

Monica Zoppè, laureata in biologia a Milano, ha lavorato in Italia, Inghilterra e Stati Uniti prima di raggiungere l'Istituto di fisiologia clinica del CNR, dove ha fondato e dirige il gruppo SciVis. Da alcuni anni si dedica alla biologia computazionale e alla soluzione dei problemi legati alla visualizzazione.



Vedere l'invisibile

Un gruppo di ricercatori italiani sfrutta le più avanzate tecniche di grafica computerizzata e i più rigorosi criteri scientifici per realizzare straordinarie «esplorazioni» virtuali all'interno delle cellule

di *Monica Zoppè*

Nella squadra erano tutti esploratori esperti, ma nessuno ricordava di aver mai visto niente del genere. Fin dall'inizio, quando lo strano pianeta non era che una sfera sullo schermo, la sua massa informe aveva suscitato una strana attrazione. «Sembra viva», disse qualcuno. Ma regolamento e buon senso imponevano prudenza; nessuno parlò apertamente del desiderio di puntare dritti alla superficie della sfera.

Le ore trascorse nell'orbita di sicurezza non furono però di attesa vana. Il «pianeta» pareva nuotare nel plasma, anziché lasciarsi trasportare come tutto il resto. Inoltre, l'impressione di vitalità fu confermata. Era dovuta a una miscela di caratteri, uno più sorprendente e suggestivo dell'altro. Sulla superficie si intravedevano fluttuazioni, che, quando poterono avvicinarsi di più, si definirono meglio: un braccio che si estrudeva dalla superficie, rompendone la sfericità e oscillando come un tentacolo; strane strutture, più corte e allungate, come altissimi muri di gomma flessibili e fluttuanti; anche dove il suolo pareva più pianeggiante, si riusciva a cogliere del movimento. Arrivando ancora più vicino notarono che la superficie non era omogenea; c'erano chiazze, anche queste in movimento; zone quasi lisce alternate ad aree popolate di oggetti dalle forme e dimensioni più disparate, che sembravano intente a qualche attività, oppure, semplicemente, si agitavano nelle correnti che sembravano solcare l'atmosfera, correnti di cui le prime analisi rivelarono una composizione peculiare, ricca di alcune sostanze e ioni, e stranamente soggetta a intensi campi elettrici. Poi, finalmente, la nave atterrò. E quando uscirono si trovarono di fronte uno spettacolo mozzafiato: decine e decine di forme mai viste; un paesaggio quasi onirico, una natura in cui nulla era familiare, ma tutto pareva fascinosamente e inequivocabilmente vivo.

Questo potrebbe essere l'inizio del racconto di un'ipotetica squadra di esploratori umani che si imbatte in una cellula ingrandita 10 milioni di volte. Nel nostro laboratorio è in corso uno sforzo per rendere possibile quest'esperienza virtuale.

L'«ingrandimento» della cellula non avviene tramite un microscopio, ma usando strumenti di grafica computerizzata (*Computer Graphics*, o CG) 3D con cui ricostruiamo l'ambiente e gli attori cellulari, basandoci su dati e conoscenze ricavati dalla letteratura

e dalle banche dati internazionali. In questo modo ricreiamo la superficie cellulare che fluttua, si innalza in creste o sprofonda in avvallamenti mobili; costruiamo le «zattere» (*rafts*) di proteine che si spostano sulla superficie, modelliamo le proteine e definiamo i loro movimenti tramite le tecniche di animazione della CG. È questa la nostra tecnica di «esplorazione» di quel pianeta che è la cellula, e dei suoi «abitanti». Dal nostro viaggio riportiamo immagini e filmati che mostrano quel paesaggio altrimenti invisibile.

Tutte le immagini contesa SciVis, salvo diversamente indicato

Una porzione della membrana cellulare è qui presentata in un'illustrazione a colori elaborata a partire dalle immagini sviluppate con la tecnica esposta in queste pagine. L'immagine originale in bianco e nero è a pagina 69.



Software per animare la vita

Blender è un programma completo di animazione e grafica 3D, prodotto e distribuito in *open source* per la maggior parte dei sistemi operativi. È curato dalla Blender Foundation, che lo aggiorna e lo arricchisce costantemente, e coordina il contributo dei numerosi sviluppatori volontari che partecipano a questa impresa. Blender offre la possibilità di eseguire tutte le fasi della creazione di filmati in animazione e video-giochi in 3D, a partire dalle fasi di modellazione, *rigging* e animazione, fino al *rendering* e *compositing*; dispone di funzionalità per map-pature UV, simulazioni di fluidi, di rivestimenti e di particelle, oltre a offrire altre possibilità di si-

mulazioni fisiche non lineari. Questo robusto insieme di funzionalità lo rende paragonabile, per caratteristiche e complessità, ad altri noti programmi proprietari (cioè non accessibili, né gratuiti) per la modellazione 3D usati nell'industria cinematografica. Sulla base di questo programma, il nostro gruppo SciVis ha realizzato BioBlender, una versione speciale di Blender con un'interfaccia aggiuntiva e altre funzioni automaticamente incluse, che permettono l'importazione e la visualizzazione di dati molecolari, che il programma può interpretare grazie a una serie di librerie e codici inseriti per questo scopo. Con BioBlender è possibile

importare uno o più file pdb e visualizzare le molecole, calcolarne il movimento fra eventuali conformazioni diverse e mostrarne la superficie con le sue proprietà lipofiliche ed elettrostatiche. Nella scena sono anche inseriti automaticamente una telecamera e fonti di luce (virtuali), di modo che è possibile, anche per un assoluto principiante, effettuare il rendering di immagini o video che mostrano la proteina. Ovviamente BioBlender offre tutte le caratteristiche di Blender, per cui l'utente esperto, una volta importata la molecola, può lavorare sulla sua visualizzazione con tutte le funzioni del programma 3D.

Per quanto affascinanti possano apparire i filmati ottenuti con il nostro lavoro, mostrare per immagini non ha solo uno scopo artistico: può servire all'insegnante, allo studente liceale o allo studioso dilettante a cui interessano i principi base della biologia. Ma soprattutto immagini come queste, strettamente fondate su dati scientifici frutto di ricerca sperimentale, servono a ricercatori e studenti universitari. Infatti la possibilità di vedere in attività le molecole oggetto di studio, con forme e dimensioni proporzionalmente corrette, apre nuove prospettive nel campo della ricerca biologica e favorisce la nascita di nuove idee. La bellezza straordinaria di questi «paesaggi», e l'occasione di offrire a tutti un'esperienza con notevoli lati estetici ed artistici non è, comunque, un aspetto secondario nel nostro sforzo.

Leggendo la tabella nella pagina a fronte, vediamo che cosa significa in termini pratici questa espansione di dimensioni: ingrandire 10 milioni di volte vuol dire che una molecola d'acqua raggiunge le dimensioni di un insetto: una zanzara o una coccinella, cioè poco meno di 3 millimetri. Se pensiamo che con lo stesso fattore di ingrandimento l'intera cellula (a seconda del tipo) assume dimensioni comprese fra i 500 e i 1000 metri, cioè le dimensioni di un piccolo lago o di un piccolo paese, ci rendiamo conto di quanto sia calzante il paragone fra una cellula e un «piccolo mondo».

Nel seguire questo percorso, complesso e innovativo, siamo partiti dalla considerazione che, oltre alle descrizioni biochimiche e genetiche «classiche», disponiamo da alcuni anni di informazioni strutturali e dinamiche sui fenomeni cellulari in quantità tale da permetterne una descrizione abbastanza dettagliata anche in termini visivi. Per esempio per quanto riguarda le proteine, attori fondamentali nello scenario cellulare, la Protein Data Bank contiene decine di migliaia di file in cui sono riportate le «fotografie in 3D» (ovvero le coordinate atomiche) di molte molecole, a volte in «pose» diverse. Tuttavia per molte persone, anche tra i professionisti, è difficile raffigurarsi le molecole, le loro forme e le loro interazioni, anche con un intenso sforzo di immaginazione.

Allo stesso tempo, le tecniche sviluppate dalla CG hanno raggiunto un livello di sofisticazione tale da rendere fattibile l'impresa di ricreare in ambientazioni tridimensionali almeno alcuni spacca-

Vedere in attività le molecole oggetto di studio apre nuove prospettive di ricerca e stimola nuove idee

ti del mondo cellulare e di realizzare animazioni in grado di visualizzarne i complessi processi biochimici che vi si svolgono.

Abbiamo quindi deciso di intraprendere uno sforzo per riuscire a «vedere» (e far vedere) i fenomeni invisibili che costituiscono le basi dei processi vitali, rendendoli comprensibili e accessibili anche ai non addetti ai lavori. Per questo ci dedichiamo in particolare alle proteine; infatti, se il DNA è l'«Enciclopedia Britannica» del nostro essere vivi, sono le proteine a svolgere

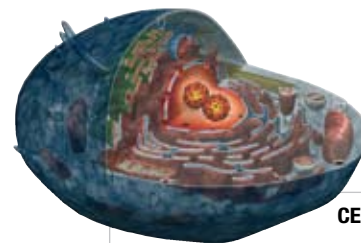
quasi tutte le attività funzionali alla vita.

Il gruppo, nato in piccolo e ampliatosi nel 2008 grazie a un finanziamento, ormai purtroppo esaurito, della Regione Toscana, è quindi impegnato su tre fronti: l'animazione delle proteine (*Protein Animation*), la loro visualizzazione (*Protein Representation*) e la realizzazione di filmati (*filming, scene setting e camera direction*).

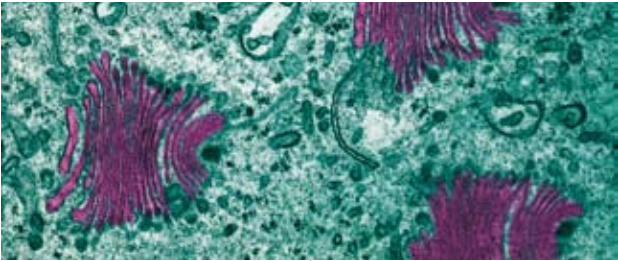

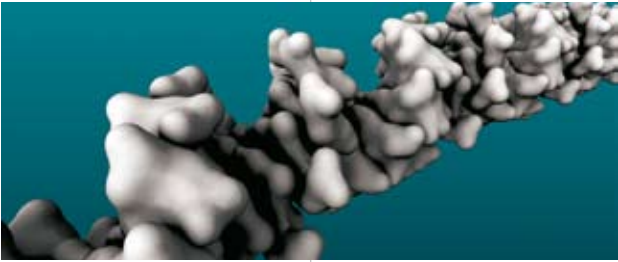



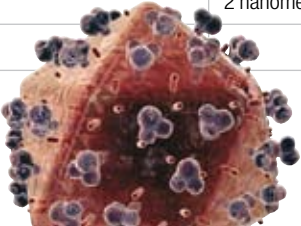
Animazione

Lo studio delle proteine si avvale principalmente di tecniche indirette, basate sulla genetica, la biochimica, la microscopia e la biologia cellulare. Se è vero che le prime informazioni sulla loro struttura risalgono agli anni cinquanta (con l'identificazione della struttura della mioglobina da parte di John Kendrew), è solo negli ultimi anni che questo campo ha visto un'espansione di studi e risultati, grazie allo sviluppo di tecniche sempre più sofisticate quali cristallografia a raggi X, risonanza magnetica nucleare, diverse varietà di microscopia ottica, elettronica e a raggi X, e a programmi sempre più potenti per l'elaborazione e l'interpretazione dei dati. Oggi sono molte migliaia le proteine di cui è nota la struttura, ovvero la posizione di tutti gli atomi che la compongono, solitamente nell'ordine di migliaia. In alcuni casi, sono conosciute diverse conformazioni della stessa proteina, derivanti dalle differenti condizioni in cui la proteina è osservata e legate alle diverse funzioni che la stessa proteina è chiamata a svolgere.

L'elaborazione dei movimenti delle proteine è ancora una disciplina pionieristica: metodi diversi sono usati in vari centri di ricerca, ma siamo lontani dall'aver trovato una soluzione soddisfacente, in grado di ottenere risultati validi in modo costante e non troppo dispendioso in termini di tempo e potenza di calcolo.



Dimensioni a confronto

CELLULA	5-100 micrometri	CITTÀ	50 metri-1 chilometro
Strutture interne			
Nucleo	3-15 micrometri	Campo sportivo, grattacielo	30-150 metri
Apparato di Golgi	1-5 micrometri	Edificio (3-6 piani), aereo	10-50 metri
			
Membrane (spessore)	5-7 nanometri	Muri interni, portone (spessore)	5-7 centimetri
Ribosomi	30 nanometri	Gatti	30 centimetri
Proteine			
GFP, Actina	3-4 nanometri	Albicocca	3-4 centimetri
Spettrina	100 nanometri	Serpente	1 metro
NFkB complex	10-12 nanometri	Pompelmo	10-12 centimetri
Doppia elica DNA (diametro)	2 nanometri	Tube per acqua (diametro)	2 centimetri
			
Altre molecole			
ATP	1,5 nanometri	Ciliegia	1,5 centimetri
ione Ca ⁺⁺ (nudo)	0,2 nanometri	Formica	2 millimetri
ione Ca ⁺⁺ (idrato)	1,2 nanometri	Nocciola	1,2 centimetri
Acqua (H ₂ O)	0,28 nanometri	Zanzara, coccinella	2,8 millimetri
			
Zucchero (glucosio)	0,6 nanometri	Pisello	6 millimetri
Colesterolo	2 nanometri	Ape	2 centimetri
Virus (HIV)	100 nanometri	Bambino di 5-6 anni	1 metro
			

3d4Medical.com/Corbis (cellule); Don W. Fawcett/SPU/Contrasto (apparato di Golgi); George Hall/Corbis (aereo); Lawrence Manning/Corbis (tubo); Laguna Deasing/SPU/Contrasto (acqua); Image Source/Corbis (coccinella); Zygote Media Group (HIV)

Registi dell'ultrapiccolo

La nostra «squadra di esplorazione», il team dell'Unità di visualizzazione scientifica dell'Istituto di fisiologia clinica del CNR di Pisa (SciVis) diretto da Monica Zoppè, si avvale di competenze in campi diversi e di varie collaborazioni anche internazionali.

Raluca Mihaela Andrei, laureata in fisica medica all'università di Bucarest, Romania, è dottoranda in biologia molecolare alla Scuola Normale Superiore di Pisa, e si occupa di nuovi metodi per la visualizzazione 3D delle proprietà di superficie delle molecole.

Marco Callieri, è ricercatore all'Istituto di scienza e tecnologie dell'Informazione del CNR. Laureato e dottorato in informatica a Pisa, i suoi interessi comprendono 3D scanning, acquisizione e gestione di dati tridimensionali.

Ilaria Carlone, laureata in biotecnologie farmaceutiche a Bologna. A Pisa ha conseguito il dottorato di ricerca in biotecnologie molecolari e nel gruppo SciVis studia i movimenti di proteine su larga scala.

Claudia Caudai e **Maria Antonietta Pascali**, entrambe laureate e dottorate in matematica all'università di Pisa, nel gruppo SciVis si occupano di mo-

dellizzazione cinematografica dei movimenti proteici.

Stefano Cianchetta, diplomato come animatore 3D presso l'Istituto Quasar di Roma, attualmente studia Scienze della Formazione e lavora nel gruppo come animatore 3D.

Tiziana Loni, diplomata in arte applicata e comunicazione visiva, studia informatica e lavora in computer graphics come texture artist, modellatrice e animatrice 3D dal 2006. Utilizza prevalentemente programmi Open Source quali Blender e Gimp, su piattaforma Linux.

Mike Pan, studente di informatica a Vancouver (Canada), sviluppatore di Blender, ha trascorso 6 mesi con noi, aiutando ad integrare le funzioni biologiche nel programma Blender.

Maria Francesca Zini si è laureata in chimica a Pisa, e ha completato un master in multimedia presso l'Università di Firenze. Ha lavorato in società di Information Technology, occupandosi di analisi e sviluppo di software. Collabora dal 2008 al nostro progetto occupandosi di programmazione e sviluppo.

Il metodo che stiamo mettendo a punto favorisce la rapidità e facilità di calcolo: i risultati ottenuti si sono dimostrati validi in casi specifici, in particolare per identificare percorsi di transizione tra «pose» che fanno parte di uno stesso «stato».

Il metodo si basa sul programma di grafica 3D Blender (*si veda il box in alto*), per cui abbiamo elaborato un nuova applicazione, BioBlender, capace di usare le coordinate presenti nei database scientifici non solo per ricreare la struttura nella scena 3D, ma anche per far muovere tutti gli atomi calcolando così una possibile transizione da una conformazione all'altra.

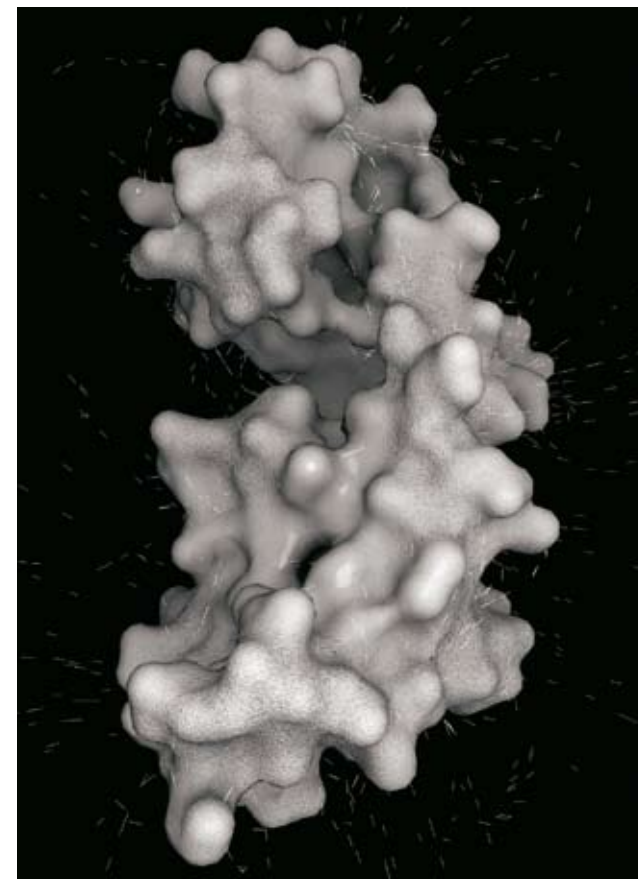
Imponendo alcune regole sui comportamenti permessi o vietati agli atomi, facciamo muovere le proteine, un po' come fossero pupazzi complicatissimi. Una volta calcolate le conformazioni intermedie, è possibile validarle tramite i normali programmi usati per verificare la correttezza delle strutture identificate. In questo modo, con uno sforzo importante di interdisciplinarietà, riusciamo a usare per la ricerca una tecnologia sviluppata per tutt'altri scopi, che sono l'industria del divertimento, cinema, televisione e videogiochi.

Visualizzazione

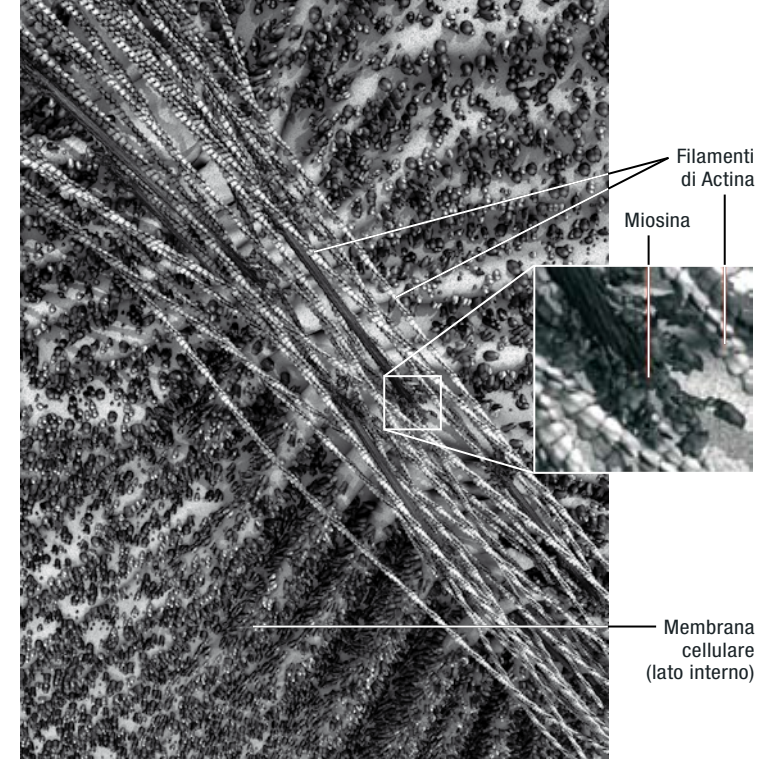
Le proteine però non sono «solo» complessi insiemi di atomi: questi ultimi infatti definiscono sia lo spazio occupato (cioè la forma, calcolata come il volume non accessibile ad altre molecole, di solito di acqua), sia le proprietà che ne caratterizzano la superficie e che sono importanti per le loro attività e per il loro comportamento nei confronti di altri oggetti cellulari.

Avvalendoci di diversi programmi scientifici (tra cui, per esempio Swiss PDBViewer, VMD o Chimera), di altri realizzati da noi stessi (SciVis.exe) e, di nuovo, di Blender, abbiamo elaborato un codice per rendere visibili e percepibili in modo immediato e simultaneo alcune caratteristiche chimico-fisiche, come il potenziale lipofilico e il potenziale elettrostatico.

Il potenziale lipofilico è la tendenza della superficie molecolare a interagire preferibilmente con altre molecole polari (come l'acqua) oppure non polari (come i lipidi). Il potenziale elettrostatico è una misura della capacità della molecola di respingere o attirare altri corpi se questi sono dotati di carica elettrica. Entrambe queste proprietà influenzano profondamente quello che potremmo definire il



La calmodulina è una proteina capace di legare quattro ioni calcio, e, di conseguenza, di attivare altre proteine, trasmettendo così un segnale che da chimico (ioni calcio) diventa biologico (proteina attivata). Nella sua nuova conformazione, la calmodulina può, tra l'altro, attivare la contrazione del fascio di actina e miosina nell'anello contrattile (*immagine a fronte in alto; a fronte in basso, l'originale dell'immagine presentata a pagina 65*).

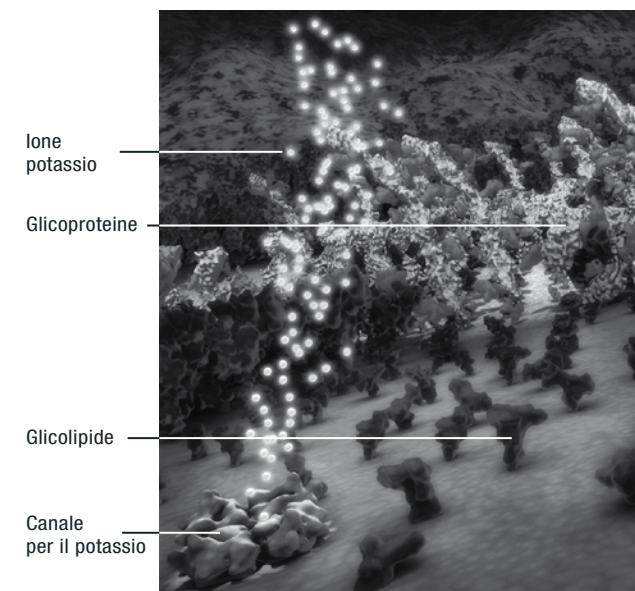


Nota sulle figure

Le immagini riprodotte in queste pagine derivano dal video *PROTEIN EXPRESSIONS – Study N.3*, in cui sono messi in pratica gli studi esposti nell'articolo. Il video è interamente in bianco e nero, tranne la parte in cui la cellula è vista nel suo insieme, a un livello di ingrandimento raggiungibile con strumenti ottici.

La scelta di non inserire colori è determinata da diversi fattori:

- le molecole rappresentate non hanno colore;
- i colori non sono necessari per esprimere i concetti chimici e fisici che riusciamo a calcolare;
- vi sono altri concetti, anche questi difficili da comunicare visivamente, per cui i colori potranno essere utilizzati in un futuro (per esempio potenziale riducente, pressione, pH...);
- l'aggiunta di colori potrebbe distrarre l'attenzione dell'osservatore, senza fornire informazioni biologicamente rilevanti.



comportamento sociale delle molecole: la loro tendenza a essere attratte o meno da altri tipi di molecole, il tipo di movimento quando si incontrano con altre molecole, proteine o superfici diverse.

Il «ritratto» della calmodulina (*pagina a fronte*), uno dei nostri cavalli di battaglia, illustra il risultato: la forma è calcolata come volume esclusivo degli atomi della proteina, sulla superficie il potenziale lipofilico è rappresentato attraverso le proprietà del materiale e cioè con una scala di valori che va dal ruvido e opaco per aree più idrofile al liscio e lucido riflettente per le zone più lipofili- che; infine, il potenziale elettrostatico viene rappresentato dalle linee che sembrano emanare dal corpo della molecola, tracciate con piccoli segmenti animati che scorrono lungo le linee di campo, dal polo positivo al polo negativo.

Costruzione dell'ambiente e regia

I passaggi descritti aiutano a capire i movimenti e le caratteristiche delle proteine considerate singolarmente o in piccoli gruppi. Tuttavia ci interessa anche inserire questi oggetti in un contesto che faccia percepire l'ambiente in cui le molecole operano. L'interno di una cellula è un luogo incredibilmente affollato; si calcola che ogni proteina si incontri mediamente con almeno altre due o tre in ogni momento. È un po' come quando ci troviamo in un vagone di metropolitana molto affollato; per avvicinarci all'uscita dobbiamo farci largo tra gli altri passeggeri, con la differenza che nella cellula l'affollamento è in tre dimensioni: non solo intorno alla proteina, ma anche sopra e sotto. Per noi esseri umani è difficile immaginare un luogo privo di gravità quale è la cellula (dove in realtà c'è, ma è irrilevante, date le masse minuscole in gioco), e in cui il pH (cioè l'acidità, o la concentrazione di protoni) e il potere riducente (la presenza di radicali ossidanti) sono importanti quanto il vento o la temperatura nella nostra vita quotidiana. È anche difficile trasmettere le relazioni di scala: quando si parla di nanometri e micrometri, pochi riescono a visualizzare intuitivamente che tra loro c'è un rapporto pari a quello tra metri e chilometri.

Per questo abbiamo inserito i risultati del nostro lavoro di più stretto interesse scientifico nei filmati da noi realizzati (tutti scaricabili gratuitamente dal nostro sito), in cui una parte introduttiva accompagna i visitatori in un viaggio nella scala di dimensioni: da millimetri a micrometri, fino ai dettagli atomici e molecolari, misurabili in nanometri. Questo lavoro è affidato agli artisti grafici del gruppo, i quali, seguendo le indicazioni derivate dalla letteratura scientifica, hanno ricreato sia gli ambienti più grandi (la vena) sia quelli più piccoli (la cellula e le strutture al suo interno), nonché tutte le scene più dettagliate, come la membrana cellulare e i fasci di microtubuli. Infine, per creare un filmato in *computer graphics*, allo stesso modo di un filmato con riprese dal vivo, è necessario studiare e impostare l'illuminazione, lo sfondo, la posizione della camera da presa e i suoi spostamenti, le lenti eccetera... Insomma, abbiamo dovuto anche improvvisarci registi!

PER APPROFONDIRE

BioBlender: Fast and Efficient All Atom Morphing of Proteins Using Blender Game Engine. Zini M.F. e altri, disponibile su arxiv.org/pdf/1009.4801.

BioBlender: A Software for Intuitive Representation of Surface Properties of Biomolecules. Andrei R.M. e altri, disponibile su arxiv.org/pdf/1009.4674.

Visualization methods for molecular studies on the web platform. Callieri M. e altri, 15th International Conference on 3D Web Technology, 22-24 luglio 2010, Los Angeles, California.

Il sito del SciVis, da cui è possibile scaricare i filmati realizzati dal team: <http://www.scivis.ifc.cnr.it>.