



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



**DIPARTIMENTO
DI INGEGNERIA
DELL'INFORMAZIONE**

DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**ANALISI E IMPLEMENTAZIONE DI SISTEMI A RETROAZIONE
TRAMITE CIRCUITI BIOLOGICI SINTETICI.**

Relatore: Prof. Ferrante Augusto

Laureando: Mosele Fabio

ANNO ACCADEMICO 2022 – 2023

Data di laurea 27/09/2023

Indice

Introduzione.	2
1 – La teoria del controllo e la biologia sintetica.	4
2 - Il controllore antitetico integrale a retroazione.	16
3 - Realizzazione di controllori PID tramite biomolecole.	24
4 – La realizzazione di cellule Beta-mimetiche per il controllo della glicemia.	34
Bibliografia	42

Introduzione.

Lo sviluppo di nuovi metodi di analisi e implementazione di sistemi artificiali in ambienti biologici permette di applicare metodi conosciuti e già ampiamente utilizzati in ambito industriale anche in condizioni più imprevedibili, come quelle tipiche del corpo umano.

Molti processi sfruttano naturalmente alcune di queste caratteristiche, come ad esempio la retroazione (o feedback), ampiamente utilizzata da diversi organi del nostro corpo per permettere una grande varietà di processi cruciali per la sopravvivenza dell'individuo come, ad esempio, il controllo della produzione di insulina da parte del pancreas in seguito a variazioni del livello di glucosio nel sangue.

La sfida principale consiste nell'applicare artificialmente questi processi all'interno delle cellule del corpo umano variando il patrimonio genetico di quest'ultime per portare alla produzione di specifiche molecole, principalmente proteine, che diano vita a veri e propri circuiti biologici: la scienza alla base di questi studi prende il nome di biologia sintetica.

I principali sistemi che verranno analizzati nel seguente elaborato sono principalmente due: il "controllore antitetico integrale", che sfrutta le proprietà conosciute dei controllori integrali studiati nella teoria e le condizioni imprevedibili e altamente rumorose delle reazioni tipiche dei sistemi biologici per ottenere stabilità, e i controllori "proporzionali-integrali-derivativi", anche detti controllori PID, molto diffusi in ambito industriale ma ancora in sviluppo per l'utilizzo in ambiente biologico. Entrambe le categorie verranno analizzate osservando la teoria che si è considerata per il loro sviluppo, a partire dalla loro ideazione per poi passare ai modelli matematici a essi associati, le eventuali approssimazioni considerate e le limitazioni legate alle condizioni di utilizzo.

Verrà prestata grande attenzione anche all'applicazione di questi controllori in ambito pratico, osservando i punti a favore e sfavore della loro applicazione e permettendo di considerare quale sia la soluzione migliore per una moltitudine di processi.

Infine, essendo il concetto di pancreas artificiale uno degli obiettivi più importanti che l'ingegneria biomedica si pone di sviluppare appieno, si analizza anche la produzione e coltivazione in laboratorio di cellule idonee alla produzione di specifici composti, come insulina e glucagone, per permettere la cura di patologie come il diabete mellito.

Una tecnica simile, che sfrutta completamente i concetti sviluppati grazie alla biologia sintetica, può essere presa come punto di riferimento anche per la realizzazione di terapie che non riguardino esclusivamente il pancreas, ma che si estendono a diversi organi del nostro corpo.

1 – La teoria del controllo e la biologia sintetica.

La teoria del controllo permette di ottenere le basi necessarie per analizzare i problemi complessi legati ai processi fisiologici necessari per il corretto funzionamento del corpo umano e ideare soluzioni utili tramite l'applicazione di determinati circuiti, sistemi e componenti.

Nel campo dell'automatica, il primo fondamentale concetto da esplicitare è il “Problema di controllo”, definito per un sistema fisico all'interno del quale si possono identificare tre variabili diverse, tutte dipendenti dal tempo, che prendono il nome di “segnali”. [1]

Abbiamo, infatti, variabili controllate (anche dette uscite), variabili di controllo (ingressi) e disturbi: le prime sono la parte del sistema a cui si vuole imporre un determinato andamento agendo sulle variabili controllabili, facendo poi attenzione alla presenza di eventuali disturbi che influenzano le uscite, solitamente in maniera nociva e imprevedibile; gli ingressi sono gli strumenti tramite i quali è possibile agire sul sistema, delle variabili manipolabili che devono permettere l'ottenimento di uscite diverse a seconda delle proprie caratteristiche: ciò permette lo sviluppo di sistemi con caratteristiche favorevoli all'applicazione desiderata.

Infine, i disturbi agiscono sul sistema influenzando le uscite in maniera imprevedibile, di conseguenza con un effetto che può essere nocivo e che deve essere contrastato. [1]

Il problema di controllo consiste nel selezionare l'andamento temporale degli ingressi in modo che le uscite abbiano un comportamento desiderato anche in presenza di disturbi.

Per poter analizzare questi problemi, risulta fondamentale poter contare sui “modelli matematici” e due concetti fondamentali: l'astrazione e l'approssimazione, che permettono di effettuare una valida trasformazione da processo fisico a modello matematico senza perdere le caratteristiche fondamentali necessarie per una corretta analisi ed elaborazione del problema.

L'astrazione consiste nel far cogliere al modello matematico solo le caratteristiche d'interesse del sistema fisico, in maniera tale da ottenerne una rappresentazione sintetica ma, allo stesso tempo, il più fedele possibile.

L'approssimazione, invece, consiste nel considerare che il modello che sarà definito sarà sempre una rappresentazione approssimata della realtà, che non potrà quindi mai essere allo stesso livello del processo fisico, anche per ragioni di semplificazione dei calcoli e dei processi che avvengono al suo interno.

Uno dei concetti più importanti del campo della teoria del controllo è sicuramente il sistema a feedback, anche detto a retroazione, nello specifico il “feedback a catena chiusa”, sistema in cui il controllore elabora l'ingresso di controllo utilizzando anche informazioni provenienti dalle misure della variabile controllata.

Il concetto di feedback è tutto fuorché estraneo al mondo naturale: esso viene sfruttato non solo dagli esseri umani, in modo tale da mantenere sotto controllo valori di vitale importanza per il

corretto funzionamento del corpo e del suo mantenimento in vita, ma da tutti gli esseri viventi sul nostro pianeta.

Ciò si collega all'omeostasi, il mantenimento di un equilibrio dei valori fondamentali chimico-fisici interni del corpo umano, anche in seguito alla variazione delle condizioni esterne: questo può avvenire grazie a un attento controllo delle grandezze rilevanti tramite precisi meccanismi autoregolatori, ad esempio cellule e biomolecole che si comportano come componenti di un circuito, permettendo “lo spegnimento” e “l'accensione” di determinati processi quali la regolazione di glicemia o il controllo della pressione sanguigna all'interno dei vasi.

È fondamentale per ogni essere vivente mantenere una relazione complessa con l'ambiente che lo circonda: ciò riguarda anche le singole cellule, la maggior parte delle quali sono in costante comunicazione con il “mezzo interno” costituito da liquido extracellulare con cui effettua continui scambi che permettono la sua sopravvivenza. [2]

Molti meccanismi omeostatici possono essere descritti tramite concetti come la retroazione: infatti, il feedback permette di ottenere ottime capacità di reiezione dei disturbi indesiderati, così da garantire buone prestazioni anche in presenza di quest'ultimi. Il feedback garantisce anche robustezza: permette, cioè, di avere prestazioni accettabili anche in presenza di variazioni (per esempio, dei parametri del modello). Il feedback può essere sia negativo che positivo, a seconda che l'uscita del sistema sia rispettivamente sottratta o sommata al valore di controllo: ciò causa una intrinseca stabilizzazione del processo da controllare per il feedback negativo, mentre una intrinseca destabilizzazione per quanto riguarda l'azione positiva. [2]

D'altro canto, è possibile anche l'applicazione di controllo basandosi su concetti più semplici e di facile applicazione, come la regolazione a catena aperta, anche detta “feedforward”. In questo caso, il segnale in ingresso è indipendente da quello in uscita, basandosi quindi solo su fattori di previsione e necessitando di una buona conoscenza della dinamica del sistema. Un esempio di questi processi nel corpo umano è, ad esempio, la preparazione del sistema cardiocircolatorio all'attivazione muscolare: frequenza cardiaca e respiratoria aumentano prima del raggiungimento del culmine. [2]

Per quanto riguarda la retroazione negativa invece, uno degli esempi più palesi in ambito cellulare consiste nella pompa sodio-potassio, la quale garantisce il mantenimento dei livelli corretti di potenziale elettrico all'interno delle cellule elettricamente eccitabili permettendo il passaggio degli ioni solo in seguito alla ricezione di determinati stimoli.

Per poter, però, applicare il feedback è utile poter esplicitare il legame instaurato tra ingresso e uscita: ciò può essere fatto tramite la definizione di modelli di stato. Essi consistono in coppie di equazioni che definiscono questo legame, in cui sono presenti una equazione differenziale del primo ordine, detta dinamica, e una equazione di uscita, detta statica. Queste due equazioni

dipendono dallo stato del sistema, indicato da un vettore $x(t)$ composto da “n” componenti (in cui n definisce l’ordine del sistema), e dall’ingresso $u(t)$ del sistema stesso:

$$\begin{cases} \dot{x}(t) = f(x(t), u(t)) \\ y(t) = h(x(t), u(t)) \end{cases}$$

Equazione 1, modelli di stato. [1]

La soluzione $\tilde{x}(t)$ della prima equazione del sistema rappresentato in Eq.1, con condizione iniziale $x(t) = x_0$ e con $u(t) = \tilde{u}(t)$ si dice evoluzione dello stato per $t \geq t_0$, mentre la corrispondente $\tilde{y}(t_0)$ si dice evoluzione dell’uscita. [1]

Se le due funzioni ottenute da Eq.1 sono lineari della coppia (x, u), allora il sistema viene detto lineare: la linearità di un sistema è una caratteristica fondamentale poiché rende più semplice la sua trattazione ed è quindi una proprietà molto richiesta, ma poco spesso presente quando si ha a che fare con ambienti naturali. Essi sono rappresentabili tramite:

$$\begin{cases} \dot{x}(t) = Ax(t) + bu(t) \\ y(t) = cx(t) + du(t) \end{cases}$$

Equazione 2, modelli di stato per sistemi lineari. [1]

In Eq.2 si nota la presenza di diversi termini specifici: $A \in \mathbb{R}^{n \times n}$, $b \in \mathbb{R}^{n \times 1}$, $c \in \mathbb{R}^{1 \times n}$, $d \in \mathbb{R}$; in questo caso, **A** prende il nome di matrice di stato del sistema. [1]

Si può osservare una più facile definizione dei singoli parametri dei sistemi lineari, che permettono di ottenere modelli di più semplice e immediata implementazione.

Per questo motivo, tornerà molto utile il processo di “linearizzazione”, soprattutto per quei sistemi nei quali traiettorie di stato e ingresso si mantengono in un intorno del punto di equilibrio, un punto per il quale, avendo a che fare con un ingresso $u = \bar{u}$ per $t \geq 0$ e allo stato iniziale $x(0) = \bar{x}$, l’evoluzione dello stato corrisponde a $x = \bar{x}$ per $t \geq 0$. Ovvero, un punto per il quale avendo un ingresso costante, lo stato non si discosta dal suo valore iniziale. Ciò permette di considerare la dinamica degli spostamenti approssimabile a quella di un sistema lineare, fatto utilissimo nell’ambito dei sistemi biologici in quanto il punto di equilibrio attorno al quale si eseguono queste considerazioni è spesso il valore fisiologico a cui è necessario ricondurre una determinata quantità per il mantenimento dell’omeostasi. [1]

I modelli di stato sono necessari per rappresentare tutte le caratteristiche del sistema e devono essere necessariamente sia semplici che accurati. Un modello che presenta delle semplificazioni troppo grossolane non sarà di alcuna utilità, ma allo stesso modo un modello troppo accurato potrebbe complicare l’analisi senza che ve ne sia la necessità. Innanzitutto, è necessario fissare sia ingressi, che uscite, che un insieme di variabili di stato, definibili anche grazie a una legge che ne mette in evidenza l’evoluzione nel tempo.

La realizzazione di sistemi rappresentabili tramite modelli lineari in singole cellule rappresenta l'obiettivo che si vuole porre per il miglioramento delle cure e delle terapie disponibili per il trattamento di un grande numero di condizioni che affliggono il corpo umano.

Per ottenere dei sistemi a retroazione sarebbe cruciale poter procedere con un approccio modulare, utilizzando delle interconnessioni tra diversi componenti che presentano delle proprietà favorevoli al tipo di controllo che si vuole ottenere: però, componenti che si comportano in maniera modulare e che sono robusti e accurati sono piuttosto difficili da trovare nell'ambito della biologia sintetica. [3]

La biologia sintetica è un campo di ricerca molto recente e attualmente in via di sviluppo in cui circuiti biomolecolari sono assemblati in cellule viventi con l'obiettivo finale di controllare il comportamento cellulare per utilizzi di diversa natura, come ad esempio energetica, ambientale, o anche medicinale. [3]

Però, a causa della non linearità, variabilità, mancanza di modularità e anche per la natura stocastica dei processi biomolecolari stessi, la realizzazione di circuiti di questa natura diventa spesso un processo molto laborioso.

L'implementazione del feedback negativo nella biologia sintetica cade sotto due categorie principali: feedback "in-cell" e feedback "in silico" [3]. Per poter definire questi due sottogruppi, è di fondamentale importanza il riconoscimento di due tipi di processi osservabili: reazioni da controllare e reazioni di controllo.

Nella prima categoria di feedback, infatti, sia il processo che il controllore sono realizzati nella cellula tramite processi biomolecolari; questa applicazione è più adatta per situazioni in cui la cellula deve funzionare in maniera autonoma e programmata. Invece, nel feedback "in silico" l'intera cellula è il processo che deve essere controllato, mentre il controllore viene implementato tramite l'utilizzo di un calcolatore: ciò è utile per processi in cui le cellule possono solo essere parzialmente geneticamente modificate. [3]

Si può notare quanto sia fondamentale poter considerare delle componenti modulari che possano essere combinate in maniera diversa per favorire l'ottenimento di un singolo sistema a retroazione. Questa caratteristica, che prende il nome di modularità, risulta teoricamente di facile implementazione quando si considerano le biomolecole presenti nelle cellule umane: infatti, considerando che la velocità di espressione genica può essere controllata da determinate proteine, è possibile immaginare i geni come singole parti di un sistema dinamico in cui le proteine, sia quelle che attivano i geni sia quelle prodotte dall'attivazione dei geni stessi, consistono in ingressi e uscite dei singoli componenti.

Di conseguenza, andando ad unire questi singoli blocchi, si ottengono dei sistemi più complessi e con proprietà migliori, permettendo la realizzazione di processi anche di difficile implementazione.

Purtroppo, però, risulta evidente l'elevato grado di approssimazione che tale visione del problema prevede: infatti, nelle applicazioni pratiche, non è possibile considerare valida l'ipotesi secondo la quale le diverse sequenze di DNA adiacenti nella stessa catena coesistono mantenendo inalterate le proprie caratteristiche indipendentemente dalla natura dei diversi blocchi a contatto diretto. [3]

Questo provoca l'assenza della proprietà di modularità tanto desiderata per la realizzazione dei sistemi di nostro interesse, portando a dover attentamente analizzare le interazioni delle singole sequenze una ad una, con la conseguenza di dover riformulare l'intero sistema quando desideriamo aggiungere altri blocchi. [3]

È possibile, quindi, osservare una differenza fondamentale tra questa disciplina e l'automatica: se in quest'ultima era possibile realizzare sistemi come filtri e amplificatori semplicemente a partire da più componenti diversi interconnessi tra loro, ad esempio tramite serie e paralleli di resistori e condensatori, lo stesso non è valido nell'ambito della biologia sintetica, o almeno non in maniera così diretta.

Nonostante questo, la realizzazione di circuiti sintetici all'interno delle cellule è resa possibile e semplificata dalla presenza innata di componenti che permettono l'espressione genica, la trascrizione e la modifica di proteine, anche se è necessario tenere in considerazione che più grandi diventano i circuiti applicati nelle cellule, maggiori saranno gli effetti negativi per la variazione di fisiologia cellulare che può portare a un maggiore peso del circuito dovuto all'enorme dispendio di energia necessario per il suo funzionamento. [3]

L'applicazione della teoria del controllo permette comunque di osservare dei miglioramenti nei sistemi utilizzabili nell'ambito cellulare, in particolare fornendo una maggiore robustezza e prevedibilità ai processi da implementare, basandosi anche su modelli di stato ben definiti che presentano un certo grado di approssimazione.

I modelli che vengono ideati per rappresentare i processi biomolecolari presentano però una grande limitazione: non sono lineari, portando a situazioni di difficile interpretazione in cui sarà necessario applicare il concetto di linearizzazione precedentemente trattato; è infatti la natura stessa di queste reazioni che avvengono all'interno della cellula a rendere questi processi non lineari, ricchi di rumore e di difficile interpretazione. [3]

Nello specifico, i circuiti di maggiore importanza sono sicuramente i circuiti genetici che possono essere implementati in tutte le cellule che interessano questa analisi. Questi circuiti, ottenuti sfruttando la capacità di tagliare e ricombinare diverse sequenze genetiche, permettono

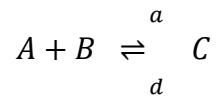
di ottenere effetti molto diversi, soffrendo però di variazioni di diversa natura dovute alle sequenze adiacenti presenti e al tipo di cellula ospitante all'interno delle quali sono realizzati, permettendo di osservare una certa variabilità, detta Δ . [3]

Andando poi a voler definire un processo a retroazione, possiamo indicare come z e y rispettivamente ingresso e uscita del circuito a retroazione, che corrispondono alla concentrazione di proteine legate all'abilità di trascrivere (ingresso) e proteine trascritte (uscita).

La presenza di un fattore Δ fa sì che, anche se avessimo a che fare con un sistema lineare, vi sarebbero comunque delle fluttuazioni in output dovute alla presenza di questo valore.

Un altro fattore di vitale importanza riguarda l'amplificazione G applicata dal nostro sistema, che definisce la relazione tra ingresso e uscita: considerando un regime di lavoro lineare, la relazione ideale consisterebbe in $y = Gz$, senza però tenere conto dei fattori dovuti alle incertezze che influiscono sul guadagno stesso. [3]

Avendo, però, visto l'impossibilità di ottenere modelli lineari, è utile considerare la relazione tra ingresso e uscita approssimabile da una funzione di Hill [4], la quale permette di osservare come varia la concentrazione di un composto C ottenuto dai reagenti A e B :



Equazione 3, formazione del dimero C a partire dai singoli composti A e B [4]

In Eq.3, a e d sono rispettivamente i coefficienti di associazione e dissociazione.

Osservando come i singoli composti interagiscono tra loro, è possibile ottenere le vere e proprie relazioni di Hill che illustrano la dinamica della variazione della concentrazione di A e C in funzione del composto B :

$$C = \frac{A_{tot} B^n / (K_m K_d)}{1 + B^n / (K_m K_d)}, \quad A = \frac{A_{tot}}{1 + B^n / (K_m K_d)}$$

Equazione 4, equazioni di Hill per i composti C , A in funzione della concentrazione di B ; n prende il nome di coefficiente di Hill, $K_d := d/a$; $K_m = k_1/k_2$ dove k_1 e k_2 sono rispettivamente le costanti di associazione e dissociazione del composto complesso $B_n = B + \dots + B$; $A_{tot} = A + C$. [4]

La mancanza di linearità non impedisce di utilizzare il sistema all'interno di un circuito a retroazione, potendo anche osservare dei risultati parecchio vantaggiosi. [4]

Innanzitutto, è possibile considerare $K > 0$ il guadagno di feedback, che nel caso del circuito genetico consiste nella forza di legame tra il regolatore con i siti operazionali di DNA.

La relazione in regime lineare tra ingresso e uscita diventa:

$$y = \frac{G(1 + \Delta)}{1 + G(1 + \Delta)K} u \Rightarrow y \approx \frac{u}{K}, \quad \text{con } G \rightarrow \infty$$

Equazione 5, relazione tra ingresso e uscita in regime lineare; u è il valore di controllo in ingresso al sistema a retroazione.
[3]

Si può osservare una diminuzione del valore di amplificazione, che però viene reso indipendente dalla condizione di instabilità del sistema rappresentata da Δ . Un importante risultato dell'Eq.5 è aver trasformato un sistema non lineare, incerto e ad alto guadagno in un sistema praticamente lineare tramite l'utilizzo del feedback negativo. [3]

L'utilizzo di un guadagno G molto elevato non è sempre considerato favorevole, soprattutto se i sistemi considerati presentano ordini più elevati di equazioni differenziali.

Un metodo più favorevole a questa applicazione risulta essere l'utilizzo di circuiti a retroazione con la presenza di uno o più controllori integrali: essi sono particolarmente adatti alla reiezione di disturbi e componenti indesiderate grazie alla loro introduzione di un polo nell'origine nella funzione di trasferimento del sistema a retroazione, permettendo al sistema a catena chiusa di inseguire segnali a gradino senza una eccessiva sollecitazione del sistema da controllare tramite un guadagno G troppo elevato. [1]

Ciò nonostante, uno degli aspetti negativi più rilevanti legati all'utilizzo di questi controllori riguarda la lentezza con cui essi rispondono a impulsi, ovvero la loro ridotta prontezza: non sorprende che questi controllori siano di rado utilizzati da soli.

Infatti, le componenti integrali, unite a quelle proporzionali e derivate, rappresentano i sistemi più utilizzati in ambito industriale sotto forma dei controllori PID, i quali verranno approfonditi in seguito.

È necessario, ora, analizzare la modalità di implementazione di questi circuiti in cellule viventi e quando è possibile osservare feedback in diverse situazioni del processo di espressione genica o nell'interazione tra organismi diversi. [5]

Infatti, sia retroazione negativa che positiva sono prevalenti all'interno dei circuiti naturalmente presenti sotto forma di diversi processi di espressione e regolazione genica, ottenendo sistemi più adattabili e robusti proprio grazie all'utilizzo di feedback. [5]

Partendo dal primo passaggio nel processo di espressione genica, ovvero la trascrizione del filamento di RNA messaggero dal DNA del gene, è fondamentale il reclutamento della proteina RNA polimerasi tramite i fattori di trascrizione e la sua terminazione una volta che si è ottenuto il filamento: il controllo tramite feedback è possibile in entrambi i momenti, permettendo un controllo preciso dell'intero processo. La più semplice modalità di feedback in trascrizione consiste nell'autoregolazione, ovvero la condizione per la quale un fattore di trascrizione regola il processo: questo metodo è il più ricorrente nei batteri. [5]

Se si utilizza la regolazione per trascrizione nel processo di feedback, G dipende dalla forza del promotore e del regolatore di trascrizione, ma risulta difficile variare i suoi parametri per ottenere un risultato specifico. Quando si utilizza la relazione proteina-proteina per il feedback, invece, G può essere facilmente aumentato incrementando le concentrazioni degli appositi enzimi e substrati. [3]

Questo tipo di controllo si presenta anche successivamente alla trascrizione, quando il filamento di RNA viene tradotto in proteina, anche se in questo caso molti processi di controllo sono ancora sotto esame e devono ancora essere caratterizzati. [5]

Infine, è possibile agire in seguito alla traduzione, una volta che la proteina si è formata: si agisce, infatti, sulla sua stabilità, la natura e la localizzazione all'interno della cellula stessa, andando a variare le componenti del processo di traduzione, o facendo sì che essa possa interagire con diverse parti della cellula (organelli, membrana) in maniera diversa per permetterne il legame. È possibile agire anche legando diversi componenti alla proteina stessa per variarne la natura e, di conseguenza, anche il comportamento e le funzioni. [5]

Un esempio notevole di questo processo consiste in piccole molecole che si legano reversibilmente a un fattore di trascrizione, alterandone le capacità di legarsi alla sequenza di DNA. Le molecole più utilizzate a questo scopo nella realizzazione di circuiti biologici sintetici sono TetR, LacI, AraC. [5]

L'ultima modalità di feedback osservata consiste nell'interazione cellula-cellula, consentendo la regolazione dell'espressione genica ma permettendo anche di regolare la crescita delle cellule stesse a seconda dell'ambiente circostante, spesso grazie alla secrezione di fattori diffusibili, piccole molecole o peptidi, che interagiscono con cellule circostanti instaurando una "rete" di comunicazione tra cellule adiacenti. Queste interazioni danno vita a processi di retroazione anche tramite la variazione della salute delle singole cellule, garantendo la sopravvivenza di alcune rispetto ad altre: questo può avvenire per garantire delle relazioni benefiche di simbiosi tra cellule diverse, o anche nocive secondo il modello preda-predatore, in cui alcune componenti di un sistema vengono consumate per favorire la proliferazione di altre. [5]

Di grande importanza per i sistemi che desideriamo implementare è anche la stabilità, proprietà che riguarda, più precisamente, i punti di equilibrio del sistema stesso, i quali possono essere semplicemente stabili, asintoticamente stabili e instabili. Considerando un ingresso costante $u = \bar{u}$, per un punto di equilibrio semplicemente stabile la traiettoria di stato, a partire da uno stato iniziale sufficientemente vicino allo stato di equilibrio, rimane in un intorno arbitrariamente piccolo dello stato di equilibrio \bar{x} , mentre per un punto di equilibrio asintoticamente stabile la traiettoria rimane nell'intorno stabilito e tende a tale stato. In entrambi i casi, la condizione iniziale deve essere abbastanza prossima a \bar{x} . [1]

Un'importante proprietà dei sistemi lineari è che presentano sempre almeno un punto di equilibrio nell'origine del sistema, (0,0). Questo permette di considerare i sistemi stessi come asintoticamente o semplicemente stabili (o instabili) osservando le proprietà del punto (0,0): anche questo evidenzia l'ovvio vantaggio dovuto alla presenza di linearità.

Oltre a ciò, per i sistemi lineari le condizioni di stabilità dipendono esclusivamente dalla matrice \mathbf{A} definita in precedenza: ovvero, “il sistema lineare è asintoticamente stabile se e solo se tutti gli autovalori della matrice \mathbf{A} hanno parte reale negativa” [1], mentre “è semplicemente stabile se e solo se tutti gli autovalori della matrice \mathbf{A} hanno parte reale negativa o nulla e tutti gli autovalori con parte reale nulla hanno molteplicità algebrica uguale a quella geometrica”. [1]

Un'altra condizione di stabilità per i sistemi lineari prende il nome di BIBO stabilità, secondo la quale a un ingresso limitato corrisponde un'uscita forzata limitata: essa, infatti, non si basa sulla variazione delle uscite dovuta all'evoluzione dello stato, ma su come esse cambiano in seguito a variazioni dell'ingresso stesso. [1]

Questa proprietà risulta fondamentale per l'applicazione di sistemi in qualsiasi ambito industriale poiché è necessario essere sicuri che per un ingresso finito l'uscita non sia infinita, condizione che renderebbe impossibile l'utilizzo del sistema stesso.

La BIBO stabilità dipende esclusivamente dalla funzione di trasferimento $W(s)$ del sistema, ovvero dalla trasformata di Laplace dell'uscita forzata del sistema corrispondente a un ingresso a impulso unitario: osservando la rappresentazione coprima di $W(s) = \frac{N(s)}{D(s)}$, allora il sistema è BIBO stabile se e solo se $D(s)$ è “di Hurwitz”, ovvero tutti i suoi eventuali zeri presentano parte reale strettamente negativa. La funzione di trasferimento può essere espressa basandosi esclusivamente sui termini $\mathbf{A} \in \mathbb{R}^{n \times n}$, $\mathbf{b} \in \mathbb{R}^{n \times 1}$, $\mathbf{c} \in \mathbb{R}^{1 \times n}$, $d \in \mathbb{R}$, ottenendo che:

$$W(s) = \mathbf{c}(s\mathbf{I} - \mathbf{A})^{-1}\mathbf{b} + d$$

Equazione 6, funzione di trasferimento, o trasfereza, del sistema. Essa corrisponde alla trasformata di Laplace dell'evoluzione forzata dell'uscita in corrispondenza dell'ingresso impulsivo $u(t) = \delta(t)$. [1]

La funzione di trasferimento di un sistema risulta fondamentale per lo studio della sua dinamica, ovvero della sua evoluzione nel tempo in seguito alla variazione di diversi termini.

Volendo poi osservare il comportamento di un sistema, in particolare come evolve la sua risposta nel tempo, è possibile considerare diversi parametri che si legano alla risposta indiciale del sistema stesso, corrispondenti al “tempo di salita” t_r , il “tempo di assestamento” t_s e la “sovralongazione massima” M_p . Il primo valore consiste nel tempo necessario alla risposta indiciale per passare da 10% al 90% del valore di regime, misurando quindi la prontezza del sistema, che, come è stato già messo in evidenza, è una caratteristica fondamentale per i controllori realizzabili con circuiti biologici sintetici; il secondo valore consiste nel primo istante di tempo dopo il quale l'intera traiettoria della risposta indiciale rimane confinata entro

l'1% del valore di regime, mentre il terzo indica quanto il massimo della risposta indiciale oltrepassa il valore di regime, espresso in percentuale. [1]

Questi parametri sono molto utili in quanto è possibile trovare un legame approssimativo tra di essi e i poli dominanti della funzione di trasferimento di sistemi del secondo ordine.

L'importanza di questi valori è osservabile anche nei sistemi naturalmente presenti all'interno di cellule viventi: la velocità di adattamento di un microorganismo ad ambienti con condizioni variabili può rappresentare la differenza tra vita e morte dell'organismo stesso. Il feedback negativo permette di influenzare la dinamica generale riducendo il tempo di salita, in questo caso definito come il tempo necessario per il prodotto del gene per raggiungere il valore medio tra una concentrazione a stato stazionario e un'altra concentrazione, di valore superiore, a regime. Il tempo di assestamento rimane invariato, ma il tempo necessario per raggiungere il valore di regime diminuisce: queste variazioni si possono osservare nelle cellule in cui i meccanismi di produzione proteica subiscono auto inibizione dovuta all'elevata presenza dello stesso composto. [5]

Sistemi biologici implementano anch'essi dei processi a retroazione negativa, però in maniera differente rispetto ai controllori osservati nella teoria del controllo: in questi ultimi, infatti, il feedback è solitamente separato dal processo da controllare tramite le azioni e la programmazione di un sistema di controllo interconnesso, mentre lo stesso non è vero per i sistemi biologici, in cui il feedback è implementato nella genetica e nella biochimica del processo stesso. [5]

Oltre a ciò, nei processi di controllo che si possono sviluppare in diversi campi industriali, l'obiettivo principale consiste nel mantenere l'uscita del sistema all'interno delle specifiche desiderate, solitamente un intervallo intorno al punto di lavoro. Nei processi biologici invece, il feedback altera la dinamica, il comportamento allo stato stazionario e la variabilità tra le singole cellule del sistema stesso, allargando il concetto di controllore e facendolo dipendere anche dall'ambiente in cui si trova. [5]

Questo si riconduce alla mancanza di modularità precedentemente messa in evidenza, mostrando che è necessario lo studio accurato di ogni componente del processo per implementare in maniera corretta un controllore di questo tipo.

L'implementazione di feedback all'interno di circuiti biologici sintetici non è ristretta esclusivamente alla retroazione negativa, ma si allarga per permettere anche l'applicazione di quella positiva. Quest'ultima è anch'essa presente naturalmente all'interno di molti circuiti biologici, nonostante la sua natura destabilizzante: è proprio per questa caratteristica che non viene troppo utilizzata in ambito della teoria del controllo. [5]

Nonostante questo, esso viene ampiamente sfruttato in ambito biologico, come avviene per alcuni batteri che utilizzano questo tipo di controllo per regolare l'utilizzo dello zucchero: importazione di questa sostanza induce l'espressione di specifici trasportatori per la sostanza stessa, consentendo di ottenere un ulteriore ingresso di zucchero all'interno della cellula. Il fatto che sia prevalente in biologia dipende dalla presenza di determinati limiti fisiologici sempre presenti che consentono una migliore applicazione e controllo. [5]

La dinamica del feedback positivo è intrinsecamente diversa da quella del processo negativo date le differenze di attuazione del processo, portando ad inaspettate variazioni.

Innanzitutto, la retroazione positiva porta a una risposta caratterizzata da un tempo di salita più alto rispetto alla regolazione diretta, come è stato dimostrato con l'attivatore della trascrizione "cI" all'interno di un campione di *E. Coli*. Questo è dovuto al fatto che lo stato stazionario subisce delle variazioni in seguito all'applicazione del feedback negativo dovute all'incremento di concentrazione del composto: il ritardo nell'attivazione di un circuito può comunque risultare molto utile per specifiche applicazioni cellulari. [5]

Entrambi i tipi di retroazione permettono lo svolgimento di diverse funzioni quando vengono inseriti all'interno di circuiti biologici sintetici: i controllori possono essere interconnessi in diverse maniere, anche gli uni con gli altri, permettendo la realizzazione di vari componenti che consentono lo svolgimento di specifiche funzioni, ottenendo l'amplificazione di alcune proprietà e la comparsa di altre completamente nuove.

Ciononostante, le applicazioni attuali di queste componenti sono poche e rientrano prevalentemente all'interno di tre categorie differenti: controllo metabolico, realizzazione di biosensori e controllo della popolazione. [5]

Risultano evidenti le potenzialità dell'utilizzo della teoria del controllo applicata in ambito biologico, osservando, però, anche le limitazioni legate all'incertezza di un ambiente così complesso e di difficile interpretazione.

2 - Il controllore antitetico integrale a retroazione.

Avendo osservato i vantaggi ottenuti dall'utilizzo della retroazione in diverse occasioni, sia in ambito biologico che in ambito teorico, risulta ora necessario capire quali componenti si desidera utilizzare per ottenere un sistema utile e funzionale anche in ambienti ricchi di rumore e disturbi come quello cellulare.

I controllori sfruttati per questo utilizzo devono possedere diverse caratteristiche, permettendo la reiezione dei disturbi e mantenendo stabile il sistema anche in situazioni incerte: uno dei controllori più utili a questo scopo risulta essere quello integrale, la cui azione permette di inseguire riferimenti a gradino senza esercitare un peso eccessivo sul sistema da controllare, garantendo una risposta efficace e stabile senza eccessive oscillazioni. [1]

Questo tipo di azione si basa su un valore proporzionale all'integrale dell'errore del sistema, garantendo un'azione che non si basa sul suo valore in un determinato istante, ma sull'intera storia di questo parametro e, quindi, permette il mantenimento di una quantità a regime in qualsiasi istante.

$$u(t) = K_I \int_0^t e(\tau) d\tau$$

Equazione 7, ingresso di controllo in seguito all'azione di un controllore integrale. Il termine K_I è reale e non negativo, proporzionale all'integrale dell'errore stesso e può essere tarato in seguito alle diverse necessità del sistema. [1]

Gli aspetti negativi riguardanti l'utilizzo di questo controllore hanno a che fare prevalentemente con la sua lentezza di risposta verso un qualsiasi input: infatti, anche se l'errore è di grandezza rilevante, la risposta integrale necessita di un determinato tempo per potersi sviluppare e agire, rendendo il sistema poco pronto. [1]

Questa problematica può essere risolta accoppiando questo tipo di controllo a uno di tipo proporzionale, dando vita al controllore PI, che a sua volta può essere migliorato con l'utilizzo di una componente derivativa per comporre i controllori PID, i quali verranno trattati nel seguente capitolo.

All'interno dei circuiti sintetici biologici è necessario l'utilizzo di componenti specifici che si adattino a un ambiente ricco di rumore e variazioni. Infatti, l'applicazione della retroazione in condizioni simili risulta molto vantaggiosa ma contemporaneamente difficile, a causa della natura stessa delle reazioni biochimiche.

Sfruttare l'ambiente rumoroso a vantaggio del controllore è possibile, e proprio su questo si basa il processo di retroazione a controllore antitetico integrale, il quale preserva la stabilità del sistema e permette il raggiungimento di un preciso valore a regime. [6]

Come già illustrato, robustezza e stabilità sono caratteristiche principali dei sistemi di controllo in qualsiasi ambito di applicazione e la loro presenza è indispensabile per il corretto

funzionamento di circuiti biologici sintetici. I controllori integrali fanno parte della categoria di sistemi che permettono di ottenere queste caratteristiche e risultano di fondamentale importanza nell'ambito di questa trattazione, in quanto risultano molto vantaggiosi nei processi di mantenimento dell'omeostasi.

È stato, infatti, già osservato come metodi analoghi vengono sfruttati naturalmente da diverse cellule e organismi per lo svolgimento di processi come la chemiotassi batterica¹, la quale si basa sul controllo a retroazione integrale ottenendo una robusta e perfetta adattabilità all'ambiente circostante, mentre a livello sistemico degli organi il feedback integrale viene utilizzato, ad esempio, anche per l'omeostasi del calcio nei mammiferi, consentendo di mantenere la corretta concentrazione dello ione all'interno delle cellule che ne necessitano. [6] Molti metodi di controllo analizzati in passato e implementati in circuiti biologici sintetici si basavano esclusivamente su controllori non integrali e di più semplice applicazione, ottenendo così un controllo poco robusto e non in grado di annullare l'errore a regime, dimostrando che il sistema a catena chiusa risulta molto sensibile a errori e variazioni dovuti alla dimensione dei circuiti e parametri utilizzati, rendendo complicata anche la taratura dei parametri stessi: è evidente la necessità di controllori integrali di facile applicazione. [6]

L'utilizzo di controllo a feedback integrale è reso complicato in ambienti biologici dalla natura stocastica dei sistemi in esame, ed è proprio per questo motivo che risulta necessario cercare un controllore equivalente al processo deterministico in cui sono di solito applicati i controllori integrali stessi.

La natura fortemente rumorosa e ricca di disturbi dell'ambiente cellulare è già stata osservata in precedenza e i suoi effetti rimangono validi e sono osservati ancora in questa occasione. Nella teoria del controllo, si cerca sempre di rimandare i sistemi in utilizzo a zone di lavoro lineari e deterministiche in cui sia facilmente prevedibile il comportamento del sistema in esame, garantendo un corretto controllo e l'ottenimento dei valori a regime desiderati, implicando una corretta reiezione asintotica dell'errore.

Nel caso dei sistemi cellulari, sia il processo da controllare che eventuali disturbi presenti sono stocastici, di natura, quindi, imprevedibile che rende difficile il loro controllo ed elaborazione: proprio per questo motivo, si desidera che queste componenti presentino delle specifiche proprietà che permettano di osservare un comportamento analogo a quello deterministico in condizioni alquanto rumorose e casuali. [6]

¹ La chemiotassi consiste nel movimento di un qualsiasi organismo in risposta a stimoli chimici ricevuti dall'ambiente esterno. Nei batteri, questo processo è fondamentale in quanto permette, ad esempio, di trovare sostanze nutritive (come glucosio) dirigendosi nella direzione in cui ve ne è una maggiore concentrazione, sfruttando recettori transmembrana per riconoscere le variazioni. [14]

Nello specifico, l'ottenimento di una componente che sfrutta la caratteristica rumorosa dell'ambiente in cui esso agisce per ottenere stabilità è l'obiettivo principale sulla quale si è basato lo sviluppo del controllore antitetico integrale.

Per prima cosa, il sistema deve possedere la cosiddetta "ergodicità a circuito chiuso", condizione per la quale la distribuzione congiunta delle variabili aleatorie di un vettore di stato, rappresentante le concentrazioni dei singoli composti in un qualsiasi istante di tempo, converge a una distribuzione stazionaria indipendentemente dalle concentrazioni iniziali degli stessi composti: questa proprietà ricorda i sistemi a catena chiusa deterministici stabili, per i quali le traiettorie delle variabili del sistema tendono a dei valori di equilibrio indipendentemente dalle condizioni iniziali del sistema. [6]

Oltre a ciò, il sistema stocastico deve dimostrare inseguimento robusto di un punto fisso, ovvero che una variabile d'interesse, come ad esempio la media, raggiunga il valore desiderato (detto "set-point"), in un modo che non dipenda dai parametri del sistema, se non da quelli che definiscono il valore di riferimento stesso. [6]

Infine, la proprietà per la quale i sistemi integrali sono così utili nelle applicazioni qui considerate: la reiezione perfetta e robusta a disturbi esterni, permettendo di mantenere una certa variabile attorno al valore di regime. Questa proprietà deve essere mantenuta anche in presenza di disturbi stocastici riguardanti le concentrazioni delle diverse specie utilizzate per la realizzazione del circuito stesso. [6]

Per analizzare queste proprietà e verificare che siano mantenute per il sistema che si desidera implementare, si potrebbe pensare di utilizzare i momenti statistici, come la media e la varianza, cercando di dirigerli verso dei valori a regime per ottenere perfetta adattabilità e spostando l'attenzione su valori deterministici. Una problematica principale che risulta da questo metodo, però, è il "moment closure problem", per il quale risulta necessario utilizzare un infinito numero di equazioni differenziali deterministiche per definire solamente i primi due momenti. [6]

L'introduzione del controllore antitetico integrale a feedback risulta indispensabile per trattare il problema direttamente nell'ambito stocastico, avendo a che fare con il sistema di reazioni non deterministico e permettendo di evitare il moment closure problem: l'obiettivo a cui si punta consiste nel portare la media della popolazione di una specie X_l , all'interno di un sistema non definito, a un valore di regime desiderato tramite l'utilizzo di determinate reazioni biochimiche che vadano a implementare il controllore stocastico. [6]

Per poter analizzare il problema sotto forma teorica e comprenderne il funzionamento, risulta necessario definire le componenti che dovranno formare il circuito biologico e che ne permettono l'applicazione pratica: esse sono Z_1 , Z_2 , X_1 e X_l . Le prime due rappresentano delle

specie che eseguono il ruolo di controllore, agendo sul sistema tramite X_1 , la quale permette poi di regolare la quantità di X_l presente.

Dal punto di vista biologico, si può considerare il sistema sensibile al composto X_1 , prodotto a una velocità proporzionale alla quantità del composto Z_1 . X_1 attiva X_l , mentre Z_2 è prodotto a una velocità proporzionale alla concentrazione di X_l : dopodiché, Z_1 e Z_2 si annichiscono a vicenda, non eliminandosi, ma annullando le rispettive attività biologiche, ad esempio formando un dimero ad alta affinità e inerte. [6]

Un esempio pratico di sistema basato su questi quattro componenti, seppur esclusivamente di natura ipotetica, riguarda la regolazione dei geni housekeeping basata sul fattore σ^{70} (che svolge il ruolo di Z_1) del batterio *E. Coli*, il quale consiste in un componente ausiliario dell'oloenzima RNA polimerasi (RNAP, anche considerabile come X_1) e agisce come un fattore di specificità che lega la RNAP al sito specifico dei promotori dei geni housekeeping: è il composto formato dal legame tra σ^{70} e RNAP che si riconduce, poi, a X_l . Questo processo è regolato dal fattore anti-sigma 70, indicato come $\bar{\sigma}^{70}$ (Z_2), il quale si lega in maniera specifica a σ^{70} "sequestrandolo" dall'enzima, formando il dimero inattivo e variando il processo di trascrizione all'interno della cellula. [6]

Tornando alle singole componenti introdotte precedentemente, è osservabile che il valore a regime stazionario per la quantità media di X_l dipende solo dal rapporto tra i parametri dei due controllori e non dai parametri del sistema stesso: in questo modo, il sistema a catena chiusa presenta stabilità, inseguimento asintotico dell'errore e adattabilità perfetta rispetto X_l .

Risulta necessario analizzare sia il sistema che vogliamo controllare, ovvero un network di reazioni che coinvolge un numero d di molecole (individuate da X_1, \dots, X_d), sia i controllori, che si potranno suddividere in diverse reazioni di riferimento, paragone, misura e attuazione.

La dinamica del sistema da controllare può essere descritta tramite un processo di Markov (o markoviano), in cui il futuro del sistema è indipendente dal passato, una volta fissato lo stato attuale. [6]

Proprio l'evoluzione dello stato x del sistema risulta influenzata da K canali di reazione, dove K è il numero di reazioni possibili. Detto $\lambda_k(x)$ il tasso k -esimo di reazione (con k valore compreso tra 1 e K) definito come funzione di propensità, si può osservare che quando $X(t) = x$, $\lambda_k(x)$ indica il tasso con cui la reazione k avviene all'interno del volume considerato: proprio questa reazione provoca una variazione dello stato pari a $\zeta_k \in \mathbb{Z}$. [7]

Questa definizione è fondamentale per spiegare la dinamica stocastica delle reazioni, dato il fatto che la maggior parte dei processi si basano proprio su di essa e sulle teorie della probabilità. Una grande assunzione in questa situazione riguarda il fatto che la maggior parte delle interazioni tra molecole sono elastiche, permettendo di osservare che la posizione delle

molecole è uniformemente distribuita in maniera casuale all'interno del volume, oltre al fatto che la loro velocità seguirà la distribuzione di Maxwell-Boltzmann. [7]

Poiché è necessario che le quantità molecolari si mantengano non negative, si ritiene valida la proprietà secondo la quale per ogni $x \in \mathbb{N}$, se $x + \zeta_k \notin \mathbb{N}$, allora $\lambda_k(x)=0$. [6]

Dal punto di vista della teoria del controllo, risulta utile definire quale composto è quello “attuato” sul quale il controllore agisce in maniera tale da regolare il composto obiettivo, che nel nostro caso risulta essere X_1 . [6]

Queste condizioni permettono di identificare il sistema da controllare, il quale verrà chiamato “sistema di reazione a catena aperta” e sarà indicato da $(\mathbf{X}, \lambda, \zeta)$, ovvero le tre grandezze di fondamentale importanza per la sua implementazione e analisi. [6]

È possibile, ora, definire gli obiettivi del processo di controllo da implementare, ovvero le proprietà che desideriamo per il sistema a catena chiusa ottenuto tramite l'interconnessione tra il sistema a catena aperta appena definito e il controllore che agisce sulla specie X_1 : si desidera ottenere l'ergodicità della catena chiusa, proprietà già definita precedentemente, la convergenza dei valori di media e varianza dei composti molecolari $X(t)$ ai rispettivi “set-point” desiderati dal problema in esame, ed infine avere $\mathbb{E}[X_1(t)] \rightarrow \mu^*$ per $t \rightarrow \infty$, dove μ^* è il valore omeostatico che si desidera ottenere per la specie regolata. [6]

La definizione del controllore si deve basare su queste proprietà, ed è in questo modo che otteniamo le quattro reazioni precedentemente illustrate che permettono la sua identificazione. Il compito del controllore è sicuramente complesso, dovendo accuratamente controllare un sistema di reazioni in un ambiente stocastico, partendo innanzitutto dalla formazione delle componenti Z_1 e Z_2 : la prima reazione, detta “di riferimento”, permette la definizione del valore di riferimento μ^* , ovvero la velocità di comparsa del composto Z_1 ; la seconda reazione, detta “di misura”, porta alla comparsa del composto Z_2 in maniera proporzionale alla quantità della specie regolata X_1 : segue la reazione “di paragone”, in cui le quantità molecolari dei due composti Z_1 e Z_2 sono mantenute sotto controllo tramite una reazione che si sviluppa a velocità η , diminuendo entrambe le quantità di uno per prevenire la loro crescita incontrollata. L'ultima reazione consiste invece nell' “attuazione”, la quale implementa il modo in cui il controllore agisce sul sistema (ad esempio agendo sulla specie X_1). [6]

Avendo osservato le proprietà delle componenti che formano il sistema a catena chiusa, è ora possibile andare ad analizzare la dinamica di quest'ultimo, basandosi sui momenti stocastici che si possono calcolare e sulle loro evoluzioni nel tempo.

Nello specifico, risulta fondamentale basarsi sulla variazione dei momenti di primo ordine dei composti Z_1 e Z_2 appena definiti come controllori: a questo scopo, è possibile definire un set di equazioni differenziali ordinarie (ODE) ognuna dipendente esclusivamente da una singola

variabile indipendente. Proprio da questo set di equazioni è possibile osservare la dipendenza del sistema controllore dall'integrale:

$$\frac{d\mathbb{E}[Z_1(t)]}{dt} = \mu - \eta\mathbb{E}[Z_1(t)Z_2(t)]$$

(1)

$$\frac{d\mathbb{E}[Z_2(t)]}{dt} = \theta\mathbb{E}[X_l(t)] - \eta\mathbb{E}[Z_1(t)Z_2(t)]$$

(2)

$$\mathbb{E}[(Z_1 - Z_2)(t)] = \theta \int_0^t (\mu^* - \mathbb{E}[X_l(s)]) ds$$

(3)

Equazione 8, (3) è ottenuta sottraendo le relazioni (1) e (2) e integrando, permettendo la definizione di una relazione che non dipende dal termine $\mathbb{E}[Z_1(t)Z_2(t)]$, il quale non è osservabile sperimentalmente e porterebbe a un numero infinito di equazioni, ovvero il moment closure problem prima illustrato [6]

In Eq.8, μ è la costante di proporzionalità legata alla produzione di Z_1 , θ quella proporzionalità legata alla produzione di Z_2 , mentre η alla comparsa del dimero inerte dato dall'interazione dei due controllori. [6]

Da Eq.8 (3) è possibile osservare che, potendo considerare $t \rightarrow \infty$, la parte sinistra tenderà a 0, facendo tendere a zero anche l'integrando. Così facendo, la media del composto X_l tenderà proprio al valore di regime $\mu^* = \frac{\mu}{\theta}$ da noi imposto, verificando che, se il sistema è ergodico, allora i momenti tendono sempre a dei valori di regime e la media del composto da regolare corrisponde al termine desiderato.

Il concetto di "moment closure problem" diventa quindi irrilevante in questo procedimento in quanto non si tenta mai la risoluzione delle singole medie di Z_1 e Z_2 , che porterebbero a un'infinita successione di equazioni, ma il problema viene sorvolato interagendo esclusivamente col sistema tramite la differenza delle specie dei controllori.

Avendo osservato la validità di questo modello, è possibile procedere con la sua applicazione all'interno dei circuiti biologici sintetici, in particolare studiandone il comportamento nel controllo dell'espressione genica di una singola cellula: innanzitutto si considerano i due termini principali del sistema, X_1 , che corrisponde al filamento di RNA messaggero d'interesse (mRNA) e X_2 , che invece corrisponde alla proteina misurata e regolata. [6]

È possibile osservare l'evoluzione del sistema in due condizioni opposte: in ambiente deterministico e ambiente stocastico. Da questa analisi emerge l'importanza della presenza di rumore stocastico, il quale contribuisce a rendere stabile il sistema e ottenere le caratteristiche di fondamentale importanza per l'applicazione in circuiti biologici.

Considerando il sistema di equazioni in ambiente deterministico, ci si basa sull'evoluzione della concentrazione media dei diversi composti considerando cellule con comportamento, appunto, deterministico. Per quanto riguarda il modello stocastico, esso si basa sulle stesse caratteristiche, ma applicate per cellule che si comportano in maniera che rimanda alla natura del modello stesso: è proprio grazie a queste caratteristiche che la media del modello convergerà sempre al valore desiderato indipendentemente al valore iniziale, grazie alla proprietà di ergodicità qui presente. Lo stesso non può essere detto per il modello deterministico, il quale rimane influenzato dalle variazioni di traiettoria, la quale oscilla intorno al valore di regime. Il rumore, infatti, si rivela un agente stabilizzante grazie alla casualità che aggiunge alla dinamica dei processi in esame, permettendo una compensazione sistemica del livello della popolazione. [6]

Una considerazione molto importante risiede nel fatto che, quando la cellula cresce in maniera molto rapida, la diluizione di proteine controllori non può essere trascurata e può nuocere alla complessiva stabilità del sistema. Per verificare se l'errore può essere comunque reso minimo, si passa ad un'analisi tramite simulazione in *E. Coli*. [8] È fondamentale considerare due proteine controllori che si possano annichilare a vicenda, formando dimeri inerti: per questo motivo, sono stati utilizzati "Bacillus subtilis" σ e fattori anti- σ , *SigW* e *RsiW*, dove quest'ultimo rende inerte il primo e permettendo una cascata di espressione genica.

La loro stabilità naturale permette una realizzazione pratica di controllore integrale anche in cellule a crescita veloce, ambiente dove controllori a RNA farebbero, invece, fatica ad operare. Una conseguenza importante del loro utilizzo può essere osservata all'interno di cellule il cui obiettivo è il controllo della concentrazione di determinati prodotti, i quali dipenderanno esclusivamente dalla quantità di fattori anti- σ presenti nel circuito a catena chiusa. È possibile osservare anche il comportamento di un analogo circuito di controllo a catena aperta, rimuovendo dal sistema il promotore per l'attivazione del composto *RsiW*: diminuendo la temperatura del sistema, si osserva come i due circuiti reagiscono a questa variazione ed è palese la superiorità del circuito a catena chiusa, il quale consente il raggiungimento del valore a regime di velocità di crescita cellulare indipendentemente dalla perturbazione, mentre lo stesso non è vero per il secondo circuito, il quale presenterà una velocità molto ridotta. [8]

L'importanza dei controllori integrali non può essere sorvolata quando si tratta di applicare il controllo a retroazione ai sistemi biologici, e questo metodo di applicazione risulta uno dei più efficaci in ambienti ricchi di disturbi esterni e processi di natura imprevedibile. Oltre a questo, lo sviluppo di questo controllore permette un'analisi approfondita anche dei controllori PID in ambiente cellulare, i quali verranno trattati nel seguente capitolo.

3 - Realizzazione di controllori PID tramite biomolecole.

I controllori Proporzionali-Integrali-Derivativi (PID) sono dei particolari sistemi utilizzati in maniera prevalente all'interno di circuiti a retroazione. Grazie alle loro particolari proprietà, le quali combinano le caratteristiche dei tre controllori, essi sono i più utilizzati in ambiente industriale, componendo circa il 90% dei controllori in uso al giorno d'oggi: ciò è dovuto al loro costo contenuto e alla loro versatilità, anche se non consentono prestazioni spinte e non lavorano in maniera totalmente corretta quando si è in ambiente instabile. [1]

La funzione di trasferimento di questi controllori mette in evidenza i ruoli delle singole parti:

$$C(s) = K_P + \frac{K_I}{s} + K_D s$$

Equazione 9, funzione di trasferimento del sistema a catena chiusa del controllore PID. [1]

Quindi, l'ingresso di controllo corrisponderà a:

$$u(t) = K_P e(t) + K_I \int_0^t e(\tau) d\tau + K_D \dot{e}(t)$$

Equazione 10, i parametri K_P , K_I , K_D devono essere scelti in base alle caratteristiche che si desiderano tramite il processo di taratura. [1]

Da Eq.9 e Eq.10 si può osservare che ogni componente di un PID agisce sull'errore, ovvero sulla differenza tra valore di controllo e uscita del sistema, in maniera diversa, rispettivamente permettendo un'azione proporzionale all'errore stesso, proporzionale all'integrale dell'errore e proporzionale alla sua derivata.

Essi possiedono parecchi vantaggi legati al proprio utilizzo, ma anche alcuni aspetti negativi che è necessario tenere in considerazione quando vengono inseriti all'interno di un circuito.

Innanzitutto, la componente proporzionale, di più semplice implementazione rispetto alle altre, permette di ottenere un'azione che non dipende dall'intera evoluzione dell'errore ma esclusivamente dal suo valore in ogni istante, con la conseguenza di non permettere buone performance al regime. Per renderlo più efficace si potrebbe aumentare il guadagno, ma così facendo si otterrebbero ingressi di controllo troppo elevati che potrebbero destabilizzare il sistema a catena chiusa. [1]

I vantaggi della componente integrale sono già stati analizzati nel precedentemente capitolo: essa, infatti, permette l'inseguimento di segnali a gradino senza sollecitare in maniera esagerata il sistema da controllare, grazie a un guadagno che permette un'ottima adattabilità e robustezza ma non un'azione rapida, portando quindi a un sistema poco pronto. [1]

Un metodo per migliorare la prontezza consiste nell'aggiunta della componente derivativa, la quale però aumenta i disturbi ad alta frequenza e rischia di rendere impropria la funzione di trasferimento della catena chiusa se non vengono applicate determinate accortezze al sistema

stesso, come ad esempio la scelta di un termine derivativo di forma $\frac{K_D s}{1+s\tau}$, con τ costante di tempo piccola in modo da poter trascurare l'effetto del denominatore alle frequenze di interesse. [1]
 A partire dai termini di proporzionalità presenti nella funzione di trasferimento è possibile ottenere delle nuove grandezze che aiutano nella descrizione delle proprietà del sistema, come il “reset rate” $T_I \geq 0$ e il “derivative rate” $T_D \geq 0$, entrambe costanti di tempo che permettono di riscrivere la funzione di trasferimento del controllore PID:

$$C(s) = K_P \left[1 + \frac{1}{sT_I} + sT_D \right]$$

Equazione 11, funzione di trasferimento dei controllori PID espressa secondo i termini T_I , T_D , K_P . [1]

Per ottenere le prestazioni desiderate dall'utilizzo di un controllore PID è molto importante selezionare i valori corretti per le singole costanti di proporzionalità, il che può avvenire solo in seguito al processo di taratura fine, operando piccole variazioni rispetto ai valori nominali finché ogni modifica porta a un peggioramento delle proprietà del controllore stesso. [1]

Esistono due metodi principali per calcolare le grandezze migliori per il sistema da controllare: la taratura a catena chiusa di Ziegler e Nichols e la taratura analitica col metodo di Bode. Entrambi si basano sulla considerazione che il sistema da controllare presenti una funzione di trasferimento $G(s)$ BIBO stabile, anche se si differenziano di molto per i metodi con cui vengono definiti i valori. [1]

Il primo metodo, infatti, si basa sulla considerazione del blocco PID come un semplice controllore proporzionale in cui il termine K_P viene aumentato fino ad ottenere un sistema instabile, ottenendo quindi un valore K_{Cr} critico che permette di definire il periodo T associato ai poli puramente immaginari $\pm j\omega$ della funzione di trasferimento della catena chiusa per poi ottenere gli altri termini del PID tramite calcoli empirici basati su T e K_{Cr} . [1]

Il secondo metodo, invece, prevede anche che $G(0) > 0$ e si basa sulla definizione di quattro proprietà desiderate per il sistema in esame: innanzitutto, il sistema a catena chiusa dovrà essere di “tipo 1”, avendo un polo nell'origine, dopodiché si vuole che l'errore a regime in riferimento a un impulso a rampa unitario e_r sia tale che $|e_r| \leq e_r^*$, dove e_r^* è il valore massimo consentito per questo errore. Oltre a ciò, i valori di tempo di salita della risposta indiciale a catena chiusa (t_r) e la massima sovraelongazione della stessa (M_p) devono rispettare delle condizioni imposte per cui $t_r \cong t_r^*$ (valore desiderato) e $M_p \leq M_p^*$ (valore massimo tollerato). Tutte queste condizioni sono fondamentali per il corretto funzionamento del controllore progettato. [1]

È naturale voler applicare questi controllori anche all'ambiente cellulare, date le caratteristiche vantaggiose che permettono un controllo efficace e completo: questo processo deve partire dalla definizione delle singole componenti che andranno a definire il blocco PID.

Il controllore antitetico integrale a retroazione è stato ampiamente discusso nello scorso capitolo, e proprio su questa componente si basa l'intero sistema: è necessario, poi, trovare delle componenti proporzionali e derivate per poter osservare come esse interagiscono le une con le altre e quali sono i benefici ottenibili da una tale interconnessione di sistemi, migliorando le singole caratteristiche del controllore integrale legate soprattutto alla poca prontezza della componente.

Partendo dal processo proporzionale, esso può essere implementato tramite lo sviluppo di una semplice funzione non lineare che presenti la differenza tra il valore di controllo e l'uscita del sistema stesso. Per la componente derivativa, invece, ci si basa su un processo di regolazione della chemiotassi di un network di *E. Coli* che permette la misura della variazione di concentrazione del fattore chemioattraente in funzione del tempo, un processo analogo a un controllore derivativo. [9]

Il problema dell'utilizzo esclusivo del parametro integrale consiste nell'osservazione che il sistema potrebbe diventare instabile e più propenso a oscillazioni. Ciò si può notare facendo riferimento alla relazione tra i parametri X_l e X_1 definiti nello scorso capitolo:

$$\frac{dX_l}{dt} = \beta_l X_1 - \gamma_l X_l$$

Equazione 12, il termine β_l è la costante di proporzionalità tra i due composti mentre γ_l indica il consumo di X_l . [6]

Applicando la relazione in Eq.12 al controllore antitetico integrale a retroazione, è facile osservare la comparsa di oscillazioni che rischiano di rendere instabile il sistema. Oltre a questo, l'inseguimento perfetto del disturbo si ottiene solo in seguito a un lungo periodo di oscillazioni smorzate. [9]

Per questo motivo risulta necessaria l'implementazione di un controllore più complesso, realizzato con componenti aggiuntive quali quella proporzionale e derivativa per ottenere delle nuove relazioni tra i singoli composti Z_1 , Z_2 , X_1 , X_l :

$$\begin{aligned} \frac{dZ_1}{dt} &= \mu Y - \eta Z_1 Z_2 \\ \frac{dZ_2}{dt} &= \theta X_l - \eta Z_1 Z_2 \\ \frac{dX_1}{dt} &= \beta_1 Z_1 + f_p(X_l, Y) + D_t(X_l, Y) - \gamma_1 X_1 \end{aligned}$$

Equazione 13, queste tre relazioni permettono l'osservazione dell'implementazione contemporanea di controllo proporzionale, derivativo e integrale all'interno del sistema in analisi. [9]

In Eq.13, la terza relazione (ovvero l'attuazione del termine X_1) vede l'introduzione di due termini f_p e D_t , i quali dipendono dal fattore da controllare X_l e dal composto Y (da cui dipende anche la produzione del fattore Z_1 , osservabile nella prima relazione): in particolare, $f_p(X_l, Y)$

è una funzione che permette l'implementazione del controllo proporzionale mentre $D_t(X_l, Y)$ è l'uscita di un sistema dinamico che presenta come ingressi le due incognite. [9]

L'implementazione del termine di controllo proporzionale riguarda la computazione dell'errore di tracciamento e sarebbe ottimale che si riconducesse alla formula

$e(t) = \mu Y - \theta X_l(t)$, anche se, avendo a che fare con grandezze molecolari, il prodotto di questo processo può essere esclusivamente una quantità positiva: questo ci porta considerare una relazione che agisce in maniera implicita sull'errore senza esplicitamente rappresentarlo. [9]

Per ottenere il feedback in forma negativa, il processo più diretto che si può pensare di utilizzare è una funzione che inibisca il termine X_l in funzione dell'espressione di X_1 tramite la funzione inibitoria tradizionale di Michaelis-Menten. Questa considerazione, in verità, non è ideale in quanto viene meno la dipendenza dal termine Y [9]:

$$f_P(X_l, Y) = \beta_P \frac{\mu K_l}{\mu K_l + \theta X_l}$$

Equazione 14, prima proposta della funzione che determina il valore proporzionale all'errore. Si osserva la mancanza di dipendenza rispetto a Y che porterà a considerare soluzioni alternative. β_P rappresenta la massima velocità di sintesi in assenza dell'inibitore X_l , mentre μK_l è una costante relativa alla forza dell'inibitore. [9]

Data l'assenza di dipendenza da Y , il campo di azione dinamico si restringe di molto all'interno di controllori PI, soprattutto per termini di riferimento Y molto piccoli per i quali il tracciamento e l'adattabilità perfetti sono persi a causa alla variazione della costante β_l . Infatti, il termine proporzionale induce la sintesi basale di X_1 , portando a una quantità basale di X_l e, di conseguenza, di Z_2 . Il fatto che vi sia una quantità elevata di Z_2 con un basso livello di μY , che porta a una ridotta sintesi di Z_1 , fa sì che non avvenga la formazione del dimero inattivo portando alla proliferazione incontrollata del composto Z_2 , ottenendo sostanzialmente un sistema a catena aperta in cui il controllo integrale non è sufficientemente attivo. [9]

D'altro canto, per valori di Y elevati viene prodotto X_l in eccesso rendendo di poca utilità il termine proporzionale appena introdotto: si perdono le caratteristiche di retroazione proporzionale, favorendo esclusivamente la presenza di controllo integrale, limitando ancora il range dinamico del sistema. [9]

Un miglioramento di facile applicazione per il termine f_P consiste nell'inserire la dipendenza dalla quantità di Y per allargare il range dinamico di azione e permettere un migliore controllo, sia a bassi che ad alti livelli di questo fattore:

$$f_P(X_l, Y) = \beta_P Y \frac{\mu Y}{\mu Y + \theta X_l}$$

Equazione 15, fattore proporzionale all'errore consistente in una funzione che dipende da entrambi i fattori che compaiono nell'equazione legata all'errore in sistemi a retroazione. [9]

Grazie alle modifiche applicate in Eq.15, ora la funzione scala con il punto di riferimento Y permettendo di ottenere un range dinamico migliore prima della saturazione. Ciò porta ad ottenere un tracciamento più preciso anche a bassi livelli di Y e smorzamento migliorato dopo perturbazioni a parametri di sistema come β_I . [9]

In particolare, grazie alla presenza di $\beta_P Y$ come fattore di proporzionalità, quando Y è basso anche il termine f_P ottenuto da questa funzione è proporzionalmente basso, mantenendo ridotto il livello di sintesi basale di X_I e Z_2 facendo sì che il controllo integrale sia comunque presente. Allo stesso modo, anche a valori elevati di Y , f_P scala in maniera corretta permettendo migliore smorzamento e mantenendo il contributo del termine proporzionale dove prima veniva meno. [9]

A sua volta, Eq.15 può essere modificata tramite un raccoglimento che permette di mettere in evidenza la dipendenza di questa funzione dal termine $e(t) = \mu Y - \theta X_I(t)$ precedentemente definito.

$$f_P(X_I, Y) = \frac{\beta_P}{2\mu} \left(\mu Y + \frac{\mu Y}{\mu Y + \theta X_I} [\mu Y - \theta X_I] \right)$$

Equazione 16, si può notare la dipendenza dal fattore $e(t)$, che viene moltiplicato per il termine proporzionale a Y e X_I e traslato di Y per mantenere una quantità positiva. [9]

Una possibile realizzazione pratica di questa funzione prevede il legame competitivo a un promotore regolato tra X_I e un fattore di trascrizione la cui attività è proporzionale a Y . [9]

Dopo aver definito il termine proporzionale all'errore del sistema, ciò che rimane da ideare è un sistema dinamico le cui uscite permettano di identificare i termini necessari alla realizzazione della componente derivativa. Come già anticipato, questo controllore prende vita a partire da processi naturali che avvengono durante la chemiotassi batterica, i quali permettono al batterio di dirigersi in direzione di un gradiente di concentrazione oppure opposto ad esso. Il circuito proposto, identificato da due equazioni dinamiche, permette la misura della variazione di concentrazione del composto X_I nel tempo e si basa su due molecole che prendono il nome di A e M : la prima è prodotta a una velocità direttamente proporzionale a M ed è attivamente degradata da X_I , mentre la seconda è prodotta a velocità proporzionale al segnale di riferimento Y e attivamente degradata da A . [9]

Il sistema in questione è definito da:

$$\frac{dA}{dt} = \beta_A M - \gamma_A X_I \frac{A}{K_A + A} - \gamma_{A_0} A$$

(1)

$$\frac{dM}{dt} = \beta_M Y - \gamma_M A \frac{M}{K_M + M}$$

(2)

Equazione 17, evoluzione nel tempo dei termini A e M [9]

A partire da Eq.17, è possibile definire il termine $D_t(X_l, Y) = \beta_D A$, dove A è l'uscita ottenuta a partire dal sistema formato dalle equazioni 1 e 2. [9]

Per il funzionamento del sistema è necessario tenere conto di un'importante considerazione secondo la quale i termini di degradazione attiva devono operare in condizione di saturazione o vicini ad essa, per cui $K_A \ll A$ e $K_M \ll M$, permettendo un'approssimazione importante di Eq.17 [9]:

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &\approx \beta_A M - \gamma_A X_l - \gamma_{A_0} A \\ \frac{dM}{dt} &\approx \beta_M Y - \gamma_M A\end{aligned}$$

Equazione 18, relazioni dinamiche approssimate con la considerazione vista. [9]

Eq.18 permette di osservare la misura della variazione di concentrazione del composto X_l , infatti è sufficiente derivare (1) e risolvere esplicitando $\frac{dM}{dt}$ per poi sostituire in (2) e ottenere:

$$\frac{d^2 A}{dt^2} + \gamma_{A_0} \frac{dA}{dt} + \beta_A \gamma_M A \approx -\gamma_A \frac{dX_l}{dt} + \beta_A \beta_M Y$$

Equazione 19, osservazione della dipendenza dal tempo della derivata della variabile X_l . [9]

Considerato che A e M sono variabili progettuali, i loro parametri possono essere scelti in maniera tale da permettere la "time-scale separation" tra di essi e la variabile X_l , ovvero considerare velocità diverse di reazioni per le quali una delle due parti del sistema raggiunge il valore a regime più velocemente rispetto all'altra. [10]

Se si tengono in considerazione le singole componenti in frequenza del composto $X_l(t)$, visto in questo caso come un segnale in ingresso, i singoli parametri γ_{A_0} , β_A e γ_M della componente derivativa possono essere scelti in maniera tale che la dinamica di $D_t(X_l, Y)$ sia più veloce della componente in frequenza più alta ω_{max} del segnale $X_l(t)$. [9]

In questo modo, è possibile selezionare i valori di sistema in maniera tale che: $|\omega_{max}^2 + \gamma_{A_0} j \omega_{max}| \ll \beta_A \gamma_M$. Questa considerazione può essere utilizzata in Eq.19, permettendo di ottenere la relazione di tracciamento approssimato tra gli ingressi X_l e Y e l'uscita A : [9]

$$A \approx -\frac{\gamma_A}{\beta_A \gamma_M} \frac{dX_l}{dt} + \frac{\beta_M}{\gamma_M} Y$$

Equazione 20, permette di ottenere la quantità di composto A che può essere utilizzato nella definizione del termine derivativo. [9]

Eq.20 permette di osservare che A è proporzionale all'opposto della derivata rispetto al tempo di X_l sommato a un termine allo stato stazionario Y : infatti, l'aggiunta del termine derivativo al

controllore aiuta a migliorare l'inseguimento a regime di segnali a gradino e contrastare le perturbazioni legate al termine β_I . [9]

La dipendenza da Y è fondamentale qui come nel controllore proporzionale, permettendo un corretto tracciamento in un range dinamico molto ampio. Se si considerasse il termine D_t privato della dipendenza di M da Y , si osserverebbe la perdita di tracciamento perfetto e adattabilità del sistema per valori bassi di Y , oltre alla mancanza di attività legata alla componente integrale fino al raggiungimento di un valore abbastanza alto del medesimo composto. Infine, per Y in grandi quantità si notano maggiori perturbazioni del termine β_I . [9]

Il passo finale consiste nell'incorporare tutti i componenti andando ad ottenere il controllore PID, il quale presenta tutte le caratteristiche fino ad ora osservate nelle interazioni tra controllori proporzionali e integrali (PI), derivativi e integrali (DI). Risulta fondamentale la corretta distribuzione dei valori dei pesi β_P e β_D rispetto a β_I , appartenenti alle componenti proporzionale, derivativa e integrale, poiché, in caso i primi due fossero troppo grandi, il controllo integrale verrebbe oscurato dalla loro presenza e non potrebbe svolgere in maniera completa il proprio ruolo. A seconda di come i diversi pesi vengono calibrati, è possibile utilizzare il controllore PID per un enorme numero di processi di natura diversa, sfruttando i singoli contributi in maniera più o meno marcata. [9]

La considerazione secondo la quale non vi è alcuna diluizione in seguito al processo di divisione cellulare è alla base di questa analisi, poiché la sua assenza può introdurre un errore a regime non indifferente. Però, anche se essa non fosse vera, l'aggiunta dei termini P e D permetterebbe in ogni caso di diminuire questo errore grazie al ridotto livello di Z_1 ottenuto come conseguenza della presenza dei due valori di controllo. [9]

Per studiare come il sistema reagisce alla presenza di perturbazioni si considera di voler controllare un processo che presenta come output $X_I(t)$ per ottenere una quantità

$r(t) = \mu y(t)$, detta "set-point", ovvero condurre l'uscita del sistema a un valore a regime tramite l'utilizzo di un controllore PID che presenta le caratteristiche fino ad ora analizzate.

Risulta fondamentale definire l'ingresso di controllo che permette di agire sul processo in esame, considerando quindi la somma dei tre termini proporzionale, integrale e derivativo in maniera tale da portare a zero l'errore $e(t) = r(t) - \theta X_I(t)$.

$$u(t) = k_P[\mu y(t) - \theta X_I(t)] + k_I \int_0^t [\mu y(\tau) - \theta X_I(\tau)] d\tau + k_D \left[\mu \frac{dy(t)}{dt} - \theta \frac{dX_I(t)}{dt} \right]$$

Equazione 21, ingresso di controllo del controllore PID. Permette di agire sul processo desiderato. [9]

Uno dei metodi più comuni per analizzare un sistema di controllo lineare basato su un controllore PID consiste nell'utilizzo della trasformata di Laplace e nello studio dei termini del

sistema nel dominio della frequenza, trasformando quindi il segnale di partenza $X_l(t)$ in $X_l(s)$ considerando l'uguaglianza $s = j\omega$, con $j = \sqrt{-1}$. [9]

Se si considera la situazione priva di disturbi, allora è valida la relazione per cui

$X_l(s) = u(s)\phi(s)$, con $\phi(s)$ corrispondente alla funzione di trasferimento del processo in esame che permette l'ottenimento del segnale $X_l(s)$ a partire dall'ingresso $u(s)$ che viene emesso dal controllore.

Per un controllore PID tradizionale, la trasformata $X_l(s)$ è facilmente ottenibile:

$$X_l(s) = \frac{[k_I + sk_P + s^2k_D]\phi(s)}{s + \theta[k_I + sk_P + s^2k_D]\phi(s)}\mu y(s)$$

Equazione 22, relazione tra $X_l(s)$ e il termine $r(s) = \mu y(s)$. [9]

In Eq.22, lo stato stazionario si valuta per $s = 0$ e il sistema è considerato stabile solo quando le parti reali dei poli sono negative: questo porta ad osservare che la relazione per $s = 0$ e $\phi(s = 0) \neq 0$ diventa uguale a $X_l(s = 0) = \frac{\mu y(s=0)}{\theta}$, come richiesto dalle condizioni iniziali, solo quando il termine $k_I \neq 0$: il controllo integrale è, quindi, fondamentale per stabilizzare il sistema. [9]

È stato ripetuto più volte che i processi osservati per l'ottenimento di questi controllori sono fondamentalmente non lineari, privi di caratteristiche che possano tornare utili alle analisi qui proposte. Questo è il caso anche per la realizzazione di controllori PID, facendo sì che la trasformata del termine da regolare sia diversa rispetto al caso tipico appena visto.

Ciò porta alla considerazione del processo analizzato nel primo capitolo: la linearizzazione di sistemi sfruttando la presenza di punti di equilibrio.

In particolare, per linearizzare il controllore PID ci si basa su uno stato stazionario particolare, $\{X_{1ss}, Z_{1ss}, Z_{2ss}, A_{ss}, M_{ss}, X_{lss}, Y_{ss}\}$, basato su un punto fisso specifico. [9]

Per il modello che è stato precedentemente analizzato, è possibile definire la funzione di trasferimento $\phi(s) = \frac{\beta_l}{(s+\gamma_1)(s+\gamma_l)}$; poi, allo stato stazionario è possibile considerare dei valori costanti per i termini k_P e k_D introdotti in Eq.21, nello specifico $k_P = \frac{\beta_P}{4\mu}$ e $k_D = \frac{\beta_D}{\theta} \frac{\gamma_A}{\beta_{AYM}}$. [9]

Per il termine k_I , invece, risulta necessario tenere in considerazione diverse relazioni per poter ottenere un valore costante a causa della presenza di dipendenza dal termine del dominio di Laplace, s . Se è possibile considerare $|s_{max}| = |j\omega_{max}| \ll \eta Z_{1ss}$, allora si ottiene la relazione

$$k_I \approx \frac{\beta_l Z_{1ss}}{Z_{1ss} + Z_{2ss}}. [9]$$

Nella pratica, questo può essere ottenuto se il legame dei due composti controllori che formano il controllore integrale risulta essere molto più veloce del processo trascrizionale del composto che deve essere regolato. [9]

$$X_I(s) \approx \frac{\left[k_I + 3sk_p + \frac{\theta\beta_A\beta_M}{\gamma_A\mu} sk_D \right] \phi(s)}{s + \theta[k_I + sk_p + s^2k_D]} \mu y(s)$$

Equazione 23, funzione di trasferimento approssimata in cui i termini k_p , k_I e k_D sono tutti costanti. [9]

Osservando le relazioni in Eq.22 ed Eq.23, risalta subito la presenza del medesimo denominatore, ma anche delle palesi differenze per quanto riguarda invece il numeratore. Innanzitutto, il termine proporzionale nella funzione linearizzata viene moltiplicato per 3 a causa della molteplicità del termine Y all'interno di f_p in Eq.15, dovuto al fatto che il controllore non agisce su un errore standard come, ad esempio, $k_p(\mu y - \theta X_I)$, ma sulla quantità $3k_p\mu y - k_p\theta X_I$: ciò varia il termine proporzionale anche nella linearizzazione. [9]

Per quanto riguarda il termine derivativo invece, esso è moltiplicato per un valore aggiuntivo poiché il processo utilizzato per implementarlo utilizza una forma scalata di $\frac{dX_I}{dt}$ che dipende anche da Y , ma non dalla sua derivata. Ciò porta alla mancanza del termine s^2 che invece è presente nei controllori PID tradizionali: questa perdita non porta a variazioni della dinamica per processi semplici, mentre per processi più complessi sarà necessaria l'applicazione di un controllore derivativo di tipo diverso. [9]

In ogni caso, anche se il termine s^2k_D è molto importante per il tracciamento a un punto desiderato, non lo è invece per quanto riguarda la reiezione dei disturbi e l'adattamento alle perturbazioni dei singoli parametri. Ciò si può osservare nell'ingresso di controllo ottenuto dal controllore linearizzato [9]:

$$u(t) = k_p[3\mu y(t) - \theta X_I(t)] + k_I \int_0^t [\mu y(\tau) - \theta X_I(\tau)] d\tau + k_D \left[\frac{\theta\beta_A\beta_M}{\gamma_A\mu} \mu y(t) - \theta \frac{dX_I(t)}{dt} \right]$$

Equazione 24, ingresso di controllo ottenuto dalla linearizzazione del sistema. [9]

Si conclude che i controllori PID realizzati in campo biologico e, nello specifico, quello cellulare, permettono un miglioramento del controllo rispetto a quanto illustrato dal semplice utilizzo del controllore antitetico integrale a retroazione e possono essere utilizzati per una moltitudine di processi diversi a seconda di come vengono calibrati. La risposta pronta e stabile è un vantaggio enorme, soprattutto quando applicato a situazioni così imprevedibili e ricche di disturbi.

4 – La realizzazione di cellule Beta-mimetiche per il controllo della glicemia.

Per il corretto funzionamento dei molteplici compiti del corpo umano sono necessarie diverse sostanze che possono essere assimilate tramite la dieta e la cui concentrazione deve essere attentamente mantenuta sotto controllo grazie all'omeostasi. Uno di questi composti è il glucosio, il quale svolge un ruolo cruciale per il rifornimento di energia di diversi organi e la cui concentrazione nel sangue, anche detta glicemia, deve essere finemente controllata per evitare situazioni potenzialmente dannose di ipoglicemia o iperglicemia, le quali potrebbero causare seri danni all'intero organismo.

Il ruolo di controllo viene eseguito dal pancreas, organo che, grazie a diverse cellule specializzate, permette di produrre specifiche molecole quali insulina e glucagone che regolano la concentrazione del composto nel sangue: l'insulina è particolarmente importante, anche piccole variazioni della sua produzione possono portare a situazioni patologiche come il diabete mellito, una delle patologie umane più studiate e diffuse. [11]

La porzione endocrina del pancreas è responsabile di questo compito ed è composta da ammassi cellulari molto vascolarizzati, in cui le cellule sono di piccole dimensioni, di forma poligonale e separate le une dalle altre dalla presenza di reti capillari, in maniera tale che ogni elemento sia a contatto con un vaso. Si distinguono quattro tipi di cellule diverse, tre delle quali caratterizzate dalla presenza di granuli: cellule α , che sintetizzano e secernono il glucagone, cellule β , che producono insulina e sono presenti in quantità maggiore, e infine le cellule δ , le quali secernono la somatostatina. [11]

Per l'importanza dell'insulina nell'ambito della regolazione della quantità ematica di glucosio, le cellule trattate in questa analisi saranno prevalentemente quelle di tipo β : le patologie più studiate sono, infatti, relative alla mancata produzione della proteina o alla sua ricezione errata da parte dei tessuti bersaglio: queste due condizioni costituiscono le forme principali del diabete mellito, entrambe le quali portano a gravi conseguenze sul corpo umano.

La prima forma, detta "diabete mellito di tipo I" o "insulinodipendente", è dovuta proprio alla carenza di insulina in circolo nel corpo umano, principalmente a causa della sua mancata produzione. Si manifesta a partire dall'infanzia in seguito alla distruzione dei siti pancreatici che contengono le cellule β a causa di sindromi autoimmuni che compromettono la stabilità dell'organismo. Molto spesso è trattata con terapie sostitutive dell'insulina, permettendo di ridurre gli effetti della sua carenza e garantendo una vita normale ai pazienti. [11]

In maniera sostanzialmente diversa agisce invece la seconda forma, detta "diabete mellito di tipo II" o "non insulinodipendente", che si presenta come una sindrome da insulinoresistenza, in cui i tessuti bersaglio che devono ricevere l'insulina non rispondono più in maniera corretta

all'ormone. Questa condizione può essere causata da uno stile di vita sedentario, situazioni di obesità o malnutrizione e altri fattori legati all'ambiente in cui si vive. [12]

La funzione di regolazione dell'insulina viene innescata in seguito all'innalzamento dei livelli ematici di glucosio, oltre alla ricezione di determinati stimoli nervosi come la vista del cibo e l'innalzamento del livello di alcune biomolecole nel flusso ematico. Per iniziare, il glucosio ematico entra nella cellula β tramite diffusione, facendo sì che a un elevato livello di glicemia corrisponda un elevato livello di glucosio intercellulare. Quando la concentrazione della molecola raggiunge valori sufficientemente elevati vi è la depolarizzazione della membrana che porta all'ingresso di una grande quantità di ioni calcio, innescando il rilascio di insulina: man mano che la concentrazione di glucosio aumenta, anche le vie di ingresso per gli ioni possono aumentare, portando a una maggiore produzione del composto desiderato. [11]

L'insulina ha diversi compiti per quanto riguarda il metabolismo dei carboidrati: essa, infatti, facilita l'ingresso del glucosio nei muscoli e nel tessuto adiposo, in cui viene assunto grazie a diffusione facilitata da specifici trasportatori: l'insulina entra in gioco quando la cellula deve assumere glucosio, permettendo la fusione delle vescicole che contengono i trasportatori favorendone la comparsa sulla superficie cellulare. Oltre a ciò, un'altra funzione di fondamentale importanza riguarda l'immagazzinamento del glucosio nel fegato sotto forma di glicogeno, diminuendo il livello della glicemia che può essere ripristinato dalla sua idrolisi da parte del glucagone. [11]

Infatti, soggetti affetti da diabete mellito di tipo II presentano un elevato livello di glucosio nel flusso ematico, condizione nota con il nome di iperglicemia, la quale può causare gravi danni all'organismo se non viene attentamente trattata: gravi conseguenze possono riguardare patologie cardiovascolari, malfunzionamenti al livello dei reni e disfunzioni ormonali. [12]

Le terapie attualmente diffuse per queste patologie differiscono a seconda della tipologia di diabete che deve essere contrastata: per il diabete di tipo I, caratterizzato dalla quasi totale incapacità di produrre insulina da parte del paziente, si predilige la somministrazione diretta di insulina esogena tramite dispositivi automatici o manuali, a seconda della necessità del paziente. Per quanto riguarda il diabete di tipo II invece, a causa della natura più imprevedibile e specifica della malattia, sono state sviluppate una serie di terapie diverse, tra le quali la somministrazione delle incretine come, ad esempio, il "glucagon-like peptide 1", anche detto GLP-1. [12]

Le incretine sono fondamentali per il corretto funzionamento del corpo umano: questi ormoni sono prodotti dall'intestino in seguito all'ingestione di cibo e stimolano la secrezione di insulina, oltre a favorire una situazione di iperglicemia permettendo una pronta risposta dall'organismo che provvederà a una maggiore produzione e rilascio di insulina. In particolare,

l'effetto del peptide GLP-1 unito ad altre incretine, nello specifico al "glucose-dependent insulinotropic polypeptide" (GIP), risulta essere fino a tre volte migliore rispetto alla somministrazione di glucosio intravenoso per l'attivazione delle cellule β . [13]

Tuttavia, nei pazienti affetti da diabete mellito di tipo II, questo effetto benefico è presente in maniera meno marcata o del tutto assente a causa della ridotta efficacia di GIP sulle cellule del pancreas. Nonostante questo, i benefici legati alla presenza di GLP-1 sono comunque presenti, facendo sì che i recettori di questo ormone possano essere farmacologicamente stimolati per ridurre il livello di glucosio nel plasma e migliorare il controllo glicemico. [13]

Si può osservare la varietà e l'efficacia delle diverse terapie attualmente disponibili per contrastare questo tipo di patologie, alle quali si aggiungono anche le tecniche attualmente in sviluppo grazie all'avanzamento della biologia sintetica e dei circuiti da essa introdotti. In particolare, è stato possibile ottenere secrezione di insulina sensibile alla concentrazione di glucosio a partire da cellule staminali riprogrammate, consentendo di rigenerare la popolazione di cellule β nei pazienti affetti da diabete di tipo I. Oltre a ciò, i progressi nel campo della biologia sintetica hanno consentito di sviluppare circuiti molto specializzati dai quali ottenere impianti immunoprotettivi, permettendo la produzione di insulina a comando o l'espressione del peptide GLP-1: nonostante questo, nessuna tecnica finora vista applica controllo a catena chiusa basato sulla concentrazione ematica di glucosio. [12]

È proprio a questo proposito che è stato sviluppato un sistema trascrizionale attivabile da glucosio all'interno di cellule umane extra-pancreatiche che rileva la concentrazione del monosaccaride e, in base ad essa, regola la trascrizione di insulina e dell'ormone GLP-1. [12]

Nelle cellule β del pancreas umano, la biosintesi di insulina avviene grazie a una cascata di processi che ha inizio al livello della catena di mRNA codificante per un precursore a catena singola che prende il nome di "preproinsulina", la quale, in seguito alla rimozione del peptide segnale al passaggio del reticolo endoplasmatico, porta alla generazione della "proinsulina". Essa consiste in un peptide suddiviso in tre domini diversi: la catena B, amino-terminale, la catena A, carbossi-terminale e un peptide C di connessione al centro per legare le diverse parti. All'interno del reticolo endoplasmatico è proprio il dominio C che viene attaccato ed escisso da endopeptidasi che portano alla formazione dell'insulina vera e propria, la quale sarà assemblata in granuli e accumulata all'interno dell'apparato di Golgi. Produzione e secrezione di insulina avvengono in seguito alla ricezione di segnali di livello glicemico troppo elevato, specificamente tramite due modalità di innalzamento dei suoi livelli in circolo: si parte da un incremento rapido e iniziale a causa dell'insulina già prodotta e conservata all'interno della cellula, per poi avere un graduale aumento della sua concentrazione man mano che essa viene nuovamente sintetizzata. [11]

Nel circuito sintetico che si desidera progettare, la sensibilità al glucosio è stata ottenuta tramite l'accoppiamento di una cascata "β-mimetica" di ingresso di ioni calcio, mediata da glicolisi, a un sistema di accoppiamento sintetico di eccitazione-trascrizione all'interno delle cellule renali 293 ottenute da embrione umano, anche dette cellule HEK-293: questo particolare tipo di cellula è ampiamente utilizzato per studiare l'attività dei canali ionici e permette produzione ad alto livello di proteine anti-diabetiche. [12]

Queste cellule sono, poi, state utilizzate per realizzare un campione in grado di misurare la grandezza dello stimolo legato alla depolarizzazione della membrana cellulare: si osserva che il promotore sintetico P_{NFAT2} , il quale contiene ripetizioni del recettore nucleare appartenente alla classe dei linfociti T attivi (NFAT), ottenuto dal promotore interleuchina-4 di origine animale (nello specifico di ratto), era la componente con la risposta più pronta alla depolarizzazione indotta da fattori chimici come 75mM KCl. [12]

Unendo l'effetto di questi fattori con canali ionici voltaggio-dipendenti come $Ca_v1.2$, si nota un netto miglioramento nell'accoppiamento di eccitazione-trascrizione e una migliorata sensibilità nel campione scelto: in particolare, usare cinque ripetizioni $NFAT_{IL4}$ in tandem 5' di un promotore minimo fa sì che si sviluppi un rateo ottimale di induzione tra il potenziale di membrana a riposo e quello depolarizzato, oltre a permettere la distinzione dei segnali generati da canali ionici di calcio eccitabili a differenti soglie di attivazione. [12]

Si vuole anche sfruttare questo campione per analizzare come le componenti ottenute dalla cascata di trascrizione delle cellule β permettano un miglioramento della sensibilità al glucosio, migliorando, quindi, le prestazioni del sistema da progettare.

In particolare, le singole componenti da analizzare sono: il trasportatore di glucosio 2 (GLUT2), la glucochinasi (GCK), canali di potassio sensibili all'ATP (K_{ATP}), canali di calcio voltaggio-dipendenti ($Ca_v1.3$). Tra tutti questi, solo l'ultimo si è dimostrato efficace in questo compito, con gli altri che si sono rivelati essere tossici in quantità elevate per la cellula o senza alcun effetto. Contando anche che in HEK-293 vi è già espressione di GLUT1 e di K_{ATP} , si rivela necessaria l'aggiunta di canali di calcio $Ca_v1.3$ per garantire la corretta dipendenza dalla concentrazione di glucosio in queste cellule, permettendo lo sviluppo di una cascata mimetica di processi derivati da cellule β. [12]

In maniera tale da permetterne lo sviluppo corretto e consistente con le caratteristiche analizzate, per queste cellule è stato sviluppato un modello matematico caratterizzato dalla presenza di diverse ODE che permettono di esplicitare le funzioni di ogni componente della cellula HEK-293, oltre all'elettrofisiologia della cellula stessa e alla rappresentazione della regolazione in vivo della regolazione glucosio-insulina. Ulteriori modelli matematici sono stati sviluppati per descrivere le situazioni in cui il circuito deve essere applicato. [12]

Per testare, poi, la specificità al substrato del sistema di riconoscimento del glucosio ottenuto dai canali $Ca_v1.3$ e dalle cinque ripetizioni in tandem dei promotori scelti, le cellule HEK-293 contenenti questi componenti sono state coltivate e poi poste sotto azione di specifici composti atti a misurare le loro capacità di regolazione, come glucosio e controllori osmotici oppure zuccheri consumati direttamente dai pazienti tramite la dieta.

A partire dal circuito ingegnerizzato in questo modo, l'unico composto che permetteva l'attivazione della fosfatasi alcalina secreta dalla placenta umana (SEAP) era il D-glucosio a concentrazioni rilevanti dal punto di vista fisiologico: questo particolare composto è tipico della ripetizione dei promotori scelta e permette di verificare che il sistema di accoppiamento eccitazione-trascrizione sia attivato in maniera corretta. [12]

A partire da questi risultati, si è sviluppata una serie di cellule coltivate in maniera tale da presentare le caratteristiche desiderate, concentrandosi sulla specificità ottenuta grazie ai canali di calcio $Ca_v1.3$ e sulla cinetica di induzione data dalla regolazione dell'espressione genica basata sul P_{NFAT3} : le nuove cellule ottenute da questi studi prendono il nome di $HEK - 293_{NFAT-SEAP1}$ e servono a garantire l'espressione di SEAP guidata dal promotore P_{NFAT3} . Oltre a queste condizioni, l'espressione ectopica dei canali di calcio $Ca_v1.3$ migliora le caratteristiche della cellula, permettendo migliori rapporti di induzione anche a diverse concentrazioni di glucosio extracellulare. [12]

La validità di queste cellule nel contrastare una malattia come il diabete mellito dipende fortemente dalla loro capacità di regolare l'espressione di una determinata sostanza in base alla quantità di glucosio presente nell'ambiente esterno alla cellula stessa, ed è per questo che si desidera testare la loro funzionalità in un ambiente che simuli la condizione diabetica di un paziente umano: si è scelto di utilizzare topi affetti da diabete mellito, sia di tipo I che di tipo II, a cui sono stati impiantate intraperitonealmente le cellule transgeniche $Ca_v1.3-HEK - 293_{NFAT-SEAP1}$. In questo ambiente, le cellule si attivavano sia grazie alla presenza dei canali di calcio, sia percependo la dose di glucosio presente nell'ambiente circostante, attivando la produzione di SEAP che si conservava nel siero e poteva poi essere analizzata e confrontata con la quantità di glucosio presente in circolo. Il corretto funzionamento del sistema ha portato allo sviluppo di cellule specifiche mirate a contrastare le forme di diabete più diffuse basandosi sulle terapie più utilizzate. [12]

Nel caso del diabete mellito di tipo II, solitamente si utilizza una terapia basata sull'espressione del composto GLP-1: per questo motivo, il metodo sviluppato per la realizzazione delle cellule consiste nella co-trasfezione dei canali di calcio $Ca_v1.3$ e della variante corta della GLP-1 umana (pMX115; P_{NFAT5} -shGLP1-pA). L'efficacia di questa cellula è stata verificata in vivo

tramite topi affetti da diabete mellito di tipo II, osservando una autosostenuta produzione di GLP-1 e una migliorata sensibilità al glucosio per la secrezione di insulina. [12]

Analogamente, per la cura del diabete di tipo I si è preferita la co-trasfezione di canali $Ca_v1.3$ e di un vettore di espressione di insulina (pMX100; P_{NFAT5} -mINS-pA) garantendo secrezione di insulina in condizioni di iperglicemia: questa tecnica ha avuto il beneficio sia di riportare ai livelli corretti la quantità di insulina prodotta dal topo sia di correggere l'iperglicemia in pochi giorni, senza portare allo sviluppo di ipoglicemia, come invece poteva accadere con terapie di natura diversa. [12]

Dal punto di vista della teoria del controllo, risulta evidente la robustezza del sistema implementato grazie alle cellule transgeniche, permettendo il raggiungimento di un range desiderato (ovvero la quantità di insulina nel sangue) senza il rischio di problemi di salute legati a una quantità troppo ridotta di questo composto.

La robustezza del sistema è fondamentale per la sua applicazione in pazienti diabetici anche per garantire il funzionamento delle cellule in condizioni in cui venga somministrata insulina in maniera esogena o nel caso in cui alcune cellule- β smettano di funzionare, disattivandosi e riattivandosi di conseguenza senza portare a condizioni patologiche per l'individuo.

L'utilizzo delle cellule HEK- β permette di ottenere, infatti, un sistema che risponde in maniera corretta anche a queste variazioni, ripristinando l'omeostasi di glucosio e insulina nel flusso ematico umano, mantenendo robusti questi processi anche in seguito all'assunzione di alimenti.

Lo stesso non risulta essere vero per cellule basate su promotori pMX115, le quali permettono un controllo a feedback negativo e non permettevano la sopravvivenza ai test della tolleranza al glucosio. [12]

Poiché le cellule- β non secernono insulina basandosi esclusivamente sulla quantità di glucosio nel sangue, ma anche sulla presenza di fattori come il GLP-1, risulta necessario ingegnerizzare le cellule HEK-293 per presentare componenti tipici delle HEK- β ma anche per l'espressione di recettori di GLP-1 e secrezione di insulina guidata da P_{CRE} , ottenendo la cellula HEK- β_{GLP} . Nonostante gli sforzi per sviluppare questo tipo di cellula, l'omeostasi di glucosio risultava di qualità inferiore rispetto alle normali cellule HEK- β , consentendo di stabilire queste ultime come riferimento per ottenere un modello di cellula- β mimetica. [12]

Paragonando, poi, queste cellule ingegnerizzate alla famiglia di cellule- β pancreatiche $1.1E7$ è possibile osservare le differenze nella produzione di insulina e nel processo per ristabilire i livelli basali di glucosio: il primo compito risulta migliore se portato a termine dalle cellule mimetiche, permettendo una secrezione maggiore dell'insulina nell'organismo, consentendo anche una migliore omeostasi dei livelli di glicemia. [12]

L'utilizzo di cellule- β mimetiche come terapia per il contrasto di patologie quali il diabete mellito trova supporto nel fatto che, rispetto ad altre tecnologie sviluppate per lo stesso scopo, la tecnica qui illustrata presenta diversi vantaggi inediti, come la capacità di coordinare la misura della concentrazione di glucosio consentendo la secrezione di insulina che dipende dalla dose di sostanze presenti nel flusso ematico, in maniera reversibile e a circuito chiuso. [12]

Le analisi effettuate sulle cellule- β per osservare l'importanza delle sue singole componenti hanno determinato che i canali $Ca_v1.3$ sono fondamentali per la corretta misura dei livelli di glucosio e l'attivazione dei processi che dipendono da essa, soprattutto quando si desidera sviluppare cellule extra-pancreatiche che svolgano questo compito, come avviene per le cellule HEK-293, permettendo un controllo preciso, reversibile e dinamico: unendo questi canali alle funzioni di produzione e secrezione di insulina ha permesso di ottenere le cellule HEK- β , fondamentali per il trattamento del diabete.

Nella terapia contro il diabete, uno dei metodi più diffusi consiste nell'impianto di isole di Langerhans coltivate in laboratorio all'interno del paziente, consentendo il ripristino delle normali funzioni del pancreas. Queste isole, infatti, sono degli ammassi di cellule naturalmente presenti nel pancreas endocrino e contengono tutte e quattro le categorie già osservate in precedenza, permettendo la sua completa funzione. [11]

Il problema di questa tecnica consiste nella ridotta quantità di materiale a disposizione, oltre al fatto che la coltivazione di queste particolari strutture è resa difficile dalla qualità delle cellule donate, che varia molto da soggetto a soggetto e può rendere la terapia piuttosto imprevedibile. [12]

La differenziazione di cellule β a partire da cellule staminali pluripotenti indotte potrebbe essere un'altra possibile soluzione al problema, garantendo una cura specifica per ogni paziente. Nonostante ciò, gli elevati costi e tempi di realizzazione di queste cellule, oltre alla complessità di un tale processo, renderanno probabilmente improbabile la loro produzione su larga scala. [12]

È proprio per questi motivi che cellule mimetiche come la HEK- β potrebbero essere una soluzione più che convincente, consentendo di ottenere controllo glicemico basato su componenti delle cellule- β pancreatiche, ma sfruttando una famiglia come quella delle HEK-293 che presenta una lunga storia di utilizzo in ambito farmaceutico. La progettazione di cellule sfruttando queste caratteristiche permette anche di variare i singoli parametri come se si stesse agendo su un sistema di controllo a cui è possibile accoppiare altre componenti permettendo la produzione di un vario numero di sostanze fondamentali, come anche il GLP-1 per contrastare entrambi i tipi più diffusi di diabete.

Bibliografia

- [1] A. Ferrante, «Appunti di Automatica per Ingegneria Biomedica con esercizi svolti,» 2022.
- [2] V. Taglietti e altri, «Mezzo interno e omeostasi,» in *Fondamenti di Fisiologia generale e integrata*, EdiSES Università, 2019, pp. 4-9.
- [3] D. Del Vecchio, A. J. Dy e Y. Qian, «Control theory meets synthetic biology,» *J. R. Soc. Interface*, vol. 13, 2016.
- [4] R. Murray e D. Del Vecchio, «Biomolecular Feedback Systems,» in *Dynamic Modeling of Core Processes*, Princeton University Press, 2015, pp. 39-42.
- [5] T. Afroz e C. L. Beisel, «Understanding and exploiting feedback in synthetic biology,» *Chemical Engineering Science*, vol. 103, pp. 80-82, 2013.
- [6] C. Briat, A. Gupta e M. Khammash, «Antithetic Integral Feedback Ensures Robust Perfect Adaptation in Noisy Biomolecular Networks,» *Cell Systems*, vol. 3, pp. 15-26, 2016.
- [7] G. D. T., «Stochastic Simulation of Chemical Kinetics,» *Annual Review Physical Chemistry 2007*, vol. 58, p. 37, 2007.
- [8] S. K. Aoki, G. Lillacci, A. Gupta, A. Baumschlager, D. Schweingruber e M. Khammash, «A universal biomolecular integral feedback controller for robust perfect adaptation,» *Nature*, vol. 570, pp. 533-537, 2019.
- [9] M. Chevalier, M. Gómez-Schiavon, A. H. Ng e H. El-Samad, «Design and Analysis of a Proportional-Integral-Derivative Controller with Biological Molecules,» *Cell Systems*, vol. 9, pp. 338-353, 2019.
- [10] J. Gunawardena, «Time-scale separation – Michaelis and Menten's old idea, still bearing fruit.,» *FEBS J*, vol. 281, p. 473, 2014.
- [11] V. Taglietti e altri, «Sistema Endocrino, Pancreas Endocrino,» in *Fondamenti di Fisiologia Generale e Integrata*, EdiSES Università, 2019, pp. 359-363.
- [12] M. Xie e altri, « β -cell-mimetic designer cells provide closed-loop glyceimic control.,» *Science*, vol. 354, n. 6317, pp. 1296-1301, 2016.
- [13] M. A. Nauck e J. J. Meier, «Incretin hormones: Their role in health and disease.,» *Diabetes, obesity & metabolism*, vol. 20, n. Suppl 1, p. 5, 2018.
- [14] J. B. Stock e M. D. Baker, «Chemotaxis,» in *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*, Princeton University, Princeton, NJ, USA, Academic Press, 2009, pp. 71-78.