex (Di Laurenzio et al. 1996).

Sulla base di una prima caratterizzazione molecolare del gene mutato, è stata avanzata l'ipotesi che questi traducesse per un probabile fattore di trascrizione (Di Laurenzio et al. 1996); analisi successive del genoma di *Arabidopsis* elevarono *SCR* a “membro fondatore” della famiglia genica di fattori di trascrizione, detta GRAS (Pysh et al. 1999), cui appartiene anche *SHR*.

Le analisi d'espressione appurarono che *SCR* era presente in molti organi oltre la radice, quali i baccelli, i semi e le foglie. Nella radice, in piante wild-type, questo gene è espresso nell'endoderme e nelle cellule progenitrici del tessuto, a partire dalle C.E.I.s. Nelle cellule progenitrici del cortex il segnale proveniente dalla attività di *SCR* scompare a partire dalla divisione periclinale asimmetrica (Di Laurenzio et al. 1996). Il gene *SCR* è espresso anche nel QC (Wysocka-Diller et al. 2000).

I primi segnali d'espressione di *SCR* durante l'ontogenesi di *Arabidopsis* si manifestano nelle fasi iniziali dello stadio globulare, in cui la cellula ipofisaria appare nettamente marcata. A fase globulare inoltrata, l'espressione di questo gene è localizzata nella cellula lenticolare e nei precursori, ancora monostratificati, dell'endoderme e del cortex. Tale espressione continua coerente nell'*upper lower tier* della fase triangolare, in cui si hanno le prime divisioni asimmetriche dei precursori dell'endoderme e del cortex. Avvenuta la divisione periclinale, *SCR*, anche nel contesto appena descritto, appare espresso solo nello strato più interno. Nelle successive fasi embrionali, l'espressione di *SCR* non “tradisce” la sua norma; anche quando nell'ipocotile inizia la seconda divisione asimmetrica, questi si esprime solo nello strato più interno (Wysocka-Diller et al. 2000).

Il pattern espressivo di *SCR* suggerì che, tra le altre funzioni, esso sia

anche in grado di permettere al QC di determinare e mantenere la nicchia di cellule staminali (Sabatini et al. 2003). Nel mutante null *scr-1*, l'espressione di *SCR* è assente nelle cellule del QC, e queste cellule non esprimono tutti i marker tipici, perdendo parzialmente la propria identità tissutale. In questo mutante, il QC non sembra inibire la differenziazione delle iniziali della columella. Sempre in questo mutante, tramite l'induzione di *SCR* solo nel QC, e non in altri tessuti ed altre cellule, il ruolo del QC è ripristinato, ma il pattern radiale resta alterato (Sabatini et al. 2003).

Si può restaurare contemporaneamente, tramite due diversi induttori, sia l'espressione selettiva nel QC sia nelle C./E.I.s e nelle discendenti, ripristinando, oltre all'identità del QC, anche il pattern radiale (Sabatini et al. 2003). Nelle C.E.I.s e nelle cellule discendenti, *SCR* sembra controllare, in maniera cellula autonoma, la divisione asimmetrica (Heidstra et al. 2004).

Usando un complesso sistema che crea mosaici in cui alcune cellule esprimono *SCR* solo dopo uno shock termico, in *scr-4*, un mutante *null*, è osservato che tutte le cellule derivate delle C.E.I.s sono competenti a compiere la divisione periclinale, anche fuori dalla zona meristemica. In queste stesse piante, usando una proteina fluorescente,  $YFP_{H2B}$ , guidata dal promotore di *SCR* ( $pSCR::YFP$ ), come marker dell'endoderme, è stato osservato che alcune cellule derivate dalle C.E.I.s, dopo la divisione periclinale, distribuiscono uniformemente la proteina fluorescente, rivelando che si tratta in realtà di divisione simmetrica. Se la divisione fosse stata asimmetrica, il segnale dovuto alla fluorescenza si sarebbe spento dopo circa quaranta ore dalla induzione. Se ne deduce che la divisione periclinale in sé non è dipendente dalla presenza di *SCR* e che, per separare i destini cellulari in maniera definitiva, è sufficiente una espressione transiente di questo gene (Heidstra et al. 2004).

Al contrario che nel cortex, l'attività del promotore di *SCR* nell'endoderme non si spegne mai (Heidstra et al. 2004).

## 1.8 Il circuito SHR-SCR

Fin dai primi studi (Helariutta et al. 2000), avendo il doppio mutante *scr* x *shr* lo stesso fenotipo di *shr*, apparve chiaro che la mutazione *shr* era epistatica a *scr* e che, pertanto, l'azione di SHR fosse a monte di quella SCR. Stranamente, il pattern d'espressione di questi due geni (Wysocka-Diller et al. 2000), non coincide affatto.

Il pattern d'espressione di una proteina fluorescente fusa con *SHR* sotto la guida del promoter di *SHR* (*pSHR::SHR-GFP*) ha mostrato che questo non coincide esattamente con il pattern di accumulo dei trascritti di *SHR*, essendo il segnale fluorescente presente, oltre che nella stele, anche nell'endodermide, nelle C.E.Ps, nelle C.E.I.s e nel QC (Nakajima et al. 2001). Da quanto detto è chiaro che proteina SHR è mobile. A differenza che negli altri tessuti, il segnale della proteina di fusione proveniente dalla stele è localizzato sia nel nucleo sia nel citoplasma; il segnale negli altri tessuti si localizza, infatti, solo nel nucleo (Nakajima et al. 2001). Il pattern d'espressione della proteina di fusione che è prodotta da *pSCR::SCR-GFP* è, invece, identico al pattern d'espressione di SCR, non essendo questa una proteina mobile (Gallagher et al. 2004).

Nel caso di piante che esprimono una proteina di fusione prodotta da *pSCR::SHR-GFP*, regolata, quindi, dal promotore di *SCR* invece che da *pSHR*, si manifesta un fenotipo simile a quello causato dall'introduzione del gene *p35S::SHR*, con un aumento, sia pure più ordinato rispetto a quest'ultimo, dei layers di endodermide. I layer soprannumerari di questa pianta geneticamente modificata esprimono i marcatori dell'endodermide, eccezion fatta per l'ultimo strato, che esprime i marcatori del cortex. In queste piante, sono inoltre presenti, al di sopra della columella, anche strati soprannumerari che esprimono i marcatori del centro quiescente. È stato inoltre osservato che, in alcuni casi, il segnale di *SHR-GFP* si localizza anche nell'epidermide (Nakajima et al. 2001).

Nel mutante null *scr-1*, il costrutto *pSCR::SHR-GFP* non ha alcun effetto

sul fenotipo; l'espressione di SCR, infatti, determina la divisione asimmetrica, essenziale per la proliferazione dei layer ectopici. Nei nuclei del layer "ibrido" di questo mutante si localizza SHR-GFP, ne consegue che SCR non è richiesto per la mobilità di SHR. Se ne ricava, anche, che l'SHR già trasportato, proveniente da uno strato interno, non può compiere il "salto" verso lo strato successivo (Nakajima et al. 2001).

Chiarito che il fattore di trascrizione SHR è mobile, non rimane che determinarne le condizioni che ne permettono mobilità. Vi sono indicazioni che la contemporanea localizzazione di SHR nel citoplasma e nel nucleo sia necessaria per la sua mobilità, come verificato nelle cellule della stele nel wild-type (Nakajima et al. 2001). Costringendo SHR, attraverso la fusione con la proteina GFP<sub>nls</sub>, ad avere una localizzazione esclusiva nel nucleo il movimento verso lo strato esterno cessa. La proteina del mutante prodotta da *shr-5*, localizzabile solo nel citoplasma delle cellule della stele, è immobile (Gallagher et al. 2004). Il fenotipo del mutante *shr-5* è "drasticamente" simile al mutante *shr-1*. Lo studio nel dettaglio della sequenza mutata ha rilevato che la proteina mutante possiede una isoleucina al posto della treonina 289. Il folding della proteina mutata risulta non alterato e l'utilizzo di strumenti bioinformatici ha permesso di identificare la treonina come un possibile sito di fosforilazione (Gallagher et al. 2004).

Nelle piante, esistono molti fattori di trascrizione la cui mobilità è permessa dai plasmodesmi. Il trasporto attraverso i plasmodesmi può essere sia passivo, avvenendo secondo un gradiente chimico e non alterando le dimensioni del poro del plasmodesma, sia attivo, sfruttando per il trasporto fonti di energia chimica e alterando l'escursione del poro del plasmodesma (Oparka 2004). Il trasporto di SHR, visto il probabile sito di fosforilazione, è quasi sicuramente attivo (Gallagher et al. 2004).

Naturalmente non tutti i tessuti delle piante permettono il trasporto di SHR. Per determinare come SHR varia a seconda dei tessuti, questa proteina è stata fatta esprimere ectopicamente utilizzando promoter tessuto-specifici. È

stato così verificato che SHR non può muoversi dalle cellule compagne del floema, dall'epidermide e dalla fiancata laterale (Sena et al. 2004).

Nelle piante che esprimono *pSCR::SHR*, esprimendo anche *pSHR::SHR-GFP*, il segnale fluorescente si localizza nel citoplasma e nei nuclei SHR delle cellule della stele ed anche nel citoplasma del primo strato di endodermide, confutando l'idea che essa sia non idonea al trasporto di SHR (Sena et al. 2004).

Esprimendo SHR sotto il controllo del promotore del gene WEREWOLF (*pWER::SHR-GFP*) che si esprime nell'epidermide, nella fiancata della caliptra, ma anche nella iniziale comune di questi due tessuti, si è indotta la formazione di una serie di strati soprannumerari, nonostante la proteina SHR ectopica sia immobile. Gli strati esterni soprannumerari indotti presentavano marker dell'endodermide, quindi, la mobilità non è un prerequisito per l'attività di SHR; al contrario, lo è il contesto cellulare, in quanto la trascrizione da parte di questo fattore avviene in cellule che hanno caratteristiche staminali. Nelle iniziali dell'epidermide e della fiancata, infatti, è possibile provare la presenza di SCR in risposta a SHR (Sena et al. 2004).

In *scr-1*, il costrutto *pWER::SHR-GFP* non sortisce effetti; evidentemente, l'effetto di SHR è mediato da SCR. In tali mutanti, SHR, si muove verso i tessuti interni, al contrario che nel wild-type. SCR, quindi, condiziona la mobilità di SHR (Sena et al. 2004). La continua espressione di SCR nell'endodermide previene il movimento verso l'esterno di SHR. Si è visto, infatti, che i fattori di trascrizione SCR e SHR interagiscono per formare il complesso SCR\*SHR che localizza il segnale di SHR nel nucleo e impedendo a SHR di passare nel citoplasma e muoversi attraverso i plasmodesmi (Cui et al. 2007).

Da quanto finora esposto risulta che SCR induce la ACD nelle discendenti delle C.E.I.s e determina il mantenimento e l'identità delle cellule staminali. Se in un mutante *shr* null SCR viene indotto ad esprimersi esclusivamente nel presunto QC, la funzionalità di queste cellule non viene ripristinata. Da ciò si deduce che in questo tessuto SHR agisce tramite l'induzione di SCR, ma ha anche funzioni autonome (Sabatini et al. 2003).



È stato inoltre verificato che l'attività di pSCR::GFP in un mutante null per SCR è differente a seconda del tipo cellulare: è infatti nulla nelle cellule del QC, nelle C.E.I.s e nelle C.E.P.s; mentre nell'endodermide, si può osservare un lieve segnale. Evidentemente, nell'endodermide SCR è sotto una auto-ragolazione. In aggiunta, il segnale risultante dall'espressione indotta di SCR:GFP nell'endodermide perdura indefinitivamente, mentre nelle altre cellule scompare dopo circa quaranta ore. Nel QC, nelle C.E.I.s e nelle C.E.P.s, pSCR è, quindi, costantemente attivato da SHR proveniente dallo stele (Heidstra et al. 2004).

Nelle cellule che normalmente trascrivono SCR, questi induce l'identità cellulare, come ulteriormente provato dal fatto che nel mutante null per *scr* si attivino contemporaneamente sia nel QC, sia nelle C.E.I.s, sia nelle C.E.P.s, promoters specifici dell'endodermide e del cortex, mentre nel wild-type questo non accade (Heidstra et al. 2004).

Per quanto attiene la rete di proteine regolate direttamente o indirettamente da SHR, questa include fattori di trascrizione, proteine kinasi o altre proteine segnale e proteine legate al metabolismo degli ormoni o alla trasduzione del segnale ormonale. Queste tre grosse categorie sono connesse tramite altri circuiti regolativi e si influenzano l'un l'altra (Levesque et al. 2006).

Sulla base di quanto riportato il ruolo di SHR nello sviluppo della radice può essere così riassunto:

- partecipa alla differenziazione di alcuni tessuti (cortex, endodermide e tessuto vascolare);
- determina il pattern radiale della radice;
- permette il mantenimento delle staminali.

Il ruolo di questa proteina varia, comunque, a seconda del tessuto in cui agisce, permettendo o fenomeni differenziativi o il mantenimento di una identità (Levesque et al. 2006). Tutto ciò pone degli interrogativi: in che modo la funzione di SHR dipende dal contesto cellulare? Ovvero, come può SHR

distinguere se una cellula è del centro quiescente o se è una iniziale del cortex? Deve pertanto esistere nelle cellule una qualche “entità” che permetta a SHR di distinguere il contesto. Ottime candidate a svolgere questo ruolo sono due proteine “Zinc finger” che hanno pattern di espressione quasi coincidenti con la localizzazione del fattore di trascrizione SHR. Queste due proteine sono denominate JACKDAW (JCK) e MAGPIE (MGP). JCK è molto espressa nelle cellule del QC e nelle cellule del tessuto fondamentale, mentre è poco espressa nell'endoderme e nel cortex. MGP, scoperto come proteina direttamente regolata da SHR (Levesque et al. 2006), è espressa nelle iniziali della stele e nelle cellule del tessuto fondamentale. Le proteine SHR, oltre ad interagire fra loro, interagiscono anche con MGP e JCK, formando complessi specifici dipendenti dal tipo cellulare e regolando, di conseguenza, geni diversi. Si noti che i fattori di trascrizione SCR, SHR, JCK e MGP si influenzano l'un l'altro, sia regolandosi a vicenda, che determinando la localizzazione cellulare o il trasporto attraverso i plasmodesmi (nel caso di SHR) (Welch et al. 2007).

Il gene che permette alle nicchia di cellule staminali del RAM di funzionare è probabilmente *WOX5* (Wuschel-related Homeobox 5), che codifica per una proteina presente prevalentemente nel centro quiescente e svolge un ruolo analogo a quello di *WUS* (*WUSCHEL*), espresso nell'apice del germoglio. L'espressione di *WOX5* è modulata dai fattori di trascrizione SHR/SCR ed anche dalla auxina. Le mutazioni di questo gene implicano il blocco dello sviluppo della radice e la differenziazione delle cellule iniziali della columella. Se si over-esprime *WOX5* si osserva che le derivate TA destinate a divenire cellule della columella non differenziano ma entrano di continuo in divisione. Si è visto inoltre che l'induzione ectopica di *WOX5* può revertire il mutante *wus* e viceversa, confermando che perfino le sequenze a cui questi fattori di trascrizione si legano sono simili (Sarkar et al. 2007).

Effetto pressoché opposto a *WOX5* ha il gene *RETINOBLASTOMA-RELATED* (*Rbr*) che, come evidenzia il nome, è omologo al gene

RETINOBLASTOMA dei mammiferi. La mutazione di questo gene è letale per la pianta in fase aploide. Nello sporofito, invece, se se ne riduce l'espressione si induce nei meristemi un aumento del numero delle cellule staminali senza che aumenti il volume totale occupato dall'intero meristema; in pratica si producono cellule più piccole che entrano facilmente in divisione. Le linee fortemente silenziate presentano più strati di cellule iniziali della columella anche se la durata del ciclo cellulare resta invariata. Quando si over-esprime RBR si osserva che il patrimonio di cellule staminali scompare e che tutte le cellule differenziano. Per quanto attiene la relazione tra RBR e SCR, SHR è stato dimostrato che RBR è epistatico a SHR e PLT mentre SCR è epistatico a RBR. E' pertanto possibile asserire che RBR agisce a monte di SHR e PLT e che SCR influenza l'espressione di RBR (Wildwater et al. 2005).

## **2 Il modello computazionale sviluppato**

### **2.1 Descrizione informale**

Si incomincia descrivendo il modello informalmente, in modo da avere una idea generale dei formalismi e delle rappresentazioni adottate.

Nel nostro formalismo, una rete di automi interagenti rappresenta l'apice meristemico della radice e ciascun automa una cellula. La presenza di parete comune tra due cellule è modellizzata tramite un legame fra automi. Il tempo nel modello non è continuo ma discreto; ogni “quanto” di tempo è definito come “passo dell'automa”.

La principale differenza fra il nostro formalismo e gli automi cellulari (CA) (Di Gregorio and Serra 1999), consiste nel fatto che nel nostro caso gli automi finiti, cosiddetti automi elementari, non hanno numero di legami costante nel tempo e nello spazio. In altre parole, la nostra rete di automi finiti potrebbe non essere “regolare” ed è “mutabile”.

Nel nostro sistema, inoltre, gli automi finiti possono “duplicarsi”, contrariamente a quanto succede agli automi finiti componenti l'automa cellulare.

Nel seguito con la parola automa si intenderà esclusivamente l'automa finito, salvo specificazioni.

Nei primi lavori di descrizione anatomica della radice si distinsero piani orizzontali di cellule o “tiers” e file verticali di cellule o “files” (Baum et al. 2002), si è trovata comoda questa rappresentazione e con qualche modifica è stata adottata. Nel modello si fa riferimento a files per indicare un raggruppamento di automi che siano legati tramite verso “top-down” e che rappresentano cellule generate da una singola iniziale.

All'adozione dei “tiers” si è preferita la formalizzazione di “layers”, strati

di automi che definiscono particolari tessuti. Questi possono essere “piegati” a formare strutture cilindriche o pile di piani. Un automa/cellula che appartiene a un tier apparterà anche a un layer. La principale differenza fra layer e tier è il fatto che le cellule costituenti un layer non per forza, anzi quasi mai, soggiacciono sullo stesso piano. I layers sono usati solo per la formazione della configurazione topologica iniziale.

Ciascun cellula condivide con gli altri automi dei legami, come si è detto. Questi legami sono comunque ordinati secondo delle orientazioni. Esistono due sistemi di orientazioni:

- alcuni automi utilizzano un primo sistema di orientazione se da un cellula è possibile generare gli altri automi del layer utilizzando le operazioni di traslazione, in tal caso le orientazioni disponibili sono: “verso sopra”; “verso sotto”; “verso destra”; “verso sinistra”; “avanti”; “indietro”;
- altri automi utilizzano un secondo sistema se partendo da un cellula si generano gli altri automi del layer usando le operazioni di rotazione, in tal caso le orientazioni in cui dividiamo i legami sono: “verso sopra”; “verso sotto”; “verso antiorario”; “verso orario”, “verso il centro” e “verso fuori”.

In tutte e due i casi arbitrariamente si dispone che “verso sotto”, indichi la direzione verso la punta della radice. La scelta di dividere i legami per orientazioni permette di semplificare i calcoli durante la simulazione della duplicazione cellulare.

Ciò scritto si adatta bene a descrivere l'anatomia tissutale della radice, ma poco spiega a riguardo la dinamica di questa. Il comportamento dell'intera radice, nel nostro modello, non è formalizzato direttamente, ma è un insieme di proprietà “emergenti” dai processi di calcolo dei singoli automi, ovvero si vuole comprendere questo organo, la radice, formalizzando le attività cellulari, nell'ottica di un approccio cellula-centrico.

## 2.2 Il Formalismo matematico

Il formalismo adottato è il seguente:

$$SrAT = (L, S, P, \tau, Z)$$

dove:

- **SrAT** sta per “Self replicant Automata Tissues – Tessuti di automi autoreplicanti”;
- **L** è l'insieme finito degli automi che come abbiamo detto rappresentano l'organo; ogni automa rappresenta una cellula

$$L = \{c_0, c_1, \dots, c_n\},$$

$c_0, c_1, \dots, c_n$  sono gli automi appartenenti a **L**;

- **S** è l'insieme finito degli stati che può assumere il singolo automa. Questo insieme è definito dal prodotto cartesiano degli insiemi di sottostati:

$$S = S_{type} \times S_N \times S_{dim} \times S_q \times S_{ic} \times S_{life}.$$

Alcuni di questi sottostati definiscono caratteristiche dell'automa che rimandano a proprietà delle cellule vegetali. Elenchiamo ora l'insieme di sottostati:

- **S<sub>type</sub>** è usato per definire il tipo di automa, nel nostro caso tale sottostato è in relazione al tipo cellulare, nella *Tabella1* uno sono espressi i valori di **S<sub>type</sub>** utilizzati nel modello;

Valori di <b>S<sub>type</sub></b>	Descrizione
QC	Quiescence Centre, cellule del Centro Quiescente
Gtsc	Ground Tissue Stem Cells, cellule iniziali del cortex e dell'endoderamide
Gdc	Gtsc daughter cell, derivanti dalla duplicazione di quelle Gtsc, non utilizzate
Lsc	Lateral Stem Cell, cellule iniziali della fiancata e dell'epideramide
Csc	Columella Stem Cell, cellule iniziali della columella
Ssc	Stele Stem Cell, cellule iniziali dell'endoderamide
Stele	Cellule della stele

Valori di $S_{type}$	Descrizione
Pericycle	Cellule del periciclo, non utilizzate
Endodermis	Cellule dell'endoderamide
Cortex	Cellule del cortex
Ibrid	Cellule che hanno caratteristiche ibride fra cortex e endoderamide, non nella configurazione iniziale
Epidermis	Cellule dell'epideramide
Columella	Cellule della columella
Lateral	Cellule della fiancata laterale

Tabella 1: Insieme dei possibili valori di  $S_{type}$

- $S_N$  definisce i rapporti di vicinanza della cellula corrispondente ed è espresso come un insieme finito di legami,  $S_N = \{l_0, l_1, \dots, l_M\}$ , nella forma più semplice ogni legame è definito a sua volta da una terna di valori,  $l_i = \{c_i, con_i, sd_i\}$ , che indicano rispettivamente l'automa/cellula in relazione di vicinanza, il lato che orienta la vicinanza e la conduttanza al trasporto di quantità dall'automa/cellula a questo  $i$ -esimo automa vicino. Come abbiamo precedentemente esposto, il legame di vicinanza per il nostro modello è da ricondurre alla condivisione di parete a contatto fra due cellule. La conduttanza è un valore che riconduciamo sia alla estensione della parete in comune sia alla quantità di plasmodesmi, lo esprimiamo come frazione di 1, per i valori si fa riferimento a i lavori di (Zhu et al. 1998). In tabella2 illustriamo i possibili valori di  $s_d$  in *Tabella 2*.

Valori di $S_d$	Descrizione
Right	
Left	
Front	
Behind	
Top	
Botton	
ACW	Anti ClockWise, verso antiorario
CW	ClockWise, verso orario
Prox	Proximal, prossimale
Dist	Distal, distale

Tabella 2: Insieme dei possibili lavori di  $S_d$ .

- $S_{dim}$  è una terna di valori che esprime le dimensioni relative alla cellula approssimandola ad un parallelepipedo.
- $S_q$  è espresso come il prodotto cartesiano di  $x$  valori, dove  $x$  è finito, ed ogni valore esprime la concentrazione di una specifica componente nella cellula relativa all'automa. Nel nostro caso  $x$  è uguale a 3, per rappresentare le concentrazioni cellulari di fattori di trascrizione SHR, SCR e del complesso SHR\*SCR.
- $S_{ic}$  indica l'età della rispettiva cellula, espresso in numero di passi dell'automa.
- $S_{life}$  permette di stabilire se uno specifico automa sia la formalizzazione di una cellula. Sono possibili tre valori, *alive* indica un'automa correlato ad una cellula, *unborn* invece serve ad indicare che l'automa fa parte di una riserva da utilizzare qualora si debba simulare la duplicazione cellulare, in tal caso uno di questi automi viene legato agli altri tramite rapporti di vicinanza e cambia il suo stato in *alive*. Infine, *zombie* indica situazioni intermedie fra questi due stati e potrebbe essere utilizzato se si simula morte cellulare.



- $P$  è l'insieme finito dei parametri globali, relativi ad alcune proprietà globali del sistema complesso, sia in relazione alla scala spaziale e temporale prescelta ai fini della modellizzazione del fenomeno, sia per quanto riguarda alcune proprietà che si possono considerare costanti nell'evoluzione spaziale e temporale del fenomeno stesso.

$$P = \{n_{st}, t_{step}, tD, vD, l_{shr}, T_{SCR-SCR}, T_{SCR-SHR}, h_{SCR}, K_{SCR*SHR}, \\ thr_{SHR*SCR}, thr_{SCR}, MRd\_SHR, Bd\_SHR, Sd\_SHR, \\ MRd\_SCR, Bd\_SCR, Sd\_SCR, thr_{diff}, M, x_q\}$$

I più semplici fra questi precisano alcune caratteristiche della configurazione di calcolo, come il passo temporale o il numero totale di automi disponibili, altri parametri specificano per costanti utilizzate nelle dinamiche dei singoli processi. In *Tabella 3* una lista dei parametri.

Elementi di P	Descrizione	Inizializzazione
$n_{st}$	Numero di passi nella computazione.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$t_{step}$	Durata in minuti di un passo di calcolo,	Ricavato implicitamente dagli altri parametri globali.
$tD$	Tempo minimo in numero di passi che un'automa/cellula trascorre per essere pronto alla duplicazione.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$vD$	Volume minimo che un'automa/cellula deve possedere per intraprendere la duplicazione.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$\lambda_{SHR}$	Contenuto di SHR nelle cellule della stele.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$\lambda_{SCR}$	Concentrazione a $t = 0$ di SCR nelle cellule che "normalmente" lo producono.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$T_{SCR-SCR}$	Forza con cui SCR influenza la produzione di se stessa.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$T_{SCR-SHR}$	Forza con cui SHR influenza la produzione di SCR.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$h_{SCR}$	Produzione basale di SCR.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$K_{eq}$	Costante di equilibrio per la formazione	Inizializzato dall'utente all'avvio del

Elementi di P	Descrizione	Inizializzazione
	del complesso SHR*SCR.	programma.
$thr_{SHR*SCR}$	Soglia di concentrazione cellulare del complesso SHR*SCR per la manifestazione di fenomeni cellulari ad esso correlati	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$thr_{SCR}$	Soglia di concentrazione cellulare di SCR per la manifestazione di fenomeni cellulari ad esso correlati	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$MRd\_SHR$	Rate massimo per passo di degradazione di SHR.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$\underline{Bd\_SHR}$	Livello basale di SHR distrutto nel passo.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$Sd\_SHR$	Forza con cui SHR è distrutto nel passo.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$MRd\_SCR$	Rate massimo per step di degradazione di SCR.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$\underline{Bd\_SCR}$	Livello basale di SCR distrutto nello step.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$Sd\_SCR$	Forza con cui SCR è distrutto nello step.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$thr_{diff}$	Soglia di concentrazione cellulare di SHR necessaria perché ne avvenga la diffusione.	Inizializzato dall'utente all'avvio del programma.
$M$	Numero massimo di link per automa, ovvero il numero massimo di cellule che possono esser a contatto con un'altra.	Definito nel programma.
$x_q$	Numero di sostanze cellulari considerate nel modello.	Definito nel programma.

Tabella 3: Insieme dei parametri globali usati nel modello.

- $\tau$  è la funzione di transizione dell'automa. Questa è applicata parallelamente per ogni automa in ogni passaggio di calcolo. La funzione di transizione è composta da un insieme finito di funzioni elementari.

$$\tau = \{\sigma_1, \gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4\}$$

- $Z$  è l'insieme delle funzioni globali, usate per modificare l'intera configurazione del modello. Queste funzioni, quindi, non agiscono sul singolo automa/cellula.

$$Z = \{\zeta_0, \zeta_1\}$$

In Tabella 4 una breve lista delle funzioni elementari che costituiscono  $\tau$  e delle funzioni che costituiscono Z. Nel prossimo paragrafo sarà esposta una trattazione più dettagliata.

Funzioni	Descrizione
$\sigma_1$	per una cellula calcola la variazione di sostanze dovuta alla degradazione o alla produzione di queste.
$\gamma_1$	implementa lo scambio di sostanze fra cellule.
$\gamma_2$	permette di simulare la differenziazione o la de-differenziazione di una cellula, ovvero il cambio di tipo della cellula.
$\gamma_3$	descrive i cambiamenti di una cellula dovuti alla sua duplicazione.
$\gamma_4$	si usa per simulare le variazioni di dimensione di una cellula.
$\zeta_0$	“uccide” l'automa/cellula cambiando $S_{life}$ . Simula la morte cellulare
$\zeta_1$	permette di inserire nella configurazione di automi corrispondenti alla radice, un altro automa, ovvero di implementare la nascita di un'altra cellula per duplicazione. Agisce con $\gamma_4$ .

Tabella 4: Insieme delle funzioni elementari costituenti  $\tau$  e delle funzioni globali del modello.

### 2.3 La funzione di transizione e funzioni di gestione globale

In questa sezione ci soffermeremo sulla descrizione della funzione di transizione, descrivendo in dettaglio ogni processo elementare.

Si noti, inoltre, come sia possibile classificare le funzioni elementari in due grosse categorie:

- Trasformazione interne, in cui la variazione dei sottostati dipende solo dal valore dei sottostati del singolo automa, nel nostro caso  $\sigma_1$ ;
- Interazioni locali, in cui la variazione di sottostati di un automa dipende dal valore dei sottostati sia del singolo automa sia degli automi legati col la vicinanza, come  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\gamma_3$  e  $\gamma_4$ . Queste funzioni useranno  $S_N$  per generare l'elenco di cellule/automi in contatto con la cellula considerata.

All'elenco si aggiunge la terza categoria, formata dalle funzioni  $\zeta_0$  e  $\zeta_1$ ,

caratterizzata per il calcolo del valore del sottostato  $S_{life}$ . Queste due funzioni, come detto, non agiscono sul singolo automa, ma modificano l'intera configurazione di automi.

### 2.3.1-Variazione di concentrazione delle sostanze

Come visto, si utilizza la processo elementare di transizione  $\sigma_1$  che può essere espressa come:

$$\sigma_1: S_{life} \times S_{type} \times S_q \rightarrow S_q$$

In cui ogni automa/cellula con valore di  $S_{life}$  pari ad *alive*, secondo il proprio  $S_{type}$  varia il proprio  $S_q$ .

Nel nostro caso  $\sigma_1$  tiene conto di molti processi ovvero:

- produzione di SHR;
- produzione di SCR;
- formazione del complesso SHR\*SCR;
- degradazione di SHR e
- degradazione di SCR.

Questi saranno adesso analizzati in profondità mostrando quali funzioni matematiche sono state scelte per la descrizione delle dinamiche.

SHR viene prodotto selettivamente dalle cellule della stele (Helariutta et al. 2000). Da questa zone di produzione SHR può migrare nei tessuti attigui, dove permette la sintesi di SCR (Wysocka-Diller et al. 2000). Per la produzione dei fattori di trascrizione si è partiti dalla equazione di Mjolsness (Mjolsness et al. 1991) così come altri autori hanno fatto per i loro lavori (Jönsson et al. 2006).

Per la produzione di una generica proteina  $i$ :

$$\frac{dv_i}{dt} = \frac{1}{\tau_i} g\left(\sum_j T_{ij} v_j + h_i\right)$$

dove  $g$  è la funzione sigmoideale:

$$g(x) = \frac{1}{2} \left( 1 + \frac{x}{\sqrt{1+x^2}} \right).$$

in cui

- $v_i$  è la concentrazione della proteina  $i$ ;
- $t$  il tempo;
- $\tau_i$  è l'inverso del massimo rapporto di produzione per la proteina  $i$ , ed è indipendente dal tempo  $t$ ;
- $T_{ij}$  è la forza con cui la proteina  $j$  regola l'espressione di quella  $i$  ed è dipendente dal tempo, bisogna quindi trovare  $T_{ij}$  che si riferisca al tempo corrispondente ad un passo di calcolo.
- $h_i$  è il livello di espressione basale di  $i$  ed è indipendente dal tempo  $t$ .

Nel caso di SHR si suppone che non ci siano fattori di trascrizione che influenzino la sua produzione modificando l'equazione in:

$$\frac{dv_{SHR}}{dt} = \frac{1}{\tau_{SHR}} g(h_{SHR}).$$

Essendo  $\tau_{SHR}$  e  $h_{SHR}$  costanti nel tempo si deduce che la concentrazione  $v_{SHR}$  è costante nel tempo ed è pari al parametro globale  $\lambda_{SHR}$ .

Per la produzione di SCR, usando sempre l'equazione tratta dall'articolo di Mjolsness si ricava:

$$\frac{dv_{SCR}}{dt} = \frac{1}{\tau_{SCR}} g\left(T_{SCR\ SHR} v_{SHR} + T_{SCR\ SCR*SHR} v_{SCR*SHR} + h_{SCR}\right).$$

In questo caso si prende per buona l'ipotesi che gli effetti di SCR siano mediati dal complesso che esso forma con SHR (Cui et al. 2007).  $h_{SCR}$  non può essere

pari a zero perché come è dimostrato da Heidstra e colleghi il promotore di SCR si attiva se ci sono concentrazioni cellulari basse di SCR (Heidstra et al. 2004).

Si è usato il metodo di Eulero implicito per approssimare l'integrale. Per la nostra equazione differenziale i presupposti per questo metodo sono che il tempo sia discretizzato, cosa che è stabilita fin dal dall'enunciazione del modello, e che:

$$v_{SCR}(t=t_0) = v_{SCR0} ,$$

ossia ci sia una concentrazione stabilita di SCR al tempo iniziale. Questo è il parametro globale  $\lambda_{SCR}$ .

Detto ciò, si può approssimare come  $\frac{dv_{SCR}}{dt} \approx \frac{v_{SCRn} - v_{SCRn-1}}{t_{step}}$  se  $t_{step}$  è abbastanza piccolo.

Sostituendo:

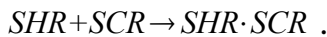
$$\frac{v_{SCRn} - v_{SCRn-1}}{t_{step}} = \frac{1}{\tau_{SCR}} g \left( T_{SCR\ SHR} v_{SHR} + T_{SCR\ SCR*SHR} v_{SCR*SHR} + h_{SCR} \right) .$$

Da cui:

$$v_{SCRn} = t_{step} \frac{1}{\tau_{SCR}} g \left( T_{SCR\ SHR} v_{SHR} + T_{SCR\ SCR*SHR} v_{SCR*SHR} + h_{SCR} \right) + v_{SCRn-1} .$$

Misurando il tempo in passi si devono determinare le forze di espressione  $T_{SCR\ SHR}$  e  $T_{SCR\ SCR*SHR}$  e si pone  $t_{step}$  pari a 1, ricavando una espressione che mostra in maniera inequivocabile l'incremento per passo temporale.

La formazione di un complesso è descritta attraverso un equilibrio dinamico.



Da questa reazione si ricava le seguenti relazioni fra le concentrazioni:

$$[SHR] = k_{diss} [SHR * SCR];$$

$$[SCR] = k_{diss} [SHR * SCR];$$

$$[SHR * SCR] = k_{ass} [SHR] [SCR];$$

Dove  $k_{ass}$   $k_{diss}$  sono parametri globali.

Si ricorda in chimica si usano le parentesi chiuse per indicare la concentrazione di una sostanza espressa in moli su litro. Da queste equazioni si ricavano le formule che permettono di calcolare la concentrazione delle specie all'equilibrio, deve però accadere che il tempo di un passo temporale sia sufficiente a ripristinare l'equilibrio. Il limite di questo approccio è l'eccessiva semplificazione delle equazioni differenziali che descrivono la cinematica chimica, se necessario modelli successivi impiegheranno una formulazione più precisa di queste.

Per la degradazione dei fattori di trascrizione si usa una funzione sigmoideale del tipo:

$$y = \frac{1}{(MRd_i)} g(Sd_i * x + Bb_i)$$

dove :

- $y$  è la quantità di proteina di degradata;
- $Mrd_i$  è il rapporto massimo di degradazione della proteina  $i$ -esima;
- $g()$  è la funzione sigma specificata prima;
- $Sd_i$  è la forza con cui viene degradata e
- $Bd_i$  dipende la degradazione minima per step.

$Mrd_i$   $Sd_i$   $Bd_i$  sono definiti per SHR e SCR nei parametri globali.

L'induzione esogena di SCR permette di osservare i tempi necessari alla degradazione totale dell'ammontare di proteina espressa, tali tempi si aggirano sulle 40 ore (Heidstra et al. 2004). Che i parametri globali che influenzanti la dinamica molecolare debbano essere identici per ogni tipo cellulare, potrebbe non essere esatto.

### 2.3.2- Lo scambio di sostanze fra automi

Questa funzione di transizione modella la diffusione di una quantità da una cellula alle cellule in contatto. Nel nostro caso la quantità da diffondere SHR; la diffusione avviene, in genere, dalle cellule della stele alle contigue (Nakajima et al. 2001)

$$\gamma_1 : S_{life} \times S_{life}^m \times S_N \times S_q \times S_q^m \rightarrow S_q \times S_q^m$$

è l'espressione della sub funzione di transizione, in cui ogni automa/cellula con  $S_{life}$  con valore pari ad *alive* comunica attraverso  $S_N$  con ogni vicino con  $S_{life}$  con valore pari ad *alive*.

Per simulare la diffusione si usa l'algoritmo di minimizzazione delle differenze (Di Gregorio and Serra 1999), modificato per tener conto delle resistenze. Per prima cosa si calcolano la media della delle quantità di SHR.

$$av_q = \frac{S_q^{c_{SHR}} + \sum_{i=0}^m S_q^{n_{SHR}}[i]}{m+1}$$

Si escludono dalla diffusione gli eventuali automi del vicinato che abbiano questa quantità superiore alla media. Se sono stati esclusi dal calcolo della diffusione degli automi del vicinato, allora si reitera il processo senza di questi, ovvero si calcola una nuova media che non conti gli automi esclusi e si valuta se escludere degli altri automi che abbiano la quantità di SHR superiore dalla nuova media. Se si arriva a non poter escludere altri automi del vicinato si arriva a calcolare la quantità minima che gli automi non esclusi e l'automa/cellula centrale tenderanno ad avere come valore di  $S_q^{SHR}$ .

Quindi si calcola per ogni vicino non escluso dal calcolo della diffusione lo scarto da questo valore. Per questo automa/cellula del vicinato tale scarto sarà moltiplicato per la resistenza e il valore ottenuto sarà sommato al suo valore attuale di  $S_q^{SHR}$ . Questa stessa quantità verrà sottratta da  $S_q^{SHR}$  della cellula



centrale.

### 2.3.3 La differenziazione dell'automa

La differenziazione cellulare viene implementata tramite il processo elementare:

$$\gamma_2: S_{life} \times S_{life}^m \times S_N \times S_{type} \times S_{type}^m \times S_q \rightarrow S_{type} .$$

Sono esclusi dal calcolo gli automi/cellule con  $S_{life}$  diverso da alive.

$S_{type}$  è modificato in base alle seguenti osservazioni sperimentali:

- Una cellula non si differenzia se è a contatto con le cellule del centro quiescente (Sabatini et al. 2003);
- Se il gene *scr* non si esprime, le cellule possono esprimere caratteristiche ibride fra cortex ed endoderamide (Di Laurenzio et al. 1996);
- Se sono presenti SCR e SHR la cellula si differenzia in endoderamide (Sabatini et al. 2003).

### 2.3.4 Duplicazione cellulare – prima parte

Questa funzione è eseguita accoppiata a  $\zeta_1$  e implementa una parte della duplicazione cellulare. Infatti si usano due funzioni per modellizzare la duplicazione. In questa funzione la cellula che si duplica acquista l'identità di cellula appena duplicata, mentre con  $\zeta_1$  si lega una nuova cellula, anch'essa generata dalla duplicazione. Le due cellule duplicate sono perfettamente identiche e potranno andare incontro a differenziazione.

La funzione elementare è espressa come:

$$\gamma_3: S_{life} \times S_{life}^m \times S_N \times S_{type} \times S_{type}^m \times S_q \times S_{ic} \rightarrow S_N \times S_N^m \times S_{dim} \times S_{ic} .$$

In cui un automa/cellula con  $S_{life}$  pari ad alive, un proprio vicinato  $S_N$ , con un  $S_{type}$  e valutando  $S_{type}$  delle cellule “alive” del vicinato. In base ai valori di  $S_q$  potrebbe variare il proprio vicinato e dimezzare le dimensioni.

Il vicinato è diviso fra le due cellule figlie, la modalità di questa spartizione dipende dal piano di divisione.

Questa funzione tiene conto delle seguenti evidenze sperimentali:

- Le divisioni non possono essere periclinali intorno alle cellule del centro quiescente (van den Berg et al. 1997);
- Le cellule iniziali di endoderme e cortex non si duplicano asimmetricamente se non c'è presenza di SCR e SHR (Heidstra et al. 2004);
- Le cellule iniziali di endoderme e cortex non si duplicano asimmetricamente se non ci sono cellule simili a contatto (van den Berg et al. 1995);
- La cellula deve trascorrere circa 18 ore dall'ultima duplicazione per poterne rifare un'altra (Beemster and Baskin 1998). Il parametro globale  $tD$  permette di esprimere questo tempo in numero di passi e non in ore;
- La cellula deve possedere un dato volume per potersi duplicare, tale volume è definito col parametro globale  $vD$ .

### 2.3.5 Crescita di dimensioni

L'ultima trasformazione interna è:

$$\gamma_4: S_{life} \times S_{life}^m \times S_N \times S_{ic} \times S_q \times S_{dim} \rightarrow S_{dim} \times S_N \times S_N^m .$$

Questa funzione permette di implementare l'aumento di volume delle cellule, e la crescita dell'intera radice. Gli automi che partecipano al processo devono avere  $S_{life}$  pari ad alive. La crescita si fa dipendere dal orologio interno e dalle quantità di fattori di trascrizione contenuti o altre sostanze, ormoni per esempio. Alla fine del processo varieranno le dimensioni cellulari e l'intorno spaziale.

### 2.3.6 Morte cellulare

Il modello prevede anche casi di morte cellulare, anche se questi fenomeni non rientrano nell'ambito ristretto della simulazione, il processo elementare utilizzato è:

$$\zeta_0: S_{life} \times S_{life}^m \times S_N \times S_{type} \times S_{ic} \times S_{dim} \times S_q \times S_{type}^m \rightarrow S_{life} \times S_N .$$

Tale funzione è espressa nella forma più generale e tiene conto sia della possibilità di morte cellulare programmata sia di morte cellulare indotta artificialmente.

### 2.3.7 Duplicazione cellulare – seconda parte

Abbiamo già descritto questa funzione quando abbiamo parlato di  $\gamma_3$ . Questa funzione genera la seconda cellula duplicata durante la citodieresi, la prima deriva direttamente dalla cellula che è andata in duplicazione applicando  $\gamma_3$ .

$$\zeta_1: S_{life} \times S_{ic}^m \times S_N \rightarrow S_{life} \times S_{ic} \times S_{type} \times S_q \times S_N \times S_{dim} .$$

$S_{life}$  cambia per passare ad alive, viene inserita la vicinanza in funzione delle vicinanza dell'automa “madre” e della direzione della duplicazione, vengono, inoltre, inizializzati tutti gli altri sottostati.<sup>5</sup> Implementazione e simulazione

### 3 Implementazione e simulazione

Il modello descritto non è stato realizzato completamente, ma precedenti a questo sono stati realizzati altri modelli più semplici, che sono da considerarsi come precursori di quello presentato. Abbiamo quindi utilizzato una implementazione di un modello precedente per eseguire alcune simulazioni e cercare di capire l'efficacia dell'approccio descritto. In questo modello le funzioni che simulano dei singoli eventi nella simulazione sono molto più semplici di quelle descritte.

I parametri globali passati al programma sono solo 11 e sono descritti in tabella:

parametri in ingresso	descrizione
number_of_steps	Il numero di passi che la simulazione al massimo durerà.
duplication time	Il numero minimo di passi che una cellula deve trascorrere prima di potersi duplicare.
duplication volume	Il volume minimo che una cellula deve possedere prima di potersi duplicare.
inhibition power	Serviva ad esprimere l'autoregolazione di SCR.
incr_SHR_m incr_SHR_im incr_SCR	Servono ad variare le concentrazioni cellulari dei fattori di trascrizione, linearmente dipendenti dalla concentrazione degli stessi.
sens_SHR_m sens_SHR_im sens_SCR	Rappresentano le soglie di sensibilità ai fattori di trascrizione, sono utilizzata per determinare se c'è una concentrazione cellulare sufficiente di un fattore di trascrizione per eseguire i processi cellulari correlati.
sens_diffusion	Rappresenta la soglia di sensibilità alla diffusione di SHR.

Tabella 5: Parametri globali scelti per effettuare simulazioni di prova.

Per le varie simulazioni, i parametri globali sono stati inizializzati ponendo:

- “number\_of\_steps” pari a 50, numero giudicato sufficiente a vagliare il decorso della simulazione;
- “duplication time” pari a 2, giudicato numero minimo di passi da

impostare per questa variabile;

- “duplication volume” pari ad 1, ma completamente trascurato nel calcolo;
- `incr_SHR_m`, `incr_SHR_im` e `incr_SCR` hanno sempre lo stesso valore che varia da 0.1 volte `number_of_steps` a 2.0 volte `number_of_steps`, con un intervallo di 0.1;
- `sens_SHR_m`, `sens_SHR_im` e `sens_SCR` hanno sempre lo stesso valore che varia da 0.1 volte `number_of_steps` a 2.0 volte `number_of_steps`, con un intervallo di 0.1;
- `sens_diffusion` varia da 0.1 volte `number_of_steps` a 2.0 volte `number_of_steps`, con un intervallo di 0.1;

Si ottengono così come numero di processi simulati una combinazione di 20 valori possibili in 3 parametri, ovvero 6840 simulazioni.

Le informazioni vengono divise in vari file di output. Molti di questi output files sono utilizzati semplicemente per il debug, descriverò quindi solo gli output files che effettivamente sono stati utilizzati nell'analisi dei risultati.

Il file “CurrentTime.txt” mostra tutta la configurazione della radice passo-passo. In un file, “duplication.txt”, è registrata la configurazione della radice ogni volta che avviene una duplicazione, evidenziando il numero di duplicazioni anticlinali e quello delle periclinali. La configurazione finale è registrata nel file “output.txt”, viene anche riportato il numero di passi effettuati dalla simulazione. I files “dinamicSHRm.txt”, “dinamicSHRim.txt” e “dinamicSCR.txt” mostrano le variazioni dei fattori di trascrizione passo per passo.

Dall'insieme di simulazioni generate si deve cercare un sottoinsieme di simulazioni che possano essere candidate come modelli verosimili. Per generare questo sottoinsieme si utilizzano dei “filtri” o criteri discriminanti ai dati di output ottenuti.

Distinguiamo tre tipi di motivazioni che ci inducono ad adottare questi

criteri discriminanti:

- Ragioni matematiche – per esempio, la concentrazione cellulare di un qualsiasi fattore di trascrizione non dovrebbe mai essere inferiore a zero, per la definizione stessa di concentrazione;
- Ragioni biologiche – per esempio, il modello, se simula la pianta *wild type* non deve far avvenire la diffusione di SHR oltre l'endoderme;
- Ragioni del formalismo – se si adotta una data formulazione dei fenomeni elementari, alcuni set di valori potrebbero essere proibiti; nel nostro caso ciò avveniva se “inhibition Power” era minore di sens\_SCR perché solo se la concentrazione di SCR è maggiore della sens\_SCR ha senso che questa proteina inibisca la propria produzione.

Una prima analisi dei dati è avvenuta utilizzando la statistica descrittiva, e ricavando che:

Variable Name	Mean	Variance	Sd	Minimum	Maximum	Moda
Step_done	40.54271	203.1635	14.25354	12	50	50
n_div	59.0603	1245.033	35.28502	0	100	48
n_peri	7.0201	36.54144	6.044952	0	16	6
n_anti	10.80905	60.4913	7.777615	0	24	8
StepLastDiv	18.28643	164.3462	12.81976	0	49	17
QC_SHR_m	0.276003	0.03373029	0.1836581	0.0489	0.8318	0.2409
QC_SHR_im	0.9998497	0.1678375	0.4096797	0.1682	2.1804	0.9698
QC_SCR	0.140299	0.01031892	0.1015821	0	0.4998	0.105
Gtsc_SHR_m	0.2451382	0.2451382	0.1942725	0.0121	0.8318	0.2044
Gtsc_SHR_i m	0.8788844	0.1402151	0.3744531	0.1682	1.6258	0.894
Gtsc_SCR	0.1244965	0.01094535	0.10462	0	0.4998	0.0916

Tabella 6: Statistiche sull'insieme di simulazioni effettuate.

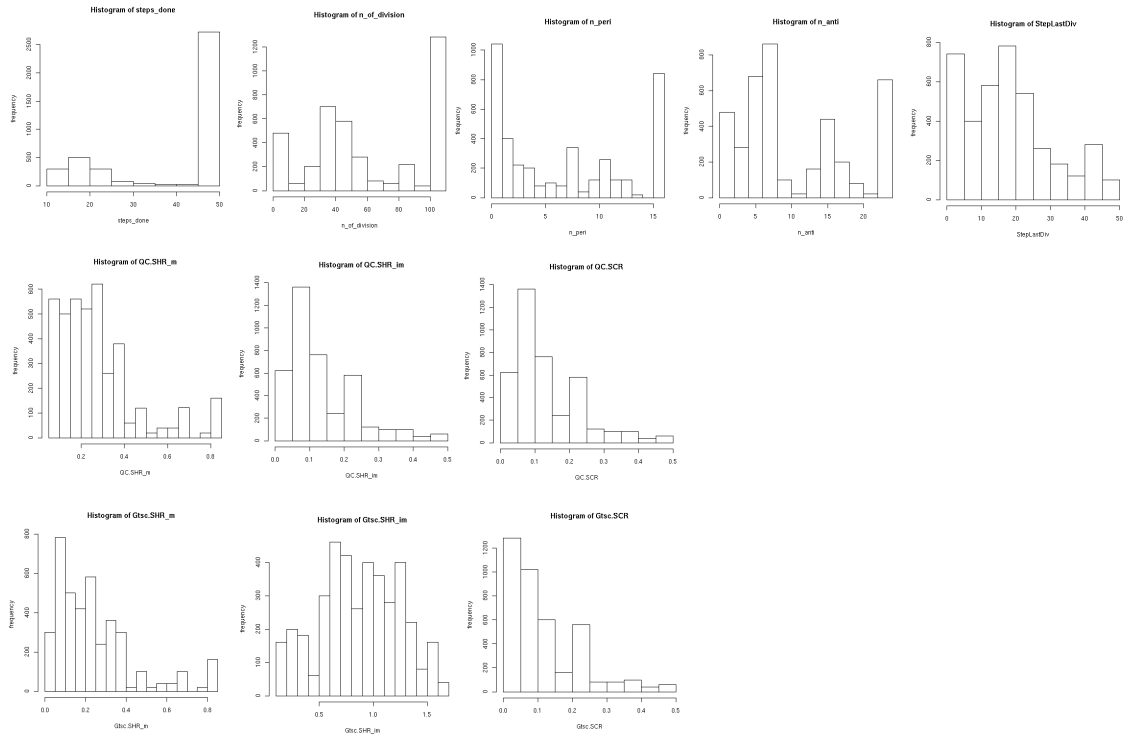


Figura 1: Istogrammi che descrivono come i valori ottenuti come output nelle simulazioni si distribuiscono. In dettaglio, ciascun istogramma si riferisce: a) Numero di passi eseguiti; b) Numero di divisioni cellulari eseguite; c) Numero di divisioni cellulari periclinali eseguite; d) Numero di divisioni cellulari anticlinali eseguite; e) valore del passo all'ultima duplicazione; f) Contenuto medio di SHR mobile delle cellule del centro quiescente alla fine della simulazione; g) Contenuto medio di SHR non mobile delle cellule del centro quiescente alla fine della simulazione; h) Contenuto medio di SCR delle cellule del centro quiescente alla fine della simulazione; i) Contenuto medio di SHR mobile delle Gtsc alla fine della simulazione; l) Contenuto medio di SHR non mobile delle Gtsc alla fine della simulazione; m) Contenuto medio di SCR delle Gtsc alla fine della simulazione.

Gli istogrammi che illustrano tali statistiche sono in figura 1.

Successivamente abbiamo controllato come i valori restituiti dalla simulazione variassero in funzione dei parametri. Si è potuto osservare ad occhio la totale indipendenza di `sens_diffusion`. In figura 2 sono mostrati come variano i parametri in funzione delle “sens” e delle “incr”.

## 4 Conclusioni

Dovendo sintetizzare il lavoro svolto e successivamente commentare i risultati ottenuti, dobbiamo riferirci in prima istanza al nuovo paradigma computazionale sviluppato: la “rete di automi finiti con generazione”. Questo è stato un punto nodale del lavoro in quanto i paradigmi computazionali candidati ad essere utilizzati nella costruzione del modello: le “Grammatiche di Lindenmayer” (Prusinkiewicz and Lindenmayer 1990) e gli Automi Cellulari (Di Gregorio and Serra 1999)

. Ognuno di queste per proprio conto presentava, accanto ad aspetti positivi, delle deficienze non facilmente superabili. Si è scelta la strada, sotto certi aspetti più ardua, di sviluppare un nuovo paradigma in cui fossero presenti le caratteristiche di acentrismo e parallelismo degli Automi Cellulari insieme alle potenzialità generative delle “Grammatiche di Lindenmayer”: una rete irregolare di automi “elementari” fra loro connessi rappresentanti le cellule ed una selezione opportuna delle loro funzionalità con la possibilità di duplicarsi riorganizzando le connessioni con gli altri automi e definendo una funzione di transizione dipendente da una vicinanza dinamica. Questa soluzione permette anche di lavorare in modo “incrementale”, cioè partendo da un modello semplice ed inserendo successivamente sulla base delle nuove conoscenze acquisite nuovi elementi di specificazione delle cellule e loro funzionalità oppure più semplicemente costruendo il tutto in modo progressivo, lasciandosi guidare in parte dai risultati parziali delle simulazioni. Un tale paradigma è sufficientemente ampio da potersi significativamente applicare in altre aree in cui si necessiti modellare la duplicazione cellulare con grande dettaglio.

Su questa base innovativa si è tentato di sviluppare modelli di crescita via via più dettagliati della radice di *Arabidopsis thaliana*, in grado di simulare il fenomeno reale a livelli, da confrontarsi con i dati sperimentali. Qui sorge il problema cruciale a quale livello di dettaglio del fenomeno ci si debba



ricondere in relazione ai dati sperimentali, che, non è detto, possano sempre essere sufficienti per il modello, lasciando in ogni caso che siano le simulazioni fatte ad individuare carenze e limiti, ma anche potenzialità e direzioni di futuri sviluppi e miglioramenti.

Mentre il modello implementato risulta essere valido senz'altro a livello base per quanto riguarda i meccanismi generali (la logica dell'evoluzione del sistema), a livello di determinazione delle quantità in gioco, non si è ancora riusciti a trovare un soddisfacente riscontro nelle simulazioni effettuate. La validazione del modello non può essere effettuata in toto sul fenomeno "reale" laddove risultano essere insufficienti alcuni dei dati sperimentali al livello di quantizzazione prescritto dal modello. Bisognerebbe misurare ad esempio , almeno relativamente l'una alle altre, le concentrazioni cellulari dei fattori di trascrizione presi in considerazione.

Di conseguenza, come sarà motivato dettagliatamente nel seguito, non ci aspettiamo in questa fase che il modello sviluppato sia capace di "catturare" tutte le dinamiche critiche dei vari processi considerati, per cui una qualche verifica di tipo statistico non è per ora molto significativa, né è emerso nella sua completezza un comportamento globale del tipo rilevabile a livello macroscopico nella pianta.

Come si è visto, la simulazione parte sempre dalla rappresentazione di processi elementari più semplici, che compongono la complessa dinamica del processo simulato. Se tale approssimazione dei processi elementari dovesse essere non sufficientemente precisa, si potrebbero non produrre mai simulazioni "corrette", per qualunque insieme di valori dei parametri globali vagliati. I primi risultati comunque provano che è necessario estendere il modello, vagliando diverse ipotesi che descrivano i processi elementari in modo meno semplicistico. Alcune conclusioni possono comunque essere tratte, come si osserva dai landscapes (dalla figura 2):

- alcuni parametri sono meno influenti di altri, almeno per i valori

considerati. Il risultato della simulazione, infatti, è indipendente da *sens\_diff*.

- osservando bene i landscapes si nota sempre la presenza di una zona distinta che si trova fra 0 e 0.02 di *incr* e tra 0 e 0.01 di *sens*. Questa zona è caratterizzata da una parziale stabilità, massimo numero di duplicazioni e minimo numero di passi effettuati.

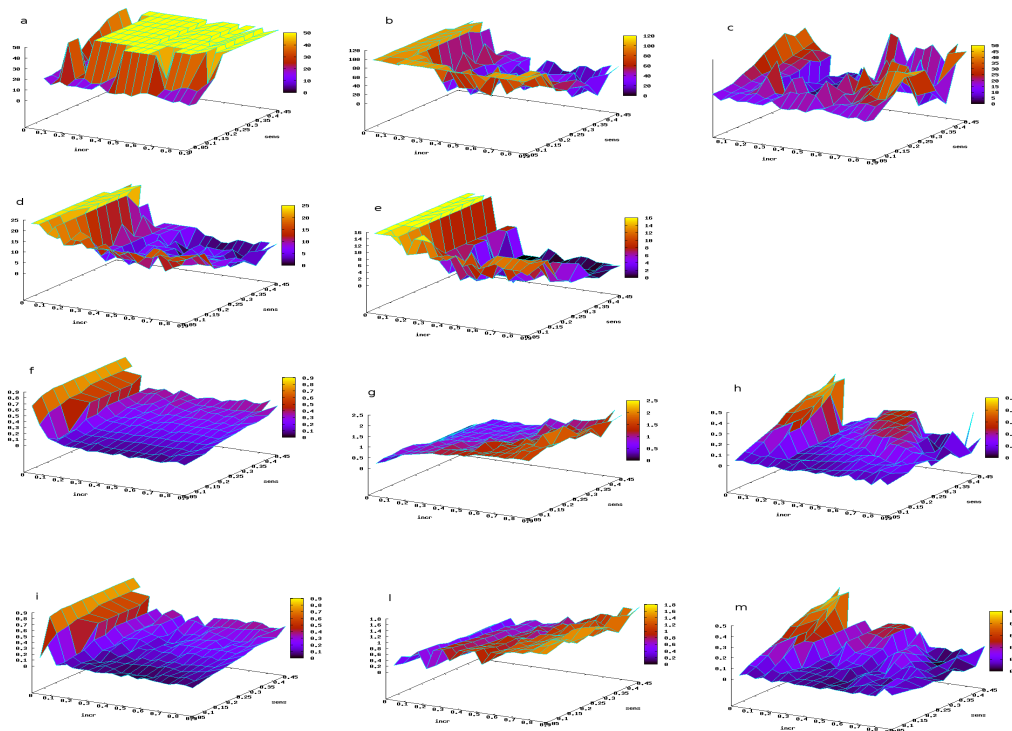


Figura 2: Queste superfici rappresentano le variazioni delle variabili di output al variare dei valori di *incr* e di *sens*. In dettaglio, ciascuna superficie si riferisce: a) Numero di passi eseguiti; b) Numero di divisioni cellulari eseguite; c) Valore del passo all'ultima duplicazione; d) Numero di divisioni cellulari periclinali eseguite; e) Numero di divisioni cellulari anticlinali eseguite; f) Contenuto medio di SHR mobile delle cellule del centro quiescente alla fine della simulazione; g) Contenuto medio di SHR non mobile delle cellule del centro quiescente alla fine della simulazione; h) Contenuto medio di SCR delle cellule del centro quiescente alla fine della simulazione; i) Contenuto medio di SHR mobile delle Gtsc alla fine della simulazione; l) Contenuto medio di SHR non mobile delle Gtsc alla fine della simulazione; m) Contenuto medio di SCR delle Gtsc alla fine della simulazione.

E' poco probabile che qualche simulazione effettuata corrisponda al comportamento della zona meristemica di una radice di *Arabidopsis thaliana*, in quanto queste duplicazioni avvengono troppo velocemente e contemporaneamente. La durata del ciclo cellulare nella radice di *Arabidopsis* calcolata indirettamente è , invece, all'incirca pari a  $17.3 \pm 0.7$  ore (Beemster and Baskin 1998). Tale stima è coerente con la misura ottenuta sperimentalmente nelle radici di *Arabidopsis scr-4*, un mutante che non produce normalmente SCR e le cui cellule non sono in grado di effettuare la divisione cellulare periclinale, laddove tale divisione avviene 24 ore dopo l'induzione di SCR (Heidstra et al. 2004) Tale osservazione sperimentale va comunque considerata con precauzione, facendo riferimento a condizioni particolari, quali sono da considerarsi un mutante ed una divisione periclinale.

Avendo posto il valore di "duplication\_time" pari a 2 passi temporali, si deduce che il passo temporale della simulazione duri circa 9 ore o sia al massimo di 12 ore. I 50 passi temporali, durata massima della simulazione, corrisponderebbero, come si può calcolare, ad almeno 450 ore o al massimo a 600 ore di vita della pianta. Appare, quindi, poco probabile che 100 duplicazioni, che rappresentano il massimo numero di duplicazioni che la simulazione può calcolare, avvengano entro 20 passi, che corrispondono alla durata minima di calcolo registrata. Se così fosse la frequenza di duplicazione sarebbe di 0.56 divisioni all'ora, contro un rapporto medio sperimentale di divisione oraria pari al di massimo a  $0,041 \pm 0.002(1/h)$  ed al minimo a  $0,037 \pm 0.002(1/h)$  (Beemster and Baskin 1998). La considerazione che la misura del tasso medio orario di divisione (in originale *cell division rate*) è esclusivamente basato sulle divisioni anticlinali, ci ha portato ad accettare esclusivamente le simulazioni che in 50 passi eseguono tra le 16,65 e le 24,06 divisioni, ovvero 4 sole simulazioni fra quelle effettuate (tabella7).

parametres and output results	1	2	3	4
number_of_steps	50	50	50	50
duplication time	2	2	2	2
duplication volume	1	1	1	1
inibition power	0.45	0.45	0.45	0.45
incr_SHR_m incr_SHR_im incr_SCR	0.41	0.5	0.59	0.68
sens_SHR_m sens_SHR_im sens_SCR	0.36	0.18	0.23	0.27
sens_diffusion	any values	any values	any values	any values
Step_done	50	50	50	50
n_div	17	23	22	27
n_peri	0	2	0	3
n_anti	3	4	4	4
StepLastDiv	4	7	9	22
QC_SHR_m	0.36	0.16	0.17	0.23
QC_SHR_im	0.72	0.95	1.09	1.13
QC_SCR	0.22	0.11	0.07	0.21
Gtsc_SHR_m	0.28	0.09	0.11	0.22
Gtsc_SHR_im	0.70	0.95	1.03	1.03
Gtsc_SCR	0.22	0.10	0.05	0.21

Tabella 7: Tra le simulazioni eseguite in questa tabella sono mostrate quelle che possiedono una frequenza di divisioni ottimale secondo Beemster and Baskin 1998.

Nel ragionamento proposto emergono comunque dei problemi da risolvere o ridefinire. I dati trovati in letteratura (Beemster and Baskin 1998) fanno riferimento al tasso medio di divisione orario di divisione, calcolato però, dal flusso di cellule, definito come numero di cellule che superano una data distanza dal QC, diviso il numero di cellule in divisione. Non è detto che questo sia consistente col nostro modello, in cui si simula la duplicazione delle staminali che generano endoderme e cortex e si impone, per coerenza “spaziale”, la contemporanea divisione delle cellule della stele.

Altro aspetto da considerare è che i processi elementari simulati

avvengono utilizzando scale temporali molto diverse: la duplicazione avviene nell'arco di ore; la produzione o la degradazione di fattori di trascrizione nell'arco di minuti e la diffusione in secondi. E' da verificare se il modello utilizzato possa essere "multiscala" o meno.

A tal riguardo, bisognerebbe assegnare ai parametri utilizzati nella descrizione dei processi elementari dei valori significativi ai fini della descrizione di un fenomeno che evolve per passi temporali della durata di circa nove ore. Questo non è sempre possibile per cui bisognerà aumentare il valore di "duplication\_time", riducendo la durata del passo, e proporzionalmente aumentare il numero dei passi che il modello compie al fine di rendere i risultati confrontabili. Sempre per tener conto della differenza di scala temporale dei processi simulati è da valutare anche l'opportunità di introdurre un ritardo, inteso come numero di passi, che corrisponda all'eventuale intervallo tra la percezione delle condizioni e l'esecuzione del processo elementare.

Si noti, inoltre, che le quattro simulazioni scelte hanno insieme di valori "molto diversi" fra loro e, forse, sono tutte capaci di approssimare casi reali per una soglia di sensibilità statistica "abbastanza piccola". Questa risulta essere un'altra forte motivazione per "complicare" il modello, inserendo processi elementari molto più complessi, che dipendano da più variabili e in maniera non lineare, sì da ottenere, dati i nostri criteri selettivi, un minore insieme di simulazioni valide a descrivere il fenomeno.

Nel caso più "ottimista" potrebbe addirittura accadere che le quattro simulazioni scelte simulino quattro condizioni di crescita diverse. Interpretazione questa avvalorata dai dati di Beemster e Baskin (Beemster and Baskin 1998) che si riferiscono a calcoli effettuati su radici di diversa età ed ancor più dal caso presentato da Heidstra (Heidstra et al. 2004). Non è, comunque, da escludere che, solo per il verificarsi di coincidenze favorevoli, le quattro simulazioni scelte possano senza altre verifiche essere compatibili con ciò che conosciamo dei processi reali

Infine, è da sottolineare come le simulazioni scelte non siano tutte le quelle possibili e altri insiemi di parametri globali potrebbero cambiare radicalmente i valori forniti in uscita. Non è possibile, infatti, prevedere a priori come una simulazione, dato un'insieme di parametri globali, si comporti, se non nei casi che vengono gestiti come errori, ossia quando il numero di parametri forniti risulta minore di quanto necessario. Per limitare il numero di simulazioni da effettuare e validare sarebbe quindi opportuno cercare di ottenere, almeno in parte, delle misure sperimentali, sia pure relative, dei parametri usati.

## ***Appendice A – Note implementative***

Il modello descritto nel precedente paragrafo è stato implementato in C++ (Stroustrup). Tralasciando i particolari sulla scrittura del codice, se non dove risulti necessario, in questa appendice si discuterà soprattutto di come è strutturato il programma. Verranno esibiti anche gli output e si fornirà lo schema interpretativo di questi.

Per specificare in termini formali, e non soltanto “intuitivi”, l'implementazione del modello si utilizzerà, per specificare le scelte compiute, termini riferiti alla programmazione ad oggetti, ed infine il discorso sarà supportato dai grafici del progetto UML (Fowler).

Esistono delle corrispondenze fra il modello adottato, il progetto ideato (in UML) e il codice implementato, ma queste corrispondenze non sono esatte. Se il codice implementato è un caso limitato del modello descritto, l'esatta corrispondenza fra questi si raggiungerà solo con il totale completamento della stesura del programma. Nel programma, per esempio, non è formalizzata la variazione di volume fra le cellule, aspetto in parte compensato dall'ipotesi che nella zona meristemica il volume delle cellule non subisca grosse variazioni.

Il progetto rappresenta invece una situazione ideale per capire il comportamento degli oggetti, ma non riprodotta fedelmente in codice C++, spesso si è preferito ricorrere alla programmazione procedurale, per semplificare la scrittura del codice.

### ***Descrizione delle classi usate***

Qui si mostra come sono organizzati i dati del programma secondo il progetto redatto, progetto che non si discosta molto da come i dati siano effettivamente usati nel programma. Le variazioni significative fra progetto e programma

avvengono nella implementazione dei metodi delle classi, come detto in precedenza.

Per rappresentare gli automa/cellula si è scelto di implementare un classe, detta *CellNode*. In questa classe la maggior parte degli attributi è in relazione con gli stati formalizzati nel modello adottato. Altri attributi servono alla gestione degli oggetti generati con la classe. Le funzioni implementate come metodi della classe servono solo per ottenere o immettere valori agli attributi (metodi “getty” e “setty”). Nel progetto i metodi permettono agli oggetti derivati da *CellNode* di eseguire le funzioni elementari descritte per il modello formale.

Un'altra classe, *CellFile*, viene usata per implementare i files della radice. Si noti che le funzioni di questa classe sono solo amministrative o sono usate per semplificare l'implementazione della divisione cellulare, quindi di tale classe si eviterà per il momento ulteriore trattazione.

Per la realizzazione dei layer non si utilizza una classe. Ma essi sono definiti tramite arrays di oggetti. Visto l'uso temporaneo, infatti, non è necessaria una classe che definisca un nuovo tipo di variabile (figura 4).



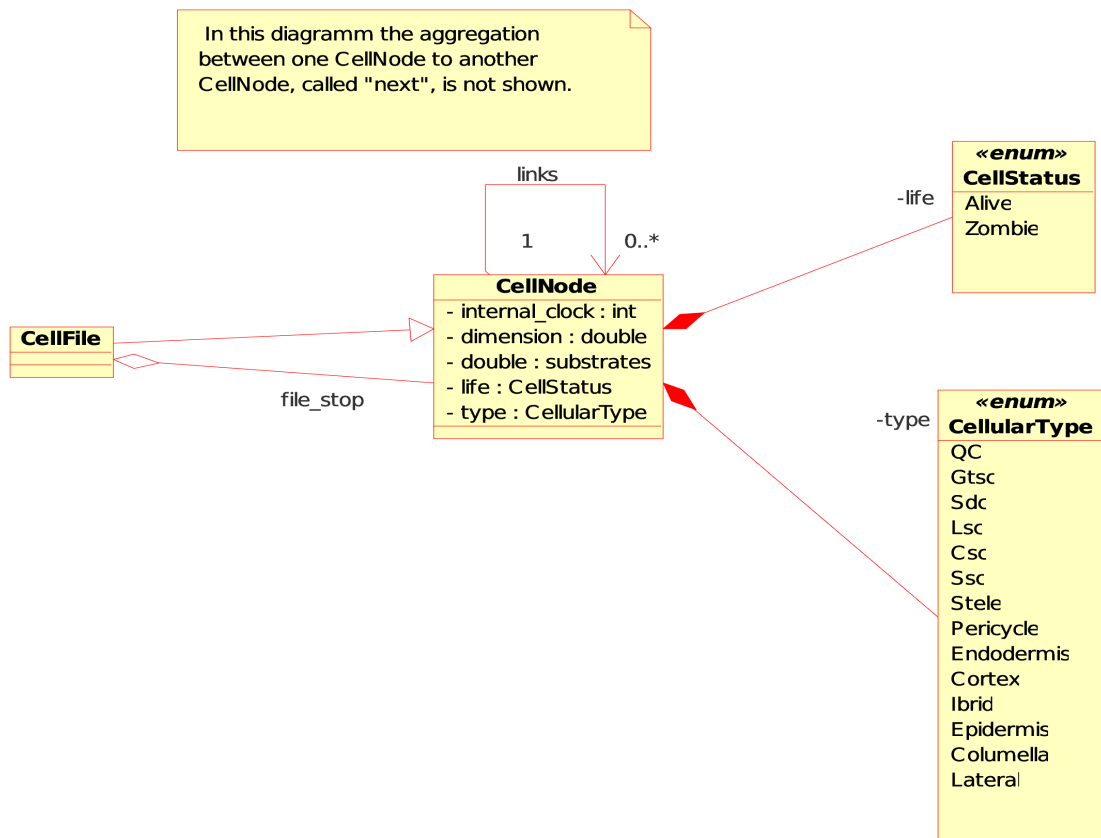


Figura 3: Diagramma di classe che illustra la relazione fra le classi usate nel progetto.

### ***Inizializzazione del programma e parametri globali***

Molti dei parametri globali possono essere “passati” all'avvio del programma, come riassunto in tabella 1.

I parametri che devono essere passati al programma permettono di eseguire più simulazioni cercando la soluzione che più si avvicini, sia statisticamente verosimile, col fenomeno naturale. Sarà inoltre possibile valutare tutta una serie di situazioni alternative che ci mostrino come i vari parametri influenzino la computazione. Questa parte sarà trattata dettagliatamente in seguito quando si parlerà della analisi dei risultati.

Per la configurazione iniziale si creano sei arrays di oggetti CellNode, i quali implementeranno i layers. Ognuno di questi arrays di oggetti corrisponderà a:

- Le cellule del centro quiescente;
- Le cellule iniziali;
- Le cellule della stele;
- Le cellule dell'endoderme;
- Le cellule del cortex e
- Una riserva di oggetti CellNode inattivi (che non sono ancora cellule della radice e con la variabile cell\_status, che corrisponde a  $S_{life}$ , pari ad *unborn*).

Questi arrays sono processati tramite una funzione che lega gli automi nella configurazione iniziale e che inizializza le quantità iniziali corrispondenti ai fattori di trascrizione SCR e SHR. Questa funzione è dichiarata nel file "CN\_rstk.h". La configurazione iniziale cerca di ricalcare la descrizione della radice di *Arabidopsis thaliana* fornita da Dolan e colleghi (Dolan et al. 1993).

Alcuni oggetti dichiarati da CellNode saranno organizzati in CellFiles. Precisamente, ci saranno:

- otto CellFile che conterranno le cellule del cortex;
- otto per le cellule dell'endoderme;
- otto per le cellule iniziali di questi due tessuti
- e, infine, 28 per lo stele e le sue iniziali.

### ***La simulazione, ordine dei processi e descrizione***

Può essere utile, per capire l'ordine dei processi durante la simulazione, osservare un grafico delle attività (figura 4).

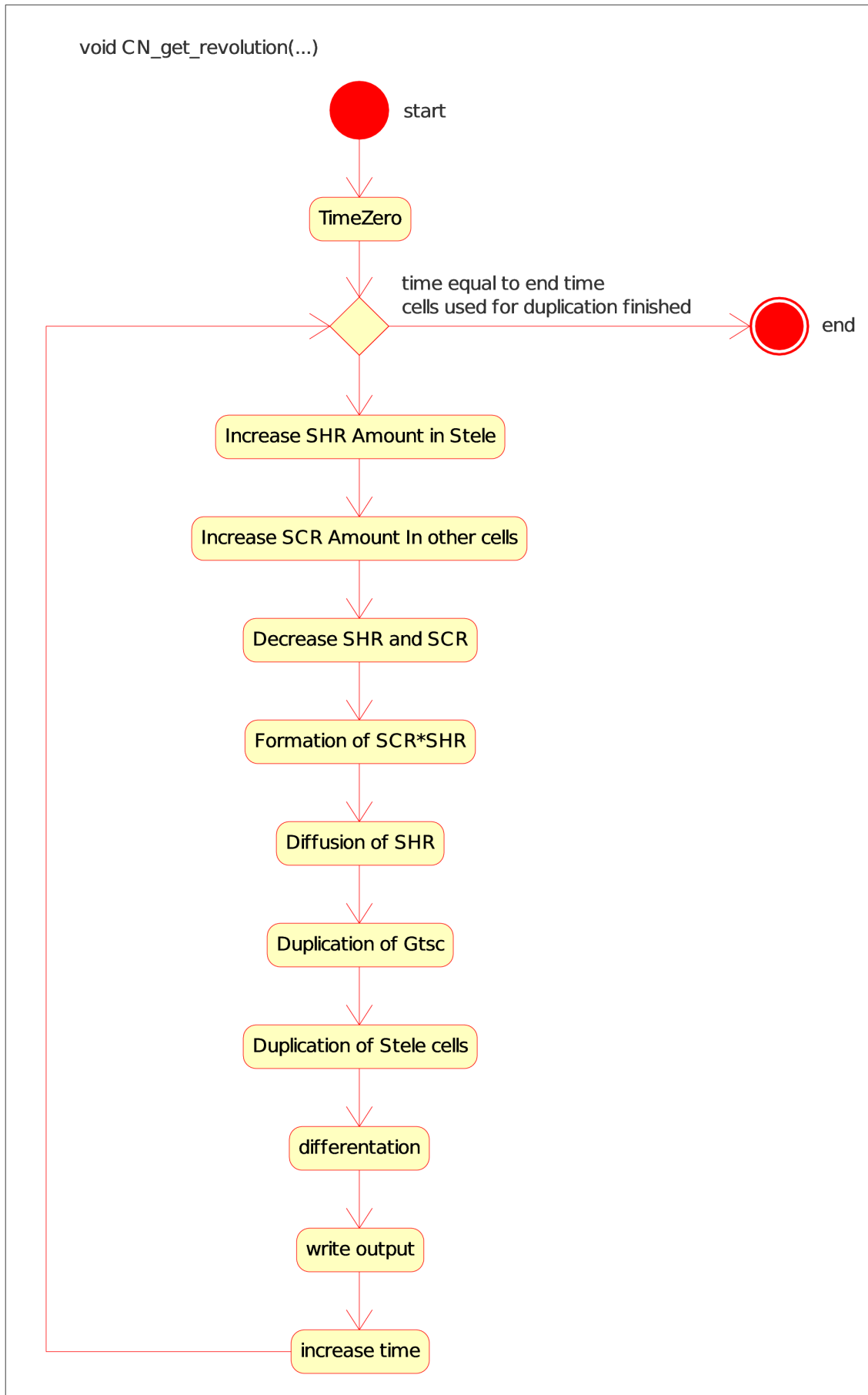


Figura 4: Diagramma di attività della funzione principale del programma di simulazione.

La prima istruzione utile della simulazione è l'inizializzazione del tempo della simulazione. Dopo ciò, sono inizializzate delle variabili per l'output o per la gestione dell'output stesso.

Il primo processo che si esegue è l'incremento dei fattori di trascrizione. Questo processo è stato formalizzato dalla funzioni elementare col transizione  $\sigma_1$ , come abbiamo visto precedentemente. Il primo fattore di trascrizione che si incrementa è SHR nella stele, poi si calcola l'incremento di SCR nelle altre cellule.

Dopo l'incremento dei fattori di trascrizione si calcola la diminuzione di questi dovuta al clivaggio delle proteine.

Infine si calcola l'effetto sulle concentrazioni della formazione dell'eventuale complesso SHR\*SCR.

Si passa successivamente al calcolo della diffusione, formalizzata con la funzione di transizione  $\gamma_1$ .

Si passa alla duplicazione dello cellulare, formalizzata tramite due funzioni elementari:  $\gamma_3$  e  $\zeta_1$ .

Dopo la duplicazione simuliamo la differenziazione delle cellule, processo formalizzato in  $\gamma_2$ .

Questa funzione tiene conto di quanto enunciato nella formalizzazione della processo elementare  $\gamma_3$ , in altre parole se può avvenire o meno per una data cellula la duplicazione e il tipo di duplicazione e può essere raffigurata tramite il seguente diagramma di stato(figura 5).

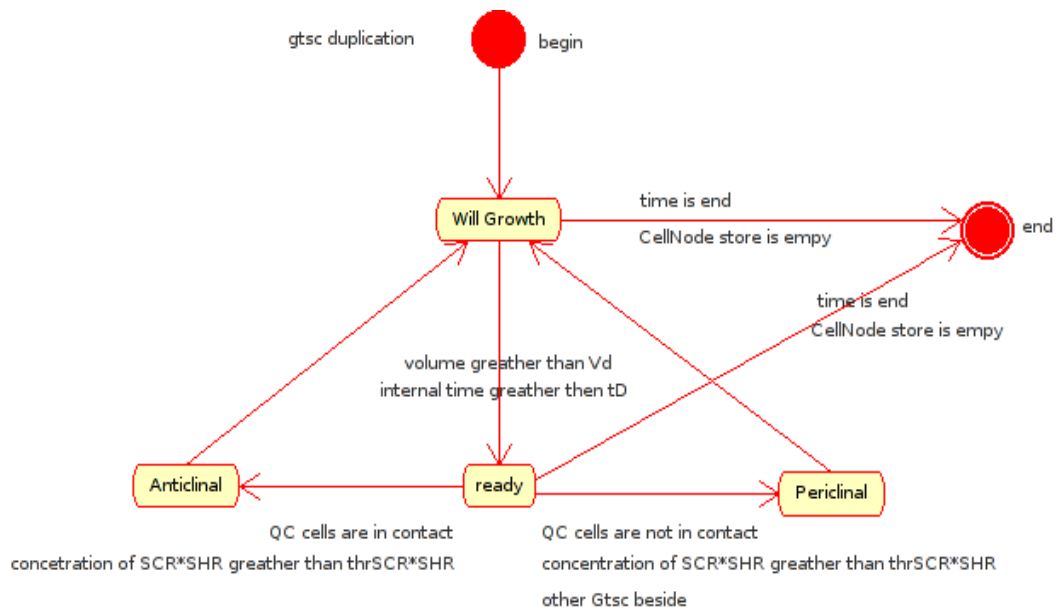


Figura 5: Diagramma di stato che illustra le variazioni degli oggetti derivati da *CellNode* nella divisione.

Questa funzione a seconda della ampiezza del *CellFile* *Gtsc\_file* esegue la divisione anticlinale o periclinale, attribuendo il *CellNode* *to\_push* al giusto *CellFile* ed eseguendo le divisioni dei links a seconda della direzione di divisione. Se l'ampiezza dovesse essere pari a due allora si esegue la divisione periclinare, se dovesse essere pari ad uno si esegue la divisione anticlinale, come illustrato in figura (figura 6).

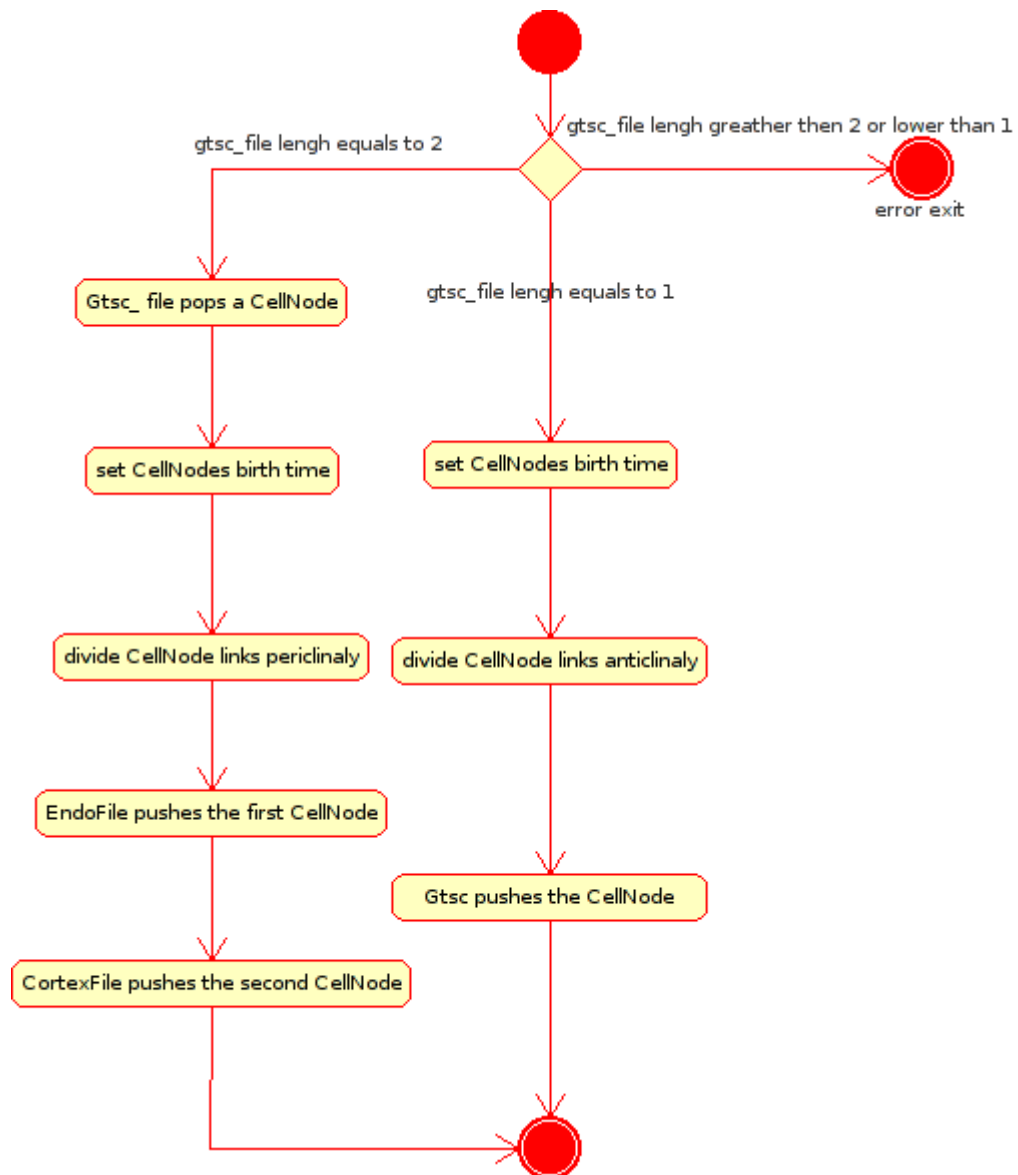


Figura 6: Diagramma di attività per la funzione che agisce sugli oggetti derivanti da CellFile al fine di simulare la duplicazione cellulare.

Il comportamento degli oggetti CellFile può essere semplificato tramite un diagramma di stato (figura 7).

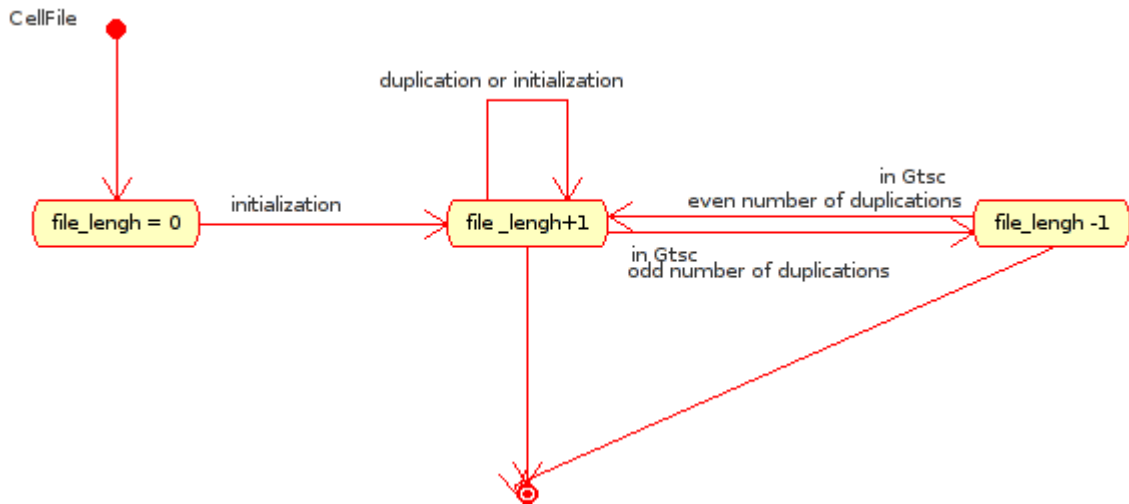


Figura 7: Diagramma di stato che mostra il “funzionamento” nel programma degli oggetti ricavati da CellFile.

Successivamente si duplicano anche le cellule iniziali della stele. Abbiamo adottato a riguardo l'ipotesi semplicistica: la cellula iniziale della stele esegue la duplicazione solo se le una cellula a contatto dello stesso tier si è duplicata. Questa ipotesi è utilizzata solo per mantenere i vari tessuti solidali durante la simulazione si suppone che la realtà sia molto più complessa.

L'ultimo processo che viene simulato è la differenziazione delle cellule iniziali del cortex e dell'endoderme, formalizzata con il processo elementare di transizione  $\gamma_2$ .

che tiene conto di tutti i presupposti stabiliti dalla letteratura e trattati in dettaglio nella sezione sulla funzione di transizione. Il grafico illustra il funzionamento della classe CellNode durante la differenziazione.

## **Appendice B: Elenco pubblicazioni Pietro Brunetti**

P. Pommois, P. Brunetti, V. Bruno, A. Mazzei, V. Baldacchini, S. Di Gregorio.  
FlySim: A Cellular Automata Model of *Bactrocera Oleae* (Olive Fruit Fly) Infestation and First Simulations. [Lecture Notes in Computer Science](#)  
Vol: 4173 311-320  
Cellular Automata - 7th International Conference on Cellular Automata for Research and Industry, ACRI 2006.  
Perpignan, France, September 20-23, 2006.

P. Brunetti, M.B. Bitonti, S. Di Gregorio.  
A first simulation of root apex development of *Arabidopsis thaliana*.  
Poster presentation. Abstract published on "Communications to SIMAI Conferences", 2006.  
VIII Convegno SIMAI May 2006. Ragusa (CS).

P. Brunetti, S. Di Gregorio, M.B. Bitonti.  
HYPOTHESIS OF EMERGENCE TO MODELLING THE PLANT DEVELOPMENT:  
AN APPROACH  
Poster Presentation at Summer School in Plant Development Maratea, Italy  
8th-11th June 2005

In preparazione:

P. Brunetti, S. Salatino, M.B. Bitonti, S. Di Gregorio.  
A first model for the simulation of the *Arabidopsis thaliana* root growth.



## **Bibliografia**

Aida M., Beis D., Heidstra R., Willwmsen V., Blilou I. Galinha C., Nussaume L., Noh Y.S., Amasino R., and Scheres B. (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119:109-20.

Arbesman, Samuel, Leo Enthoven, and Antónia Monteiro. 2003. Ancient Wings: animating the evolution of butterfly wing patterns. *Biosystem* 71:289-95.

Baum, Stuart F, Joseph G. Dubrovsky, and Thomas L. Rost. 2002. Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *Am. J. Bot.* 89, no. 6 (June 1), 908-920.

Beemster, G.T. and Baskin, T.I. (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116, 1515–26

Benfey P.N., Linstead P.J., Roberts K., Schiefelbein J.W., Hauser M.T., and Aeschbacher R.A. (1993) Root development in *Arabidopsis*: Four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119: 57–70.

Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., and Scheres B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433: 39-44

Cui H., Levesque M.P, Vernoux T., Jung J.W, Paquette A.J., Gallagher K.L., Wang J.Y., Blilou I., and Scheres P.N. 2007. An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* 316,421-5.

Dello Ioio R., Scaglia Linhares F., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P. and Sabatini S. (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology* 17: 678-82.

Di Gregorio S. and Serra R. (1999) An empirical method for modelling and simulating some complex macroscopic phenomena by cellular automata *Future Generation Computer Systems* 16 259–271

Di Laurenzio, L., Wysockadiller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., and Benfey, P.N. (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86, 423–433.

Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., Scheres B. (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root *Development* 119, 71-84

Gallagher K. and Smith L. G. (1997) Asymmetric cell division and cell fate in plants *Current Opinion in Cell Biology* 9, 842-848

Fowler, Martin. N.d. *UML Distilled: A Brief Guide to the Standard Object Modeling Language*. Addison-Wesley

Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., Willemsen V., Blilou I., Heidstra R., and Scheres B. PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449:1053-57.

Gallagher K.L., Paquette A.J., Nakajima K., and Benfey N.P. (2004) Mechanisms Regulating SHORT-ROOT Intercellular Movement. *Current Biology*, 14, 1847–

1851,

Geymonat, L. 1970. *Storia del pensiero filosofico e scientifico*. Garzanti.

Heidstra R., Welch D., and Scheres B. (2004) Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis SCARECROW* action in asymmetric cell division. *Genes & Dev.* 18,1964–1969

Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T., and Benfey, P.N. (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101: 555–567.

Horvitz H.R., and Herskowitz I. (1992) Mechanisms of Asymmetric Cell Division: Two Bs or Not Two Bs, That Is the Question. *Cell*, 68, 237-255

Levesque M.P, Vernoux T, Busch W, Cui H, Wang J.Y, Blilou I, Hassan H, Nakajima K, Matsumoto N, Lohmann J.U, Scheres B, and Benfey P.N. (2006) Whole-genome analysis of the *SHORT-ROOT* development pathway in *Arabidopsis*. *PloS Biology* 4(5) 0739-52

Jönsson H., Heisler M.G., Shapiro B.E., Meyerowitz, E.M., and Mjolsness E.. (2006). An auxin-driven polarized transport model for phyllotaxis. *Bioinformatics* 21 Suppl. 1:1633-8.

Jürgens G., and Mayer U. (1994) In *A colour Atlas of Developing Embryos* (ed. J. Bard). London: Wolfe Publishing.

Kidner C., Sundaresan V, Roberts K., and Dolan L. (2000). Clonal analysis of the *Arabidopsis* root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta*,

211: 191-199.

Mansfield S. G. and Briarty L.G. (1991). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can. J. Bot.* 69, 461-476.

McCulloch E.A., and Till J.E. (2005). Perspectives on the properties of stem cells. *Nat. Med.* 11(10):1026-1028.

Michniewicz, M., Brewer P. B., and Friml J. N.d. Polar Auxin Transport and Asymmetric Auxin Distribution. In *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.

Mjolsness, E, D H Sharp, and J Reinitz. 1991. A connectionist model of development. *J. Theor. Biol.*, 152,429-53.

Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., and Benfey, P.N. (2001) Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413, 307–311.

Oparka, K.J. (2004) Getting the message across: How do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends Plant Sci.* 9, 33–4

Prusinkiewicz, P, and A. Lindenmayer. 1990. *The algorithmic beauty of plants*. Springer-Verlag New York, Inc. New York, NY, USA.

Pysh L.D., Wysocka-Diller J., Camilleri C., Bouchez D. and Benfey P.N. (1999) The *GRAS* gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *Plant J*, 18(1), p. 111-9.

Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J. Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P, and Scheres B. (1999) An auxin-dependent

distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463-72.

Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B. (2003) *SCARECROW* is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes & Dev.* 17, 354–358.

Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M, Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B. , Heidstra R., and Laux T. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446,811-4.

Scheres B. (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007 May;8(5):345-54.

Scheres B, Di Laurenzio L., Willemsen V, Hauser M.-T., Janmaat K., Weisbeek P and Benfey N.P. (1995) Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis *Development* Vol.121, 53-62

Scheres B. and Benfey PN. (1999) Asymmetric cell division in plants *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 505-537

Scheres B. and Berleth T.(1998) Root development: new meanings for root canals? *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 32-36

Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V, Terlouw M., Lawson E, Dean C. and Weisbeek P. (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials *Development* 120, 2475-2487

Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V, Hauser, M.T., Janmaat, K., Weisbeek,

P., and Benfey, P.N. (1995) Mutation affecting the radial organization of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121, 53–62

Schiefeibein J.W. and Benfey N. P (1991) The Development of Plant Roots: New Approaches to Underground Problems *The Plant Cell*, 3, 1147-1 154

Sena, G., Jung, J.W., and Benfey, P.N. (2004) A broad competence to respond to *SHORT-ROOT* as revealed by tissue-specific ectopic expression. *Development* 131, 2817–2826.

Spradling A., Drummond-Barbosa D and Kai T. (2001) Stem cells find their niche. *Nature*. 414, 98-104

Stahl Y., and Simon R. (2005). Plant stem cell niches. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 479-89.

Stroustrup, Bjarne. N.d. *The C++ Programming Language*. Addison-Wesley.

van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P. & Scheres, B. (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* 378, 62–65

van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390, 287–289.

Watt F.M., and Hogan B.L.M. (2000) Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. *Science* 287, 1427-30.

Weigel D., and Jurgens G. (2002). Stem cells that make stems. *Nature* 415, no. 6873:751-4.

Welch D., Hassan H., Blilou I., Immink R., Heidstra R., and Scheres B., (2007). *Arabidopsis* JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting *SHORT-ROOT* action. *Genes & Dev.* 21:2196-204.

Wildwater M., Campilho A., Perez-Perez J.M., Heidstra R., Blilou I., Korthout H, Chatterjee J., Mariconti L. Gruissem W., Scheres B. (2005). The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* 123,1337-49.

Wysocka-Diller, J.W., Helariutta, Y., Fukaki, H., Malamy, J.E., and Benfey, P.N. (2000) Molecular analysis of *SCARECROW* function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127, 595–603.

Zhu, T., W. J. Lucas, and T. L. Rost. 1998. Directional cell-to-cell communication in the *Arabidopsis* root apical meristem I. An ultrastructural and functional analysis. *Protoplasma* 203, no. 1: 35-47.