

*RAPPORTO SUL LAVORO DEL GRUPPO DI RICERCA DI FISICA
DELLE ALTE ENERGIE*

Ugo AMALDI, Jr.

**Una linea di ricerca per Adone, la macchina italiana
a fasci collidenti di elettroni e positoni**

Hanno partecipato allo sviluppo di questo programma di ricerca:

UGO AMALDI, Jr. (Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità);
ROBERTO BIANCASTELLI (Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità);
PETER STEIN (Cornell University, Ithaca, USA; ospite dei Laboratori di Fisica dell'Istituto
Superiore di Sanità nell'anno accademico 1965-66);
ANTONIO DEGASPERIS (ospite dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità).

Questo lavoro è stato realizzato nel quadro dell'attività della « Sottosezione Sanità »
dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare.

INTRODUZIONE

Macchine acceleratrici di energia sempre più elevata vengono impiegate nello studio della fisica delle particelle elementari. Negli ultimi anni un tipo di macchine completamente nuovo si è aggiunto alle molte già in uso: gli « anelli di accumulazione », detti anche « macchine a fasci collidenti ». In questi nuovi acceleratori due fasci di particelle di alta energia vengono mantenuti su orbite circolari mediante campi magnetici per tempi relativamente lunghi, dell'ordine dei minuti e anche delle ore. I due fasci si incrociano in una o più « zone di interazione » ove particelle di fasci opposti collidendo danno luogo a processi che dipendono dal tipo di particelle e dalla loro energia. Poichè le particelle che interagiscono hanno quantità di moto eguali ed opposte, il baricentro della reazione è fermo nel laboratorio, contrariamente a ciò che accade nel caso delle macchine convenzionali, nelle quali particelle di alte energie vengono fatte collidere con i nuclei di un bersaglio, fermi nel laboratorio. A causa di questo moto del baricentro, una notevole frazione della energia delle particelle accelerate nelle macchine convenzionali non viene efficientemente utilizzata in quanto, anzichè essere a disposizione delle particelle finali nel sistema di riferimento del baricentro, si ritrova nel moto del baricentro del sistema rispetto al laboratorio. Questo effetto è tanto più sensibile quanto minore è la massa delle particelle bersaglio, e risulta quindi particolarmente grave nel caso di urti contro elettroni fermi.

Gli anelli di accumulazione sono vantaggiosi non solo per il fatto che l'energia delle particelle collidenti è tutta a disposizione dei prodotti della reazione, ma anche perchè una opportuna scelta delle particelle iniziali permette di produrre in modo predominante stati finali aventi numeri quantici ben definiti. Ciò accade, per esempio, allorchè i due fasci collidenti sono formati di elettroni e positoni. Indicando con la lettera E l'energia totale di ciascuna delle due particelle che collidono, uno dei fenomeni che avvengono con maggiore probabilità è l'annichilazione della coppia elettrone-positone con formazione di un quanto del campo elettromagnetico avente energia $2E$ e quantità di moto nulla nel laboratorio. Questo quanto, a cui è associata energia ma non quantità di moto, ha massa diversa da zero e si comporta quindi in modo completamente diverso dai quanti *reali*, che hanno massa nulla. In particolare il quanto *virtuale* decade, dopo un tempo che secondo il principio di indeterminazione è tanto più breve quanto maggiore è la energia $2E$, in uno qualsiasi degli stati finali che hanno gli stessi numeri quantici del quanto virtuale. Più esattamente, poichè momento angolare totale, parità e coniugazione di carica del quanto virtuale sono identici a quelli di un quanto reale, lo stato finale, per quanto complesso sia, deve necessariamente avere momento angolare $J = 1$ (in unità \hbar), parità $\Pi = -1$, e coniugazione di carica $C = -1$. È questo il vantaggio a cui ci riferivamo allorchè all'inizio del capoverso abbiamo parlato di stati finali con numeri quantici ben definiti; infatti l'interpretazione dei risultati risulta grandemente facilitata dalla conoscenza di questa proprietà degli stati finali prodotti attraverso uno stato intermedio contenente un solo quanto gamma virtuale. Il tipo di processo ora descritto viene di solito rappresentato mediante il grafico riportato in Fig. 1.

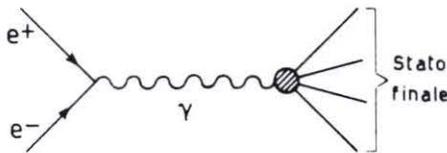


Fig. 1. — Processo dominante per la produzione di adroni nell'urto elettrone-positone.

Gli stati finali che vengono così prodotti contengono o particelle che hanno soltanto interazioni elettromagnetiche, come le coppie $e^+ e^-$ o $\mu^+ \mu^-$, oppure particelle soggette alle interazioni forti (dette adroni), cioè pioni, mesoni kappa, protoni e antiprotoni, etc. Ci si attende che la produzione di adroni sia dominata dai processi rappresentati in Fig. 1. Ai processi in cui vengono prodotte particelle soggette alle sole interazioni elettromagnetiche (come gli elettroni e i positoni, i mesoni μ e i gamma reali) contribuiscono anche stati intermedi virtuali di altro tipo; però, a differenza di ciò che accade per gli adroni, esiste una teoria (l'elettrodinamica quantistica) che è stata

verificata a più bassa energia e che permette di prevedere univocamente le sezioni di urto di tutti i processi elettromagnetici. Ne segue che le macchine a fasci collidenti di elettroni e positoni permetteranno da una parte un controllo della validità della elettrodinamica quantistica ad energie più elevate di quelle raggiunte nelle esperienze finora eseguite, e dall'altra uno studio dei processi adronici per lo più caratterizzati da stati finali aventi i numeri quantici di un quanto gamma.

ADONE

L'anello di accumulazione detto AdA è stato costruito in Italia nel 1960 su proposta del prof. Touschek dell'Università di Roma ed è stata la prima macchina a fasci collidenti nella quale siano stati accumulati elettroni e positoni (si veda per esempio BERNARDINI *et al.*, 1962); l'energia di AdA è $E \leq 250$ MeV.

Sono attualmente in fase di messa a punto, ma non hanno ancora prodotto risultati scientifici definitivi, due altri anelli per e^+ e e^- : VEPP2 a Novosibirsk (Siberia) e ACO a Orsay (Francia) progettati rispettivamente per energie $E \leq 700$ MeV e $E \leq 500$ MeV.

Presso i Laboratori Nazionali del CNEN di Frascati è stata progettata ed è da diversi anni in corso di costruzione una macchina di energia ancora più elevata: $E \leq 1500$ MeV (si veda per esempio AMMAN *et al.*, 1962). In questo grande anello di accumulazione (Adone) i fasci di elettroni e positoni vengono iniettati mediante un acceleratore lineare, attualmente montato e funzionante. I fasci ruotano in verso opposto in una ciambella in cui è mantenuto un alto vuoto (10^{-9} Torr) e vengono deflessi e focalizzati mediante magneti deflettori e quadrupoli. I fasci si incrociano in quattro zone di interazione, ove verranno montate le esperienze. La pianta della macchina, che si prevede entrerà in funzione verso la metà del 1967, è riportata in Fig. 2.

Caratteristica fondamentale di un anello di accumulazione, accanto alla energia massima raggiungibile, è la sua « luminosità » L . Questa grandezza, che dipende dal numero di elettroni e positoni accumulati, dalle dimensioni trasversali dei fasci nella zona di incrocio e dal numero di incroci per unità di tempo, è tale che moltiplicata per la sezione d'urto del processo che si vuole studiare dà direttamente il numero di eventi attesi per unità di tempo. Nel caso di Adone il valore di progetto della luminosità dipende linearmente dalla energia della macchina e vale

$$L = 0,7 \times 10^{33} \times E_{\text{GeV}} \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1} \quad (1)$$

È questo un valore piuttosto conservativo, in quanto il limite imposto dalla carica spaziale è circa dieci volte più alto; si spera pertanto che la lumino-

sità di progetto possa essere superata dopo un primo periodo di studio del comportamento della macchina.

Nel febbraio 1966 si è tenuto a Frascati un Congresso nel quale si sono discusse le proposte di esperienze avanzate dai gruppi interessati all'utilizzazione di Adone. I Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità

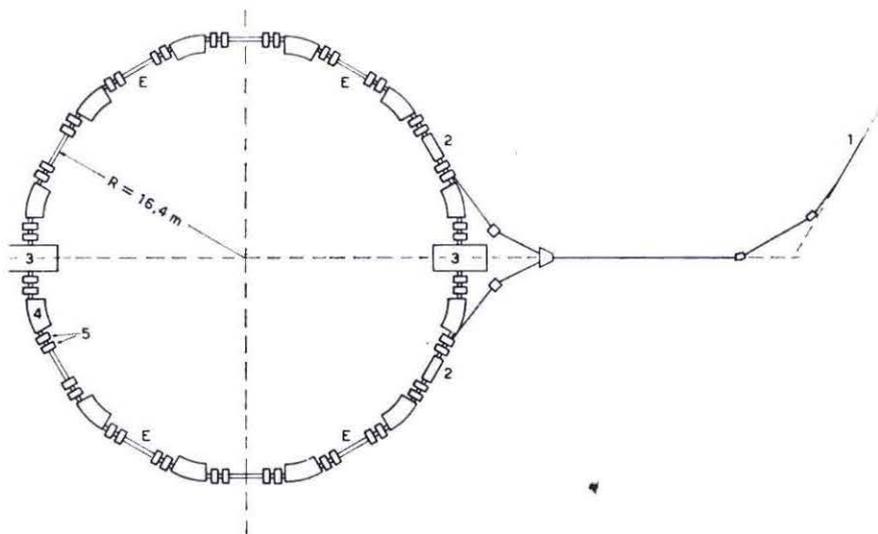


Fig. 2. — Pianta di Adone: 1. Iniettore; 2. Deflettori pulsati; 3. Cavità a radiofrequenza; 4. Magnete, 5. Quadropoli, E. Zone di intersezione per esperienze.

hanno contribuito con tre rapporti (AMALDI Jr., DEGASPERIS & STEIN, 1965; AMALDI Jr., BIANCASTELLI & STEIN, 1966a; AMALDI Jr., BIANCASTELLI & STEIN, 1966b).

Successivamente il progetto della prima esperienza proposta ha subito diverse aggiunte interessanti ed è entrato nella fase esecutiva. Lo stato attuale del progetto è stato presentato all'*International Symposium on Electron and Positron Storage Rings*, tenutosi a Saclay (Francia) dal 26 al 30 ottobre 1966 (AMALDI Jr., BIANCASTELLI & STEIN, 1966c). Si prevede che oltre al Prof. P. Stein della Cornell University (Ithaca, USA) collaborerà con i ricercatori dei Laboratori di Fisica nella fase finale della esperienza anche il Dr. S. Tazzari dei Laboratori Nazionali di Frascati.

IL PROGETTO DI ESPERIENZA SULLA RISONANZA Φ_0

Tra tutti i processi adronici rappresentati in Fig. 1 vi è una categoria di fenomeni particolarmente semplice: la produzione di una singola particella

che ha i numeri quantici del quanto gamma virtuale. Nessuna legge di conservazione attualmente stabilita proibisce infatti che il gamma virtuale si trasformi in una *sola* particella ferma nel laboratorio, se l'energia $2E$ coincide con la massa di una particella che ha stesso J , Π e C del gamma. Attualmente sono note tre particelle che soddisfano a queste condizioni: il ρ^0 (massa 760 MeV), l' ω^0 (massa 780 MeV) e il Φ^0 (massa 1020 MeV). Tutte queste particelle sono estremamente instabili, tanto che si preferisce chiamarle « risonanze »; esse decadono in tempi brevissimi ($10^{-23} \div 10^{-24}$ secondi) in pioni e mesoni kappa. In particolare la risonanza Φ^0 decade in una coppia $K^+ K^-$ nel 30 % dei casi circa. Uno degli scopi della esperienza proposta è lo studio del processo graficamente rappresentato in Fig. 3.

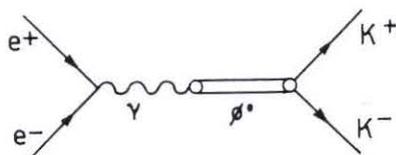


Fig. 3. — Rappresentazione grafica del processo di produzione di coppie $K^+ K^-$ attraverso la risonanza Φ^0 .

Sperimentalmente si tratta di rivelare nella zona di interazione una coppia di mesoni kappa che vanno in direzione opposta; ci si attende che il numero di queste coppie presenti un picco molto spiccato, dovuto all'esistenza della Φ^0 , allorchè l'energia della macchina è $E = 510$ MeV, cioè quando l'energia $2E$ del γ coincide con la massa della Φ^0 . I mesoni kappa prodotti hanno una energia cinetica molto piccola, 16 MeV, e si fermano in uno spessore di scintillatore dell'ordine di uno o due millimetri, producendo un segnale luminoso intenso e quindi caratteristico. Il calcolo degli eventi attesi sarebbe immediato qualora si conoscesse la probabilità di decadimento della Φ^0 in una coppia $e^+ e^-$; poichè questo numero non è noto sperimentalmente ed è anzi scopo dell'esperienza la sua misura, si può ricavare una previsione a questo riguardo nel quadro delle attuali teorie di simmetria degli adroni. Si ricava che con la luminosità di eq. (1) e con due contatori per i kappa che coprono un angolo solido di 4 steradiani si attendono circa 170 eventi all'ora. Naturalmente se le tre risonanze ρ^0 , ω^0 e Φ^0 , che hanno i numeri quantici di un gamma, non obbediscono alle proprietà di simmetria che le teorie ora in uso postulano, la velocità di conteggio potrebbe essere molto minore di quella così calcolata. In Fig. 4 è rappresentato l'apparato sperimentale in corso di montaggio. I contatori a scintillazione U_1 , U_2 , U_3 , D_1 , D_2 e D_3 servono ad individuare i due kappa carichi provenienti dal decadimento della Φ^0 ; per brevità non discutiamo in dettaglio la logica elettronica necessaria per discriminare gli eventi cercati dal fondo.

Contemporaneamente allo studio del decadimento in $K^+ K^-$, l'esperienza si propone di studiare anche il decadimento della Φ^0 in $\mu^+ \mu^-$ e l'insieme dei decadimenti che danno luogo a emissione di γ reali. Come abbiamo detto

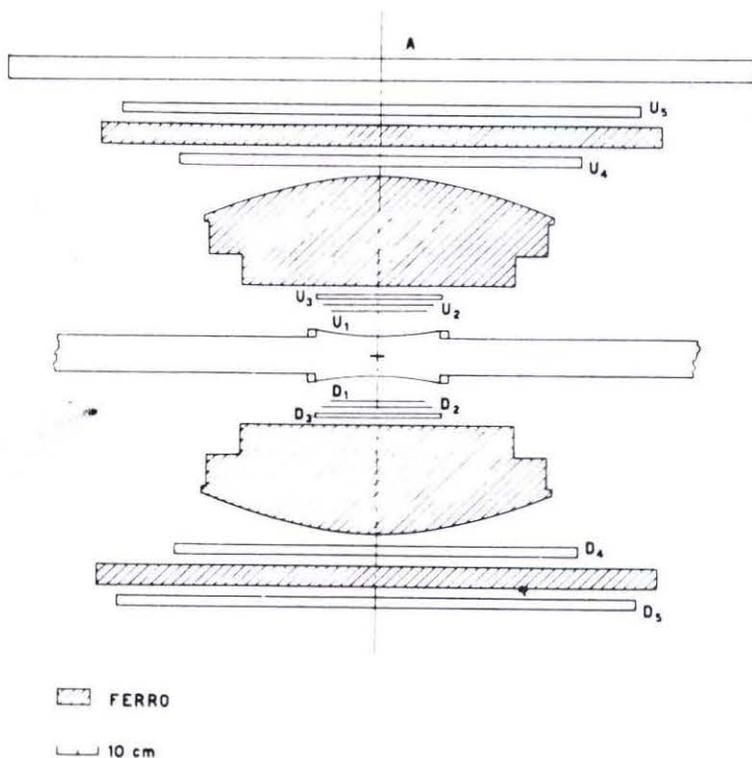


Fig. 4. — L'apparato sperimentale.

nell'introduzione, la produzione di coppie $\mu^+ \mu^-$ nell'urto elettrone-positrone avviene per lo più attraverso il processo dominante di Fig. 5-a.

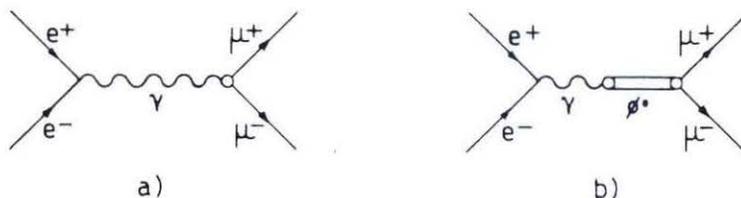


Fig. 5. — Produzione di coppie $\mu^+ \mu^-$: (a) processo usuale, (b) contributo al processo di produzione dovuto al decadimento $\Phi^0 \rightarrow \mu^+ + \mu^-$.

Allorchè l'energia $2E$ del γ virtuale coincide con la massa della Φ^0 , anche il processo di Fig. 5-b contribuisce, e il suo contributo è tanto maggiore quanto più grande è la probabilità del decadimento elettromagnetico della Φ^0 in una

coppia di mesoni μ . Le ampiezze dei due processi si sommano e si prevede che la velocità di conteggio delle coppie $\mu^+ \mu^-$ presenti, al variare della energia E della macchina, l'andamento tipico di Fig. 6 (si veda GATTO, 1963). La variazione percentuale della sezione d'urto, allorchè si passa attraverso l'energia della Φ^0 , dà una misura diretta della probabilità del decadimento $\Phi^0 \rightarrow \mu^+ \mu^-$.

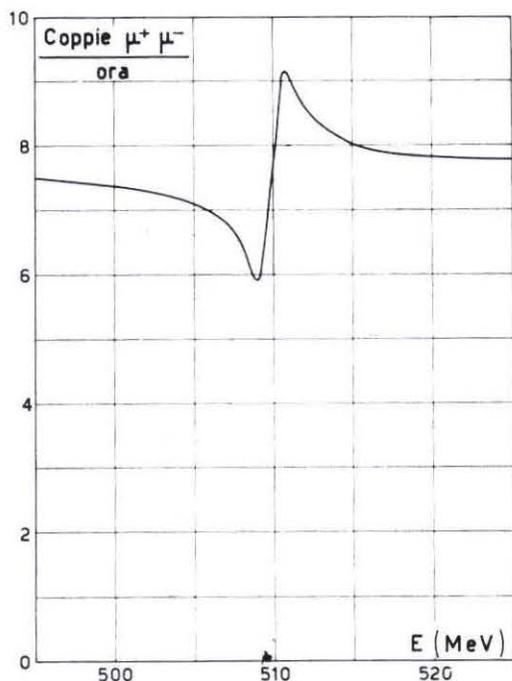


Fig. 6. — La velocità di conteggio di coppie $\mu^+ \mu^-$ in funzione dell'energia della macchina: l'andamento è determinato dalla somma dei contributi di Fig. 5.

Nell'apparato di Fig. 4 i mesoni μ^+ e μ^- prodotti nella zona di interazione vengono rivelati nei contatori U_3 e D_3 , rallentati negli assorbitori di ferro sagomati e rivelati nuovamente nei contatori U_4 e D_4 . I contatori U_5 e D_5 , posti in anticoincidenza, impongono le condizioni che entrambi i mesoni μ si fermino negli assorbitori di ferro di 5 cm di spessore posti tra U_1 - U_5 e D_1 - D_5 . Lo spessore degli assorbitori è stato determinato tenendo conto degli effetti dello « straggling » e della diffusione multipla mediante un apposito programma di Montecarlo scritto per l'elaboratore IBM 7040 (BIANCASTELLI & STEIN, 1966a).

Esistono altri possibili modi di decadimento della Φ^0 :

$$\Phi^0 \rightarrow K_1^0 K_2^0 \quad (2)$$

$$\Phi^0 \rightarrow \rho^0 \pi^0, \rho^\pm \pi^\mp \quad (3)$$

$$\Phi^0 \rightarrow \pi^0 \gamma \quad (4)$$

$$\Phi^0 \rightarrow \eta^0 \gamma \quad (5)$$

$$\Phi^0 \rightarrow \omega^0 \gamma \quad (6)$$

Tutti questi modi danno luogo alla produzione, diretta o indiretta, di gamma reali (per esempio attraverso il decadimento $K_1^0 \rightarrow 2\pi^0$ e $\pi^0 \rightarrow 2\gamma$). Si prevede di rivelare questi gamma per mezzo di due contatori di Cerenkov di vetro al piombo i cui assi formano un angolo di 90° con la direzione dei fasci collidenti. BIANCASTELLI & STEIN (1966b) hanno mostrato che dallo spettro dei raggi γ nei contatori è possibile ricavare la probabilità del decadimento (3), attualmente molto mal nota, facendo uso della misura contemporanea delle coppie $K^+ K^-$. È inoltre possibile ottenere informazioni sul decadimento (5), mai osservato, e porre un limite superiore dell'ordine di qualche per cento alla probabilità relativa del decadimento (6), che viola una legge di simmetria la cui validità è stata recentemente messa in dubbio (BERNSTEIN, FEINBERG & LEE, 1965): la simmetria per coniugazione di carica. Il decadimento (4) non può invece essere osservato, mentre sul decadimento (2), già noto, non si ricavano informazioni nuove.

ANALISI DEI PROCESSI ELETTRODINAMICI

Come si è detto nell'Introduzione, Adone è strumento unico non solo per lo studio dei processi adronici rappresentati graficamente in Fig. 1, ma anche per il controllo della validità dell'elettrodinamica quantistica per processi in cui compaiono soltanto elettroni, mesoni μ e gamma e che non sono ancora stati studiati, o che lo sono stati soltanto ad energie più basse.

I più semplici processi elettrodinamici che si possono studiare con Adone sono:

$$e^+ + e^- \rightarrow e^+ + e^- , \quad (7)$$

$$e^+ + e^- \rightarrow \gamma + \gamma , \quad (8)$$

$$e^+ + e^- \rightarrow \mu^+ + \mu^- . \quad (9)$$

Il problema discusso e risolto da AMALDI JR., BIANCASTELLI & STEIN (1966a) può così porsi: con che precisione è possibile controllare la validità della elettrodinamica quantistica studiando ad Adone con la luminosità di progetto (1) ciascuno dei tre processi (7), (8) e (9) mediante un apparato di dimensioni « ragionevoli » per un tempo di misura di 150 ore? La risposta a questa domanda è stata ottenuta applicando, sull'elaboratore IBM 7040, il metodo di Montecarlo alla costruzione di un gran numero di esperimenti fittizi nei quali si suppone che valga la elettrodinamica quantistica, e successivamente analizzando, sempre sull'elaboratore, le esperienze costruite in modo da ricavare il limite inferiore posto da ciascuna di esse sulla distanza λ al disopra della quale vale l'elettrodinamica quantistica. Per spiegare il significato di questa distanza λ si può dire in modo grossolano che scopo delle esperienze di elettrodinamica è il controllo della validità della legge di Coulomb, che dice che le forze elettriche diminuiscono come l'inverso del quadrato della distanza: in ogni esperienza questo controllo può spingersi fino a una

certa distanza λ e più λ è piccola tanto migliore è l'esperienza. Il valore di λ dipende dal processo e dalla energia a cui si lavora: nell'analisi fatta si è tenuto conto, oltre che degli effetti delle fluttuazioni statistiche, anche dei possibili errori sistematici di misura.

Possiamo molto brevemente riassumere le molte informazioni ottenute da questo calcolo riportando nella Tab. 1 i limiti inferiori per la distanza λ che si ricavano a diverse energie E per i tre processi tenendo conto dei soli errori statistici. L'unità di misura impiegata per λ è il Fermi, pari a 10^{-13} cm; a scopo di confronto ricordiamo che il diametro di un protone è dell'ordine di 1 Fermi.

TABELLA 1

Limiti posti sulla distanza λ a cui ancora vale l'elettrodinamica quantistica (unità 10^{-13} cm).

E (MeV)	processo		
	$e^+ e^-$	$\gamma \gamma$	$\mu^+ \mu^-$
500	0,023	0,048	0,029
1000	0,015	0,030	0,015
1500	0,011	0,021	0,011

Si ricava dalla Tab. 1 che i limiti che le tre esperienze possono porre su λ sono tutti estremamente piccoli, si tratta cioè di esperienze molto sensibili alla eventuale non validità della elettrodinamica quantistica. Si vede inoltre che i limiti posti dalla esperienza di annichilazione in due gamma reali dà limiti più alti, cioè è meno sensibile, della diffusione elastica $e^+ e^-$ e della produzione di coppie $\mu^+ \mu^-$. È però necessario sottolineare che ciò non significa affatto che lo studio del processo (8) è superfluo, perchè i limiti riportati in Tab. 1 riguardano delle distanze che hanno in realtà significati fisici diversi nei diversi processi, per quanto ciò non appaia nella semplice spiegazione del significato di λ che fa uso della validità della legge di Coulomb.

LA DIFFUSIONE ELASTICA ELETTRONE-POSITONE

Nell'analisi statistica discussa nel paragrafo precedente si è fatta l'ipotesi che l'apparato non fosse in grado di distinguere nello stato finale le cariche positive dalle cariche negative. Per ciò che riguarda il processo (7) di diffusione elastica tale distinzione permette di ricavare informazioni molto più dettagliate; infatti in questo caso è possibile separare il contributo del processo di Fig. 1, che va attraverso un gamma virtuale, dal contributo analogo alla diffusione elastica elettrone-elettrone, che non dà luogo ad anni-

chilazione. AMALDI JR., BIANCASTELLI & STEIN (1966b) hanno quindi preso in esame una esperienza di diffusione elastica elettrone-positone il cui apparato, contenendo campi magnetici, permette la separazione di questi due contributi. A questo riguardo un tipo nuovo di magnete deflettore è stato proposto.

L'esperienza non è stata ancora studiata nei dettagli, dato che seguirà nel tempo lo studio delle proprietà della risonanza Φ^0 , ma è comunque provata la sua fattibilità con l'impiego di campi magnetici relativamente deboli e di tecniche ormai usuali di camere a scintilla.

Riassunto. — Nelle macchine acceleratrici a fasci collidenti è possibile ottenere elevate energie nel sistema del baricentro delle particelle che interagiscono. Inoltre l'uso di fasci di elettroni e positoni permette la produzione predominante di sistemi di particelle soggette a interazioni forti (adroni) che hanno i numeri quantici di un quanto gamma. Dopo una breve descrizione di Adone, la macchina italiana a fasci collidenti di elettroni e positoni di energia $E \leq 1500$ MeV attualmente in costruzione, si presenta il lavoro fatto dal gruppo Alte Energie dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità nel corso della scelta e del progetto di esperienza da eseguire a questa macchina di nuovo tipo. Lo studio della risonanza Φ , caratterizzata da una massa di 1020 MeV, si ripromette la determinazione della costante di accoppiamento $\gamma\text{-}\Phi$ e della probabilità di decadimento $\Phi \rightarrow \mu^+ \mu^-$, $\Phi \rightarrow \rho\pi$, $\Phi \rightarrow \gamma\gamma$; si pensa inoltre di porre un limite superiore al decadimento $\Phi \rightarrow \omega\gamma$, che viola la simmetria delle interazioni elettromagnetiche sotto coniugazione di carica. In connessione con lo studio dei processi elettrodinamici sono stati analizzati, mediante un metodo di Montecarlo, i tre processi ($e^+ + e^-$), ($\mu^+ + \mu^-$) e ($\gamma + \gamma$), per ricavare quali sono i limiti che ciascuno di essi pone, con una esperienza «ragionevole», alla validità della elettrodinamica quantistica. Infine si è compiuto uno studio preliminare di una esperienza di diffusione elastica $e^+ + e^- \rightarrow e^+ + e^-$ nella quale, distinguendo il segno delle cariche finali mediante campi magnetici, si possono separare i due maggiori contributi del processo: il grafico di Fig. 1, che ha come stato intermedio un solo quanto gamma, e il grafico che contribuisce alla diffusione elastica elettrone-elettrone.

Summary (*A line of research for Adone, the Italian electron-positron colliding beam machine*). — In colliding beam machines, high energies in the center of mass system of the interacting particles are obtained. Moreover if electron and positron beams are stored, the final states containing strong interacting particles are predominantly produced through the process graphically represented in Fig. 1; thus the final state has the quantum number of a single gamma. Other intermediate states contribute to the production of electromagnetic particles (electrons, μ mesons and gamma). However,

these contributions can be computed using quantum electrodynamics (q.e.d.) which has been verified at lower energies. Thus a comparison with the experimental results enables one to check the validity of q.e.d. to higher energies that is, for the indetermination principle, to smaller distances.

The plan of Adone, the Italian electron-positron colliding beam machine, is shown in Fig. 2 (AMMAN *et al.*, 1962). Eq. (1) gives the project luminosity L ; multiplying L by the cross reaction of the process the number of events per hour in the total solid angle is obtained.

The High Energy group of the Physics Laboratory of the Istituto Superiore di Sanità has proposed at the Symposium held in Frascati in February 1966 a study of the Φ resonance (mass = 1020 MeV) (AMALDI, BIANCASTELLI & STEIN, 1966c). One of the purposes is the determination of the γ - Φ coupling constant through the measurement of the production of $K^+ K^-$ pairs (see Fig. 3). In the apparatus (Fig. 4) counters U_1, U_2, U_3, D_1, D_2 and D_3 will detect the K mesons; the expected rate is 170 per hour. Simultaneously counters U_3, U_4, U_5, D_3, D_4 and D_5 will recognize $\mu^+ \mu^-$ pairs; due to the existence of the Φ two amplitudes contribute to this process (Fig. 5) and the counting rate is expected to vary as a function of machine energy E as it is shown in Fig. 6 (GATTO, 1963). The probability of the decay $\Phi \rightarrow \mu^+ \mu^-$ can thus be measured. Using glass Cerenkov counters the γ rays coming from the decays of Eq. (2)... (6) can be detected. The following information can then be obtained: the probability of the decays $\Phi \rightarrow \rho\pi$ and $\Phi \rightarrow \eta\gamma$ and an upper limit on the C-nonconserving $\Phi \rightarrow \omega\gamma$ decay (BERNSTEIN, FEINBERG & LEE, 1965).

The following problem has also been discussed and solved by means of a Montecarlo computation on the IBM 7040 computer (AMALDI, BIANCASTELLI & STEIN, 1966a): which is the limit that each of the three electro-dynamical processes (7), (8) and (9) studied with a « reasonable » apparatus can put on the distance λ , which measure the validity of q.e.d.? Roughly λ can be interpreted as the distance at which the inverse square dependence upon the distance of the Coulomb law is still valid. Table 1 contains a short summary of the results obtained; λ is measured in Fermi ($1 F = 10^{-13}$ cm).

Finally a study of a possible experiment of elastic scattering $e^+ + e^- \rightarrow e^+ + e^-$ with recognition of the final charges has been made (AMALDI, BIANCASTELLI & STEIN, 1966b); the main point of the experiment lies in the distinction between the annihilation contribution, of the type of Fig. 1, and the scattering contribution, which appears also in electron-electron scattering.

Il gruppo ha tratto beneficio da numerose discussioni avute con il Dr. L. Maiani sugli aspetti teorici dei problemi sollevati durante il lavoro qui esposto.

24 ottobre 1966.

BIBLIOGRAFIA

- AMALDI, U., Jr., A. DEGASPERIS & P. STEIN, 1965. A Proposal for the Investigation of the Φ Resonance Using Adone. *Rapporti Lab. Fisica Ist. Super. Sanità*, ISS 65/48.
- AMALDI, U., Jr., R. BIANCASTELLI & P. STEIN, 1966a. A Statistical Analysis of the Limit of the Breakdown of Quantum Electrodynamics Attainable with Electron-Positron Colliding Beam Machines. *Rapporti Lab. Fisica Ist. Super. Sanità*, ISS 66/1.
- AMALDI, U., Jr., R. BIANCASTELLI & P. STEIN, 1966 b. Preliminary Study of an Elastic Scattering Experiment to be Performed at Adone. *Rapporti Lab. Fisica Ist. Super. Sanità*, ISS 66/2.
- AMALDI, U., Jr., R. BIANCASTELLI & P. STEIN, 1966c. A Study Using Adone of the Φ Resonance Through its $K^+ K^-$, $\mu^+ \mu^-$ and Neutral Decays. *Proc. Intern. Symposium on Electron and Positron Storage Rings*, Saclay, 26-30 ottobre 1966. (In corso di pubblicazione).
- AMMAN, F., M. BASSETTI, M. BERNARDINI, G. F. CORAZZA, L. MANGO, A. MASSAROTTI, C. PELLEGRINI, M. PLACIDI, M. PUGLISI & F. TAZZIOLI, 1962. Gli anelli di accumulazione per elettroni e positoni da alta energia in progetto presso i Laboratori Nazionali di Frascati. *Ric. Sci.*, **32** (1), 197-223.
- BERNARDINI, C., U. BIZZARRI, C. F. CORAZZA, G. GHIGO, R. QUERZOLI & B. TOUSCHEK, 1962. Progress report on AdA (Frascati Storage Rings). *Nuovo Cimento*, **23**, 202-207.
- BERNSTEIN, J., G. FEINBERG & T. D. LEE, 1965. Possible C, T non invariance in the electromagnetic interaction. *Phys. Rev.*, **139**, B 1650.
- BIANCASTELLI, R. & P. STEIN, 1966a. A Montecarlo Computation of Multiple Scattering Effects. *Rapporti Lab. Fisica Ist. Super. Sanità*, ISS 66/26.
- BIANCASTELLI, R. & P. STEIN, 1966b. Possible Observation of Photon-Producing Decay Modes of the Φ . *Rapporti Lab. Fisica Ist. Super. Sanità* (In corso di pubblicazione).
- GATTO, R., 1963. Effects of Virtual Vector Mesons in $e^+ e^-$ Collisions. *Nuovo Cimento*, **28**, 658-663.

ANNA REALE SCAFATI

Studi sulla soppressione fenotipica da streptomicina in mutanti *amber* del fago T₄

Hanno collaborato a queste ricerche il Dr. GIUSEPPE VISICATO (ospite dei Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità), per una parte delle esperienze, ed i sigg. MARIO ARACO e PIERO SAVINI (Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità) per l'assistenza tecnica.

Le ricerche oggetto del presente lavoro sono state iniziate presso il *Laboratoire de Biophysique* di Ginevra diretto dal prof. E. Kellenberger, che si desidera ringraziare.

Il lavoro è stato eseguito nel quadro dell'attività promossa e finanziata dal Consiglio Nazionale delle Ricerche presso i Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità.

PREMESSA STORICA

Nel 1964 è apparsa nella letteratura scientifica specializzata in biologia molecolare, tutta una serie di pubblicazioni, che hanno messo in luce nuovi aspetti dell'azione biologica della streptomicina, un antibiotico già abbastanza studiato anche a livello molecolare, ad esempio per quanto riguarda la sua capacità di inibire la sintesi proteica negli estratti di cellule batteriche *in vitro*.

Alcuni esperimenti precedenti (ANAND & DAVIS, 1960; DUBIN & DAVIS, 1961) avevano anche mostrato che la streptomicina provoca nei batteri sensibili un'alterazione della membrana cellulare, con conseguente perdita di prodotti metabolici.

Era inoltre noto che la curva di incorporazione della streptomicina C¹⁴ presenta un andamento bifasico, con un'incorporazione iniziale praticamente istantanea, ed una secondaria più lenta e quantitativamente più importante (DAVIS & ARMITAGE, 1960); quest'ultima è inibita in presenza di cloranfenicolo, in quanto richiede la crescita per manifestarsi, così come la richiede, d'altronde, la stessa azione antibatterica dell'antibiotico, a cui sono immuni le cellule in presenza di cloranfenicolo.

Il 95 % della streptomicina si incorpora in una frazione citoplasmatica (HANCOCK, 1961) successivamente identificata come ribosomi. Si sapeva inoltre che, per quanto riguarda il comportamento nei confronti della streptomicina, si possono isolare delle cellule mutanti spontanee, resistenti all'azione dell'antibiotico anche ad alte dosi, ed altre dipendenti da esso per la

loro crescita. I due tipi di mutazioni interessano *loci* genetici strettamente legati o, addirittura, coincidenti (DEMEREK *et al.*, 1949; NEWCOMBE & NUHOLM, 1950; LENNOX, 1955; HASHIMOTO, 1960).

Successivamente SPOTTS & STANIER (1961), sulla base di tali evidenze e dei loro studi su cellule streptomicina-dipendenti, avanzarono per primi l'ipotesi che il sito primario dell'azione della streptomicina all'interno delle cellule siano i ribosomi. La morte delle cellule sensibili sarebbe dovuta ad un'elevata affinità dei relativi ribosomi per la streptomicina, la loro combinazione con la quale renderebbe impossibile l'attaccamento dell'RNA messaggero impedendo così la sintesi proteica. I ribosomi delle cellule resistenti, invece, avrebbero una struttura tale da non combinarsi affatto con la streptomicina, senza alcuna conseguente interferenza, quindi, con l'attaccamento dell'RNA messaggero. Infine, nelle cellule dipendenti dalla streptomicina, i ribosomi avrebbero subito per mutazione qualche modificazione tale da ridurre la loro normale affinità all'RNA messaggero, che però potrebbe essere ripristinata se i ribosomi sono attivati dalla streptomicina.

Quest'ipotesi incontrò subito il favore generale, anche perchè, negli anni successivi, si vennero accumulando altre evidenze sperimentali, che dimostravano una caratteristica pleiotropia delle mutazioni del gene determinante il comportamento delle cellule in presenza di streptomicina, pleiotropia giustificata nel caso che le mutazioni concernessero la struttura dei ribosomi, implicati direttamente nella sintesi delle proteine e quindi praticamente nei più diversi processi cellulari.

Infatti, si era notata una interferenza della mutazione a streptomicina-resistenza anche con fenomeni apparentemente non correlati, come ad esempio la capacità di accettare o degradare il DNA del fago λ da parte di batteri *Escherichia coli* K12 lisogeni per il profago P1 (THOMAS & LAMBERT, 1962) o la funzione di vari soppressori genetici, soppressori di mutazioni batteriche *gal*⁻ (LEDERBERG, CAVALLI-SFORZA & LEADERBERG, 1964), e di mutazioni fagiche (λ *sus*) (COUTURIER, DESMET & THOMAS, 1964).

A questo punto, nel 1964, una serie di lavori da parte del gruppo di Gorini e dei suoi collaboratori (GORINI & KATAJA, 1964 *a*; *b*; DAVIES, GILBERT & GORINI, 1964), mise in luce un aspetto nuovo del problema per altro già osservato da altri sperimentatori (p. es. LEADERBERG, CAVALLI-SFORZA & LEADERBERG, 1964).

Essi hanno messo in evidenza, infatti, l'esistenza di un meccanismo di soppressione attivato dalla streptomicina, o in altre parole la possibilità di correggere fenotipicamente, in presenza di streptomicina, una mutazione genetica.

Il fenomeno da essi osservato su alcuni batteri *Escherichia coli*, auxotrofi per arginina e streptomicina-resistenti, consisteva nel fatto che tali cellule ordinariamente incapaci di crescere su terreno minimo privo di argi-

nina crescevano, invece, e si dimostravano capaci di sintetizzare l'amminoacido a partire da terreno minimo, purchè in questo fosse stata aggiunta della streptomicina. La presenza di quest'ultimo dunque aveva sui mutanti richiedenti arginina l'effetto di sopprimere la manifestazione di tale mutazione (soppressione fenotipica o reversione della mutazione).

Parallelamente a questi esperimenti *in vivo*, altri ad opera dello stesso gruppo, sono stati compiuti su sistemi *in vitro* (*cell-free*) in cui si studia l'incorporazione, in catene polipeptidiche, di amminoacidi marcati in presenza di un polinucleotide sintetico funzionante da RNA messaggero. Era già noto, come abbiamo precedentemente menzionato, che la streptomicina inibisce su ribosomi sensibili la sintesi proteica bloccando l'incorporazione dell'amminoacido normalmente codificato, ad esempio da poli-U, ma si osservò allora che essa provoca parallelamente anche una stimolazione della incorporazione di amminoacidi diversi (*miscoding*).

Se il sistema *cell-free* utilizza ribosomi estratti da cellule streptomycin-resistenti il *miscoding* è decisamente più basso (ANDERSON, GORINI & BRECKENRIDGE, 1965). Che la sensibilità a streptomycin risieda nei ribosomi, ed in particolare nella subunità ribosomica usualmente caratterizzata come avente un coefficiente di sedimentazione di 30S è stato poi dimostrato da lavori di DAVIES (1964) e di COX, WHITE & FLAKS (1964). Essi hanno potuto ottenere dei ribosomi attivi per la sintesi proteica ibridi e cioè formati dalla unione di una subunità da 30S sensibile a streptomycin e una di 50S resistente, e viceversa, ed hanno osservato su questi che l'ibrido 30S resistente-50S sensibile è resistente, mentre 30S sensibile-50S resistente è sensibile.

Mettendo insieme i risultati *in vivo* e *in vitro*, il gruppo di Gorini ha proposto un'interpretazione sia della azione letale della streptomycin, che dell'effetto di reversione, basata appunto sul *miscoding*. Un elevato livello di errore nell'incorporazione di amminoacidi nella catena polipeptidica, provocherebbe nelle cellule streptomycin-sensibili un accumularsi di proteine non funzionali e quindi la morte. Viceversa la moderata entità del fenomeno sulle cellule streptomycin resistenti potrebbe essere non importante per la normale fisiologia delle cellule stesse, ma giusto sufficiente per correggere anche solo parzialmente l'effetto di una mutazione per *sostituzione* di base.

In altre parole gli errori prodotti dalla presenza della streptomycin, possono a caso, cancellare, all'atto della sintesi proteica, l'effetto dell'errore codificato, nel DNA.

Evidentemente, inoltre, questa correzione riguarda unicamente la sintesi proteica, senza influire in nessun modo sulla duplicazione del DNA, che avviene per altra via direttamente sul DNA parentale, e quindi senza modificare la trasmissione alla discendenza della mutazione genetica.

Si spiega con questo modello anche la reversione fenotipica che si trova (GORINI & KATAJA, 1965) a dosi piccole e subletali di streptomycin anche

nelle cellule sensibili. Queste dosi infatti sono sufficienti per avere la reversione attraverso un meccanismo di *miscoding*, senza che l'effetto risulti letale per eccesso di errori.

In che modo poi la streptomicina eserciterebbe questa funzione, e quale sia il ruolo giuocato dalla subunità ribosomica da 30S, non è a tutt'oggi ben chiaro. Alcuni esperimenti di PESTKA (1965) tendono a dimostrare che la streptomicina modifica la capacità da parte dell'RNA solubile di riconoscere le triplette o « codoni » dell'RNA messaggero, alterando la formazione del complesso tripletta-ribosoma-amminoacil-sRNA, almeno in esperimenti *in vitro* nei quali veniva usato come messaggero un polinucleotide sintetico.

Viceversa un lavoro, apparso recentemente, di STERN *et al.* (1966), tenderebbe a ridurre l'importanza dell'azione diretta della streptomicina sui ribosomi, e dell'accumularsi di proteine non funzionali come causa dell'effetto letale della streptomicina stessa, in quanto, in condizioni in cui la sintesi proteica è bloccata, si ha tuttavia un marcato effetto conseguente all'esposizione alla streptomicina delle cellule sensibili, nella forma di una stimolazione della sintesi dell'RNA, probabilmente dell'RNA messaggero.

In tale quadro la correzione di un errore genetico potrebbe interpretarsi come dovuta a sintesi di RNA messaggero anomalo per effetto della streptomicina. Questo RNA anomalo potrebbe esso stesso portare degli errori di trascrizione come pure potrebbe attaccarsi in maniera irregolare ai ribosomi. Il risultato finale sarebbe comunque lo stesso.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI SPERIMENTALI

Il nostro gruppo ha compiuto, negli ultimi anni, alcuni studi sul fenomeno della reversione fenotipica da streptomicina, osservato praticamente per caso, sino dal 1963, sul sistema dei mutanti « *amber* » del fago T₄, attivo su *Escherichia coli*.

Ricordiamo brevemente che i fagi *amber* sono una serie di mutanti del fago T₄ isolati da R. H. Epstein e collaboratori (EISTEIN *et al.*, 1963) e definiti in base all'attività litica su due diversi ceppi di *E. coli*, uno permissivo, CR 63 (*E. coli* K12) e l'altro non permissivo, S/6 (*E. coli* B). Essi danno aree litiche su CR 63 ma non su S/6, mentre il tipo selvaggio del T₄ dà aree litiche su entrambi.

Uno studio approfondito di ciò che avviene se un fago *amber* infetta un ceppo non permissivo, ha mostrato che non si ha progenie attiva (altro che con una probabilità dell'ordine di 10⁻⁴ fagi per batterio infettato), e che ciò è dovuto ad un blocco di una delle funzioni essenziali dello sviluppo fagico e, in termini molecolari, alla sintesi di proteine incomplete e non funzionali. Precisamente, la catena peptidica si interrompe, in corrispondenza alla mutazione *amber* sul DNA.

Sono note anche altre classi di mutanti fagici ambivalenti, come i mutanti soppressore-sensibili λ *sus* del fago λ (CAMPBELL, 1961), il sottogruppo ambivalente dei mutanti rII del T₄ di BENZER & CHAMPE (1961), i mutanti « ochre » (BRENNER & BECKWITH, 1965) e alcuni mutanti « host dependent » del fago a RNA f2 (VALENTINE & ZINDER, 1964). Ricordiamo inoltre che per tutti questi sistemi oltre che per altre mutazioni ambivalenti batteriche, è possibile definire uno o più geni « soppressori », la cui presenza in un determinato stato, indicato come su^+ , nella cellula ospite, determina la sua permissività al fago ambivalente, mentre lo stato su^- corrisponde alla non permissività. In queste ultime circostanze, la mutazione portata dal fago si manifesta come letale, in quanto il fago infettante l'ospite non dà progenie attiva, mentre una cellula su^+ può, all'atto della sintesi delle proteine fagiche, correggere l'effetto della mutazione con un meccanismo di soppressione fenotipica il cui risultato è analogo a quello realizzato dalla streptomicina, anche se il meccanismo stesso può essere diverso.

In questo caso si ha infatti, almeno per qualche soppressore, buona evidenza sperimentale per affermare che la correzione dell'errore è dovuta alla presenza, in una cellula su^+ , di una classe di RNA solubile tale che può inserire un amminoacido opportuno in corrispondenza della tripletta sul DNA che ha subito la mutazione, in modo che la proteina prodotta risulti funzionale, anche se con efficienza più o meno ridotta.

Non vogliamo tuttavia qui discutere il fenomeno della soppressione. Vari Autori (VALENTINE & ZINDER, 1964; ORIAS & GARTNER, 1966) hanno messo in evidenza l'esistenza di una soppressione fenotipica da streptomicina in alcuni di tali sistemi di mutanti fagici ambivalenti. Ciò significa che una cellula può, in presenza di streptomicina, dar luogo a progenie fagica attiva se infettata con un fago che porta sul suo DNA una mutazione soppressore-sensibile, anche se la cellula stessa non porta il gene su^+ .

Nel caso dei mutanti *amber* ciò è stato osservato su vari ceppi non permissivi, ed in particolare sul ceppo 14a, un *E. coli* K12 resistente a streptomicina ed su^- .

Per un mutante *amber* (*am*) ed un ceppo non permissivo (su^-), si può definire in generale un coefficiente di trasmissione, TC, come la frazione di batteri su^- infettati, capaci di produrre almeno un fago maturo, che cioè costituiscano un centro litico sul ceppo indicatore:

$$TC = \frac{N_c}{N_B}$$

Tale frazione è ovviamente uguale ad 1 (o può talvolta essere un po' minore di 1) per il T₄ selvaggio, mentre per i diversi *amber* è di circa 10⁻⁴. In presenza di streptomicina questo numero può aumentare di un fattore 10²-10⁴, arrivando a valori del 10% e più, del tipo selvaggio, tuttavia la re-

versione da streptomycina non arriva praticamente mai al 100 %. Si può misurare naturalmente anche il rendimento in fagi, per cellula, o *burst size* (volume di scoppio): questo può essere definito in due modi, o come rapporto tra numero totale di fagi maturi prodotti diviso il numero di batteri infettati (\overline{BS}), o come numero medio di fagi prodotti per centro infettivo (BS^*):

$$\overline{BS} = \frac{N}{N_B} \qquad BS^* = \frac{N}{N_c}$$

Si vede subito che $\overline{BS} = BS^*/TC$, e che $BS \approx \overline{BS}^*$ per il tipo selvaggio. L'entità della reversione da streptomycina può essere misurata dal rapporto dei valori di TC o di \overline{BS} (o di BS^*) con o senza streptomycina.

Un esperimento tipico per studiare l'azione della streptomycina su diversi mutanti fagici, consiste nel prelevare un campione di cultura batterica alla concentrazione di $\approx 10^8$ b/ml, ed infettarlo con fagi, a molteplicità 5-10, in modo che la frazione di batteri non infettati sia trascurabile, con o senza streptomycina, a concentrazioni variabili. Dopo un tempo sufficiente per l'infezione, si aggiunge antisiero per eliminare i fagi non adsorbiti, ed infine si misura il numero di centri infettivi (o di fagi prodotti dopo un tempo sufficiente per la lisi), piastrandolo con opportuno indicatore, generalmente CR 63 S^R .

Alcune prove preliminari sono servite per determinare la dipendenza del fenomeno da varie circostanze (età della cultura, pH dei terreni, concentrazione della streptomycina), per la scelta delle condizioni migliori di studio.

La Tab. 1, mostra i risultati per quanto riguarda la dipendenza dall'età della cultura batterica. Come si vede, l'azione della streptomycina tende ad

TABELLA 1.

Dipendenza della reversione dall'età della cultura batterica.

Mutante fagico	Fase esponenziale iniziale (10^7 b/ml)		Fase esponenziale (10^8 b/ml)		Fase di saturazione (10^9 b/ml)	
	TC	BS^*	TC	BS^*	TC	BS^*
am ⁺	0,97	270	0,90	145	0,61	32
am N122	$2,34 \cdot 10^{-4}$	8,8	$2,6 \cdot 10^{-4}$	3,9	$3,7 \cdot 10^{-4}$	1,8
am N122 + Sm	0,23	13,0	0,25	3,4	$6,0 \cdot 10^{-4}$	1,1
am N52	$1,3 \cdot 10^{-4}$	5,1	$4,7 \cdot 10^{-4}$	4,7	$4,5 \cdot 10^{-5}$	1,0
am N52 + Sm .	0,14	10,2	0,25	9,0	$5,8 \cdot 10^{-5}$	1,0

N. B. — BS^* è il rendimento in fagi per centro litico (*burst size*). TC è il coefficiente di trasmissione o frazione di batteri infettati che danno almeno un fago attivo nella progenie. Il simbolo + Sm indica che l'infezione è stata fatta in presenza di streptomycina (Sm).

essere nulla per batteri in fase di saturazione, e ciò in accordo col fatto che anche la stessa azione letale della streptomicina richiede che il metabolismo cellulare sia attivo.

Per quanto riguarda la dipendenza dal pH, sono state fatte prove a pH 6, 7, 8 dei terreni. A parte il fatto che un pH elevato riduce anche da solo i valori sia di TC che di BS* anche per il tipo selvaggio, sembra che la reversione aumenti leggermente (al più di un fattore 5) all'aumentare del pH, mentre corrispondentemente aumenta pure l'effetto letale.

La Fig. 1 mostra la dipendenza dalla concentrazione di streptomicina della reversione misurata attraverso i valori di TC del mutante *am/B17*.

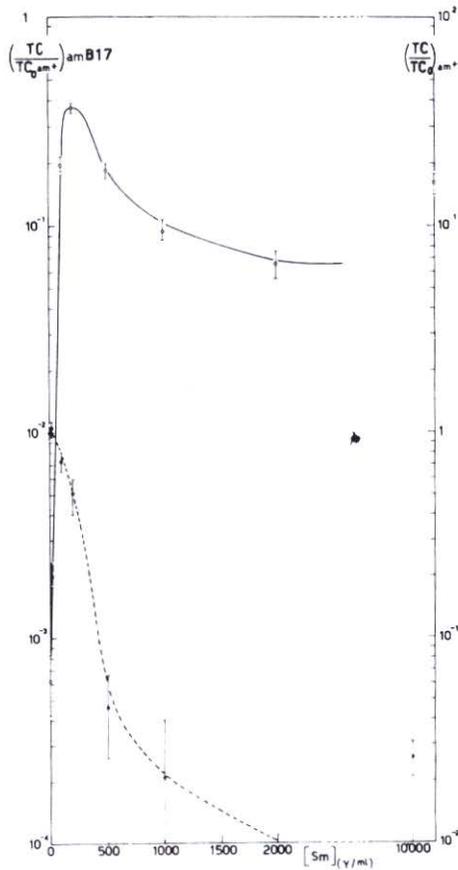


Fig. 1. — Viene riportata la reversione da streptomicina, espressa attraverso il coefficiente di trasmissione (TC) per il mutante *am B17* sul ceppo *su- 14a* (*Escherichia coli* K12), con e senza streptomicina. La curva a tratto continuo, corrispondente all'ordinata di sinistra, rappresenta i valori di TC per le diverse concentrazioni di streptomicina, riportate in ascisse, divisi per il valore TC₀, coefficiente di trasmissione del tipo selvaggio, in assenza di streptomicina. La curva tratteggiata, corrispondente alla ordinata di destra, rappresenta i valori di TC, alle diverse concentrazioni di streptomicina, per il tipo selvaggio, divisi per il valore TC₀.

La Fig. 2 riporta invece i valori di \overline{BS} , alle diverse concentrazioni, da 10 a 10.000 $\mu\text{g/ml}$ di streptomicina. Nelle due figure sono riportati anche i valori per il tipo selvaggio; si vede che per la reversione si ha un massimo intorno

ai 200 $\mu\text{g/ml}$, mentre l'azione letale, praticamente trascurabile fino a 100-200 $\mu\text{g/ml}$, va poi aumentando all'aumentare della dose. Se si riporta viceversa in grafico la reversione corretta per l'effetto letale, riportando cioè i valori, p. es., di BS per *am* B17 divisi per i valori di $\overline{\text{BS}}$ per *am*⁺ alle dosi corrispondenti, si trova una dipendenza lineare entro gli errori, cioè una curva del tipo « one hit »; nell'ipotesi proposta dai lavori del gruppo di Gorini e di altri,

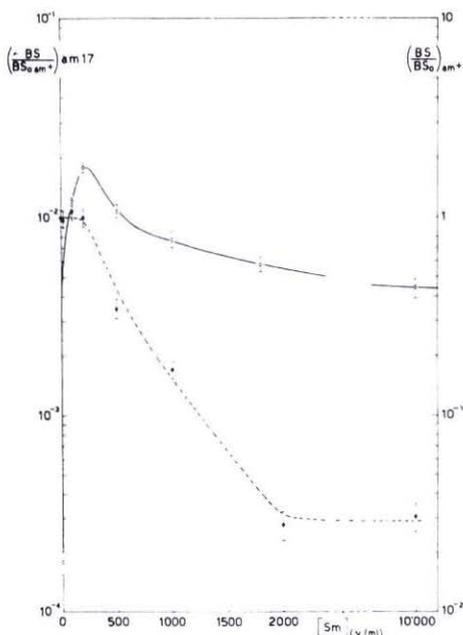


Fig. 2. — Viene riportata la reversione da streptomicina, espressa attraverso il valore del rendimento medio in fagi (BS) per il mutante *am* B17 sul ceppo *su*-14 a con e senza streptomicina. La linea a tratto continuo si riferisce alla ordinata di sinistra, e rappresenta i valori di $\overline{\text{BS}}$ alle diverse concentrazioni di streptomicina, divisi per il valore $\overline{\text{BS}}_0$ del tipo selvaggio senza streptomicina. La linea tratteggiata si riferisce alla ordinata di destra e rappresenta i valori di BS per il tipo selvaggio, divisi per $\overline{\text{BS}}_0$.

che la streptomicina svolga la sua azione legandosi ai ribosomi e modificandoli in qualche modo nei loro rapporti con l'RNA messaggero, questi risultati suggeriscono che basti a ciò una molecola di streptomicina per ribosoma.

Per quanto riguarda la specificità della reversione da streptomicina nei confronti delle diverse mutazioni *amber*, la Tab. 2 mostra che, almeno per i mutanti su cui si è provato, su tutti si è trovata una buona reversione; osserviamo che nella Tabella è riportato anche un confronto con la reversione fenotipica prodotta con diverso meccanismo da un analogo dell'uracile, il 5-fluorouracile (5 FU). Come si vede, la specificità della streptomicina, se pure esiste, è in ogni caso diversa da quella del 5 FU.

Si è tuttavia dimostrata l'esistenza di una specificità temporale dell'azione della streptomicina, nel senso che essa deve essere presente, per essere efficace per la reversione, nel momento in cui viene sintetizzata la proteina, la cui sintesi nel mutante è bloccata in un ospite *su*⁻.

Una mutazione *amber* può infatti avvenire in vari punti del genoma fagico e corrispondentemente bloccare la sintesi di varie proteine che possono essere sia le cosiddette « *early proteins* », e cioè gli enzimi che nella prima fase dello sviluppo del fago vengono sintetizzati preliminarmente alla duplicazione del DNA e richieste da questa, che al contrario le proteine « *late* », e cioè ad esempio i costituenti proteici dell'involucro del fago, che vengono sintetizzati soltanto più tardi.

TABELLA 2.

Reversione da streptomicina per diversi mutanti « *amber* », e confronto con la reversione da 5-fluorouracile (5 FU)

Mutante fagico	Coefficiente di trasmissione (TC)			Volume di scoppio (\overline{BS})			Reversione da 5FU
	senza Sm	con Sm	Rev. da Sm TC (+ SM) TC (- SM)	senza Sm	con Sm	Rev. da Sm $\frac{\overline{BS} (+ SM)}{\overline{BS} (- SM)}$	
am ⁺	0,60	0,45	0,75	180	135	0,75	
am16 (gene 7)	$7,3 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \cdot 10^{-1}$	$0,8 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^{-3}$	8	$1,6 \cdot 10^3$	+
am128 (gene 11)	$5,7 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-1}$	$1,9 \cdot 10^2$	$0,75 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-1}$	$2,3 \cdot 10^3$	+
am69 (gene 12)	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$6,0 \cdot 10^{-2}$	$4,3 \cdot 10^2$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-1}$	$0,58 \cdot 10^3$	—
am20 (gene 14)	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^{-1}$	$3,8 \cdot 10^3$	$0,9 \cdot 10^{-4}$	4,5	$4,6 \cdot 10^4$	+
am17 (gene 23)	$1,4 \cdot 10^{-4}$	0,71	$5,1 \cdot 10^3$	$8,7 \cdot 10^{-5}$	16,7	$1,9 \cdot 10^5$	+
am65 (gene 24)	$0,8 \cdot 10^{-4}$	$5,7 \cdot 10^{-4}$	7,1	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$	15	—
am58 (gene 34)	$0,83 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^2$	$0,88 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-2}$	$4 \cdot 10^2$	—
am52 (gene 37)	$2,0 \cdot 10^{-4}$	10^{-1}	$5 \cdot 10^2$	$0,8 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^2$	+
am122 (gene 42)	$0,6 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-1}$	$2,8 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^{-5}$	1,4	$4,8 \cdot 10^4$	+
am82 (gene 44)	$4,6 \cdot 10^{-4}$	$1,75 \cdot 10^{-1}$	$3,8 \cdot 10^2$	$0,94 \cdot 10^{-6}$	0,77	$8,2 \cdot 10^5$	+

N. B. — \overline{BS} è il rendimento totale per batterio infettato, TC ha la definizione della tabella precedente. (+ Sm) indica la presenza, (— Sm) l'assenza di streptomicina nell'esperimento.

In esperimenti in cui le cellule infettate venivano sottoposte all'azione della streptomicina per un breve periodo (« *pulse* ») corrispondente a fasi diverse dello sviluppo, si è visto che la fase in cui la presenza della streptomicina è efficace per la reversione è diversa per un mutante bloccato nelle « *early proteins* », o nelle « *late* ».

I risultati sono illustrati nella Fig. 3, per un mutante tipicamente « *early* » (*am N122*) ed uno tipicamente « *late* » (*am B17*). In questo esperimento la

streptomicina veniva aggiunta alla cultura batterica a tempi diversi, sia prima che dopo l'infezione, mentre in ogni caso dopo 15 min' dall'infezione, veniva tolta per diluizione. Non si adottava alcun particolare accorgimento per sincronizzare i tempi dello sviluppo fagico, mentre il tempo in cui i fagi venivano lasciati adsorbire prima dell'aggiunta di antisiero era di 7 minuti.

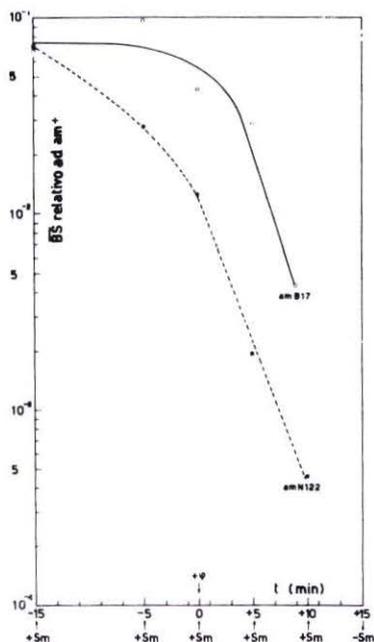


Fig. 3. — Si riportano i risultati di un'esperienza in cui la streptomicina (Sm) (200 $\mu\text{g/ml}$) veniva aggiunta alla cultura batterica, considerando $t = 0$ il momento dell'infezione con il fago, rispettivamente *am N122* (« early ») e *am B17* (« late ») per le due curve indicate. 15 min' dopo la infezione, tutti i campioni venivano diluiti 1 : 1000 in brodo senza streptomicina, e le diluizioni venivano incubate a 30°C e lisate dopo 100 min' con cloriformio per determinare il rendimento in fagi. Le due curve riportano i valori di BS relativamente al tipo selvaggio.

Si può anche in queste condizioni osservare che la cinetica dell'azione di reversione è nei due casi diversa; la reversione è ridotta al 2 % del massimo per *am N122* se la streptomicina è aggiunta dopo 5 minuti dall'infezione, mentre è ancora del 30 % per *am B17* nelle stesse condizioni.

Riportiamo infine alcuni risultati di natura diversa e analoghi ad altri precedentemente citati, sulla interferenza della mutazione a streptomicina-resistenza con i soppressori genetici. Il ceppo CR 63 è tipicamente *su+* per gli *amber*; a partire da esso sono stati isolati alcuni mutanti resistenti a streptomicina spontanei; di essi, alcuni sono diventati *su-*. In realtà, la Tab. 3 mostra che essi possono dividersi in tre classi: la prima ha conservato invariate le sue proprietà *su+* rispetto agli *amber*, la seconda è diventata *su-*, e la terza, si comporta come *su-* in assenza di streptomicina, come *su+* in presenza; benchè la soppressione in questo caso sia un po' meno efficiente.

TABELLA 3.

Interazioni tra mutazione Sm^R e soppressore su_I

Mutante fagico	CR63 sensibile	Ceppi batterici resistenti alla streptomicina (S ^R)					
		CR63 S ^{RA}		CR63 S ^{RB}		CR63 S ^{RC}	
		senza Sm	con Sm	senza Sm	con Sm	senza Sm	con Sm
		senza Sm	con Sm	senza Sm	con Sm	senza Sm	con Sm
am ⁺	+	+	+	+	+	+	+
am N456	+	+	+	—	—	(+)	(+)
am B24	+	+	+	—	—	(+)	(+)
am H21	+	+	+	—	—	(+)	(+)
am B17	+	+	+	—	—	—	(+)
am N52	+	+	+	—	—	—	(+)
am N122	+	+	+	—	—	—	(+)
am N82	+	+	+	—	—	—	(+)
am N133	+	+	+	—	—	—	—
Am N65	+	(+)	+	—	—	—	—

N. B. — I risultati della presente tabella sono ottenuti mediante *spot-test*, deponendo su di una piastra seminata con il ceppo batterico considerato ($\sim 2 \cdot 10^8$ batteri per piastra) una gocciolina in sospensione fagica a $\sim 2 \cdot 10^7$ fagi/ml con un'ansa. Se si ha in corrispondenza una zona litica chiara dopo incubazione, il ceppo viene considerato permissivo ed il risultato è indicato con +, se invece la zona rimane torbida il ceppo viene considerato non permissivo, ed il risultato viene indicato con —. Un (+) indica una zona litica meno evidente.

SVILUPPI SUCCESSIVI

I risultati finora esposti sono più o meno in accordo con il modello della azione della streptomicina proposto da Gorini, anche se non ne dimostrano in senso assoluto l'attendibilità. A questo proposito bisogna osservare che le misure di coefficiente di trasmissione o di « *burst size* », sono delle misure indirette e complessive della quantità e funzionalità delle proteine fagiche sintetizzate in determinate condizioni. L'evidenza sperimentale da noi ottenuta è tuttavia in contrasto con l'ipotesi alternativa che il processo primario responsabile dell'azione letale e della soppressione fenotipica della streptomicina siano da attribuirsi ad un accumularsi di RNA messaggero anomalo. Sembra infatti che quest'ultimo fenomeno si manifesti dopo un certo ritardo

(dell'ordine di 60-90 min), mentre la soppressione può manifestarsi, come dimostrano anche gli esperimenti di cinetica, nei pochi minuti necessari alla cellula per sintetizzare le proteine « *early* » del fago.

Per arrivare ad una più approfondita comprensione del fenomeno a livello molecolare sono necessari altri studi sia *in vivo* che *in vitro*.

In particolare alcuni Autori hanno tentato di mettere in rilievo alterazioni strutturali dei ribosomi, prodotte da una esposizione a streptomicina delle cellule sensibili (HERZOG, 1964) trovando una parziale inibizione della dissociazione dei ribosomi a basse concentrazioni di magnesio.

Altri studi si rivolgono viceversa alla possibilità di avere una soppressione fenotipica con altri antibiotici, o altre sostanze, e studiare le analogie di comportamento con la streptomicina.

La nostra linea di ricerca si propone di scendere a studi di dettaglio più fini dell'azione della streptomicina sui ribosomi, e delle interferenze tra il meccanismo di funzionamento della streptomicina e quello dei soppressori genetici.

Studi in tal senso sono già stati iniziati, come pure altre indagini sulle possibili condizioni fisiologiche in cui si può avere la soppressione fenotipica. Accenniamo qui soltanto al fatto che un certo livello di soppressione si può avere sottoponendo le cellule a particolari circostanze, come la carenza di un amminoacido necessario per la crescita, o la variazione della concentrazione di magnesio nel terreno di cultura.

Si ritiene che mettendo a confronto tali risultati *in vivo* con l'esame delle proprietà e della struttura dei ribosomi e delle altre specie macromolecolari che intervengono nella sintesi proteica, si possa fare maggior luce sul processo della soppressione delle mutazioni in generale.

Riassunte. — Si descrivono alcuni studi sulla soppressione fenotipica prodotta dalla streptomicina sul sistema dei mutanti *amber* del fago T_4 . Viene discussa la dipendenza del fenomeno dalle condizioni sperimentali, e la sua apparente aspecificità nei riguardi dei numerosi mutanti *amber* provati. Mediante esperimenti di cinetica, si è potuto mostrare che la streptomicina deve essere presente al momento della sintesi proteica e che, a seconda della proteina la cui sintesi è bloccata nel mutante, esiste una specificità temporale per la efficacia della reversione da streptomicina.

Summary (*Studies on streptomycin-induced phenotypic suppression in amber mutants of phage T_4*). — The phenotypic repair induced by streptomycin of mutant genotypes was first shown by GORINI & KATAJA (1964 a; b) and others (VALENTINE & ZINDER, 1964; ORIAS & GARTNER, 1966). The mechanism of action of this streptomycin-activated suppression, together with the mechanism of the lethal action on sensitive cells, is discussed in the

light of the miscoding determined *in vitro* by streptomycin (DAVIES, GILBERT & GORINI, 1964). This paper reports some results obtained on the phenotypic suppression by streptomycin, with the system of *amber* mutants of phage T₁ (EPSTEIN *et al.*, 1963). The dependence of the efficiency of suppression upon the experimental conditions is discussed. The dose of streptomycin which corresponds to a maximum repair efficiency is of 200 µg/ml (see Figs. 1, 2). All the various *amber* mutants tested respond to streptomycin suppression, in the absence of genetic suppressors. An interference has also been shown between Sm^S → Sm^R mutation and a genetic suppressor (see Table 3). A specificity in time for the streptomycin action is demonstrated by pulse experiments (see Fig. 3).

BIBLIOGRAFIA

- ANAND, N. & B. D. DAVIS, 1960. *Nature*, **185**, 22.
 ANAND, N., B. D. DAVIS & A. K. ARMITAGE, 1960. *Nature*, **185**, 22.
 ANDERSON, W. F., L. GORINI & L. BRECKENRIDGE, 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **54**, 1076.
 BENZER, S. & S. P. CHAMPE, 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **47**, 1025.
 BRENNER, S. & J. R. BECKWITH, 1965. *J. Mol. Biol.*, **13**, 629.
 CAMPBELL, A., 1961. *Virology*, **14**, 22.
 COUTURIER, M., L. DESMET & R. T. THOMAS, 1964. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 244.
 COX, E. C., J. R. WHITE & J. G. FLAKS, 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **51**, 703.
 DAVIES, J., W. GILBERT & L. GORINI, 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **51**, 883.
 DAVIES, J., 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **51**, 659.
 DEMEREC, M., B. WALLACE, E. M. WITKIN & G. BERTANI, 1949. *Carnegie Inst. Wash. Year-book*, **48**, 154.
 DUBIN, D. T. & B. D. DAVIES, 1964. *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 400.
 EPSTEIN, R. H., A. BOLLE, C. M. STEINBERG, E. KELLENBERGER, E. BOY DE LA TOUR, R. CHEVALLEY, R. S. EDGAR, M. SUSMAN, G. M. DENHART & A. LIELAUSIS, 1963. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 256.
 GORINI, L. & E. KATAJA, 1964 a. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **51**, 187.
 GORINI, L. & E. KATAJA, 1964 b. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **51**, 995.
 GORINI, L. & E. KATAJA, 1965. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **18**, 656.
 HANCOCK, R., 1961. *Biochem. J.*, **78**, 79.
 HASHIMOTO, K., 1960. *Genetics*, **45**, 49.
 HERZOG, A., 1964. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 172.
 LEDERBERG, E. M., L. L. CAVALLI-SFORZA & J. LEDERBERG, 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **51**, 678.
 LENNOX, E. S., 1955. *Virology*, **1**, 190.
 NEWCOMBE, H. B. & M. M. NUHOLM, 1950. *Genetics*, **35**, 603.
 PESTKA, S., R. MARSHALL & M. NIREMBERG, 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **53**, 639.
 ORIAS, E. & T. K. GARTNER, 1966. *J. Bacteriol.*, **91**, 2210.
 SPOTTS, C. R. & R. Y. STANIER, 1961. *Nature*, **192**, 633.
 STERN, J. L., H. D. BARNER & S. S. COHEN, 1966. *J. Mol. Biol.*, **17**, 188.
 THOMAS, R. & L. LAMBERT, 1962. *J. Mol. Biol.*, **5**, 373.
 VALENTINE, R. C. & N. D. ZINDER, 1964. *Science*, **144**, 1158.

RAPPORTO SUL LAVORO DEL GRUPPO DI RICERCA
SULLA FISICA DELLE RADIAZIONI

MARTA CREMONESE

Effetti della radiazione ultravioletta sul DNA *in vitro* e *in vivo*

Le ricerche sono state condotte da MARTA CREMONESE (Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità).

Alle esperienze sul DNA *in vivo* ha partecipato:

AMLETO CASTELLANI (Centro Studi Nucleari della Casaccia del CNEN).

Le ricerche si sono giovate della assistenza tecnica del Sig. ANTONIO ARACO (Laboratori di Fisica).

Questo lavoro è stato eseguito nel periodo 1965-66 nel quadro dell'attività svolta dai Laboratori di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità con l'appoggio del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

Un problema molto attuale e di grande interesse per il nostro laboratorio è quello dello studio degli effetti delle radiazioni sugli esseri viventi.

In questi ultimi anni agli studi di radiobiologia vera e propria si sono affiancati studi sempre più numerosi di fotobiologia, riguardanti in particolare i danni prodotti dalla radiazione ultravioletta su macromolecole di interesse biologico e su cellule viventi, specie da quando Hollaender notò la somiglianza fra lo spettro d'azione per il danno cellulare e lo spettro d'assorbimento degli acidi nucleici. Alcuni ricercatori hanno così cominciato uno studio sistematico dell'interazione dell'UV con il DNA, sia *in vitro* che *in vivo*, nella speranza di capire in tal modo l'origine del danno biologico ed avere nello stesso tempo qualche nuova informazione sul meccanismo di azione cellulare.

Dallo studio delle singole basi prima e del DNA *in vitro* poi, si è potuto vedere come l'ultravioletto interagisca preferenzialmente con le basi pirimidiniche, dando luogo alla formazione di dimeri di timina (BEUKERS, IJLSTRA & BERENDS, 1958; BEUKERS & BERENDS, 1960; MARMUR & GROSSMAN, 1961; DEARING, 1962; DEARING & SETLOW, 1963; WACKER, 1963) o di citosina (FREEMAN, HARIHARAN, & JOHNS, 1965; JOHNS, LE BLANC & FREEMAN, 1965; SETLOW, CARRIER & BOLLUM, 1965). Tali dimeri, portano come conseguenza al blocco della duplicazione del DNA. Infatti nel sistema DNA-polimerasi di Bollum, se si usa come « *primer* » un DNA irraggiato e quindi contenente dimeri di timina, la sintesi della nuova catena progredisce fino

al dimero, che agisce bloccando la sintesi ulteriore. Inoltre, tali dimeri sono stati trovati anche *in vivo*, ove essi portano all'arresto della duplicazione cellulare e quindi alla morte operativa della cellula (SETLOW, SWENSON & CARRIER, 1963; SETLOW & CARRIER, 1964; BOYCE & HOWARD FLANDERS, 1964).

Altri danni prodotti dall'irraggiamento con ultravioletto sono denaturazioni parziali locali e rotture nella molecola del DNA: questi due ultimi effetti sono stati messi in evidenza solo per dosi di radiazione molto elevate, e non è ancora ben chiaro il ruolo da essi giocato nella inattivazione del DNA *in vivo*.

In questo filone di ricerca noi abbiamo pensato di affrontare il problema degli effetti dell'UV sul DNA sia *in vitro* che *in vivo*.

Con sistemi *in vitro* si è in particolare cercato di individuare le possibili soglie energetiche per la formazione dei due diversi tipi di dimeri e per la formazione di rotture lungo le eliche del DNA. Si è usato a questo scopo il DNA del fago α , irradiato con luce monocromatica nell'intervallo di lunghezza d'onda 2400-3000 Å.

Per il DNA nativo irradiato in aria, si è trovato (CREMONESE, 1966) che gli effetti prodotti dalla radiazione ultravioletta sono essenzialmente:

a) formazione di tagli lungo le singole eliche del DNA, con una efficienza quantica, per la lunghezza d'onda più efficace $\lambda = (2860 \pm 10)$ Å, pari a

$$\Phi_{\lambda = 2860 \text{ Å}} = 6 \times 10^{-6} \text{ tagli/quantità assorbiti}$$

b) lieve effetto* di denaturazione, probabilmente dovuto alle rotture lungo le singole eliche del DNA;

c) diminuzione del valore del T_m ed allargamento della transizione di denaturazione;

d) comparsa in gradiente di CsCl di una frazione di DNA non denaturabile con trattamento alcalino a pH 12,4;

e) aumento della densità media in CsCl delle due eliche del DNA e della parte non denaturabile di esso.

Gli effetti b) e c) sono con molta probabilità delle conseguenze delle rotture lungo le singole eliche del DNA, mentre gli effetti d) ed e) sono da attribuirsi alla formazione di dimeri di pirimidine lungo le singole eliche o fra eliche opposte del DNA.

Gli effetti menzionati hanno tutti un andamento molto simile, al variare della lunghezza d'onda: in Fig. 1 è riportato come esempio un grafico della densità ρ del DNA resistente a denaturazione, presente dopo l'irraggiamento, in funzione della lunghezza d'onda: in tale curva si nota come l'efficienza della radiazione vari leggermente fra i 2600 ed i 2800 Å per poi aumentare fino ad un massimo per $\lambda = 2880$ Å e ridiminuire poi rapidamente con un

valore di soglia per $\lambda = 3000 \text{ \AA}$. Si notano cioè un picco d'efficienza, centrato a $\lambda = 2880 \text{ \AA}$, ed una banda verso le energie più alte.

Gli stessi valori di soglia e per il massimo di efficienza sono stati trovati per gli altri effetti.

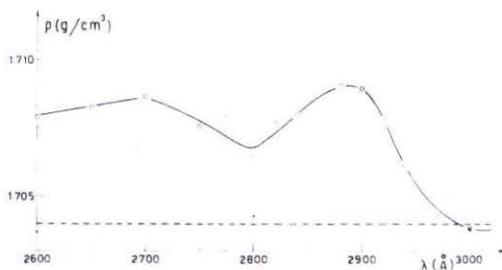


Fig. 1. — Densità in CsCl della parte non denaturabile dopo irraggiamenti con UV del DNA del fago α , in funzione della lunghezza d'onda.

In Fig. 2 è riportata la scomposizione in somma di gaussiane dei grafici ottenuti dall'analisi in gradiente di densità di CsCl in ultracentrifuga analitica, di due campioni di DNA, rispettivamente di controllo (a) e irradiato a $\lambda = (2880 \pm 10) \text{ \AA}$ (b). Si può notare come nel campione irradiato le varie componenti del DNA di α (frazione non denaturabile, elica leggera ed elica pe-

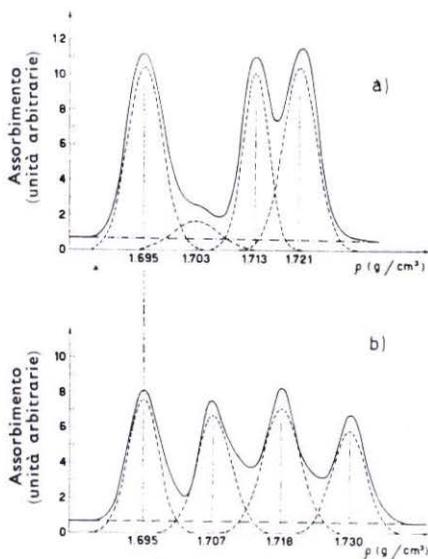


Fig. 2. — Scomposizione in somma di gaussiane dei grafici ottenuti dall'analisi in gradiente di densità di CsCl. a) DNA α non irradiato, denaturato; b) DNA α irradiato a $\lambda = (2880 \pm 10) \text{ \AA}$. Le successive gaussiane corrispondono, da sinistra a destra nell'ordine, a: DNA di *B. megatherium* di riferimento ($\rho = 1,695$), DNA di fago α non denaturabile ($\rho = a$) 1,703; b) 1,707), DNA dell'elica leggera del fago α ($\rho = a$) 1,713; b) 1,718), DNA dell'elica pesante del fago α ($\rho = a$) 1,721; b) 1,730).

sante) abbiano densità in CsCl decisamente maggiore rispetto alle analoghe componenti del DNA non irradiato: inoltre la frazione corrispondente a DNA non denaturabile è fortemente aumentata; dall'area delle gaussiane corri-

spondenti alle varie frazioni si può valutare che la parte non denaturabile di DNA corrisponde, dopo irraggiamento, a circa il 25 % del DNA totale.

I risultati descritti sono stati ottenuti irraggiando i campioni in presenza di aria. Può quindi sorgere il dubbio che essi siano in parte dovuti alla presenza di ossigeno. La esperienza è stata quindi ripetuta irraggiando i campioni in presenza di solo ossigeno o di solo azoto rispettivamente. Le curve ottenute in questo modo sono in ottima corrispondenza con quelle già trovate precedentemente, e non mostrano sensibili diversità fra di loro. Si può quindi affermare che, come la formazione di prodotti di dimerizzazione, anche la formazione di tagli lungo le singole eliche del DNA non sono influenzate dalla presenza di ossigeno.

Infine per avere una idea più precisa circa il significato delle due soglie osservate, si stanno facendo degli irraggiamenti di DNA di fago α già denaturato. Pur non avendo ancora dei dati definitivi, si può dire che anche in questo caso sono probabilmente presenti due valori di soglia a lunghezze d'onda comparabili con quelle già trovate. Essendo il DNA già denaturato prima dell'irraggiamento, non si ha naturalmente in gradiente CsCl la banda corrispondente ad una frazione non denaturabile: per lunghezze d'onda vicino al massimo d'efficienza compare però in questo caso una nuova componente, di densità intermedia fra le densità delle due eliche singole del DNA, dovuta probabilmente alla formazione di singoli *crosslinks* fra due eliche diverse.

Per quanto riguarda gli irraggiamenti *in vivo*, ci si è fino ad oggi occupati solamente di problemi riguardanti il « *recovery* », da parte di cellule irradiate, del danno provocato dall'ultravioletto.

È noto che il danno provocato dall'UV sul DNA può essere « riparato », *in vivo*, mediante due meccanismi ben distinti: la fotoriattivazione, in cui si ha il riacquisto della proprietà di duplicazione, in seguito ad irraggiamento con λ intorno ai 4000 Å, ed il « *dark recovery* », in cui il fenomeno di riparo avviene in assenza di luce fotoriattivante.

Mentre nel caso della fotoriattivazione si è certamente in presenza di un processo enzimatico, che spezza i prodotti di dimerizzazione presenti nel DNA, nel caso del *dark recovery* i dimeri delle pirimidine vengono allontanati dal DNA stesso e vengono ritrovati come tali nel citoplasma (SETLOW, SWENSON & CARRIER, 1963; SETLOW & CARRIER, 1964). In collaborazione con il prof. Castellani, del centro Studi Nucleari della Casaccia del CNEN, Laboratorio di Radiologia Animale, si è cominciato uno studio del fenomeno del « *dark recovery* » ed in particolare di alcune condizioni che possono modificarlo. Supponendo che anche il processo di riparazione in assenza di luce sia di natura enzimatica, ci siamo chiesti se l'enzima fosse preformato o indotto. Si sono quindi fatti irraggiamenti di cellule batteriche mantenute in condizioni di ridotto metabolismo in tampone per tempi variabili.

I dati ottenuti non sono ancora definitivi, ma sembra comunque accertato che periodi di digiuno (« *starvation* ») anche di due giorni non intacchino sensibilmente la facoltà dell'*Escherichia coli* B di riparare il danno prodotto dall'UV. Tale risultato sembra favorevole all'ipotesi della preesistenza dell'enzima responsabile del « *dark recovery* ».

Le linee di ricerca fino ad oggi intraprese, sono soggette a molti ulteriori sviluppi. Come programma di lavoro futuro, si intende infatti sia ampliare il campo di macromolecole studiate *in vitro*, sia estendere la ricerca *in vivo*.

Inoltre, tenendo conto della mancanza di informazioni sul comportamento delle molecole di interesse biologico nell'intervallo di radiazione compreso fra i raggi X e l'ultravioletto prossimo, fino ad oggi studiato, si sta pensando di utilizzare la radiazione emessa dagli elettroni accelerati dal sincrotrone di Frascati per compiere esperienze di biofisica nell'intervallo di frequenza fra i raggi X ed i 2000 Å, ossia nel campo ancora non affrontato compreso fra quello di interesse della radiobiologia e quello di interesse della fotobiologia.

Riassunto. — Vengono descritti alcuni effetti della radiazione ultravioletta sul DNA sia *in vitro* che *in vivo*. Per il DNA *in vitro* sono stati studiati i seguenti fenomeni: a) formazione di tagli sulle singole eliche del DNA; b) denaturazione locale; c) presenza di una frazione di molecole resistenti alla denaturazione; d) aumento della densità media in gradiente di CsCl del DNA irradiato. Per tutti questi effetti si è messo in evidenza un massimo di efficienza quantica a $\lambda = 2880 \text{ \AA}$.

Per il DNA *in vivo* si è studiato l'effetto del digiuno (« *starvation* ») prima dell'irraggiamento con la radiazione ultravioletta dell'*Escherichia coli* B, con l'intento di vedere se l'enzima responsabile del « *dark recovery* » è preformato o indotto. Gli esperimenti, ancora in fase preliminare, sembrano appoggiare la prima ipotesi.

Summary (*Researches on the effects of ultraviolet radiation on DNA, in vitro and in vivo*). — The following effects have been studied on *in vitro* DNA: a) production of interruption in the single polynucleotide strand; b) local denaturation; c) presence of a fraction of molecules resistant to denaturation; d) increase in the bouyant density in CsCl of irradiated DNA.

For all of these effects a maximum of quantum efficiency at $\lambda = 2880 \text{ \AA}$ has been shown.

The effect of a *Escherichia coli* B starvation before UV irradiation suggest that the enzyme responsible of « *dark recovery* » is constitutive.

BIBLIOGRAFIA

- BEUKERS, R. & W. BERENDS, 1960. *Biochem. Biophys. Acta*, **41**, 550.
- BEUKERS, R., J. IJLSTRA & W. BERENDS, 1958. *Rec. Trav. Chim.*, **77**, 729.
- BOYCE, R. P. & P. HOWARD FLANDERS, 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **51**, 293.
- CREMONESE, M., 1966. *Atti Acc. Nazl. Lincei, Rend. Classe Sci. Fis. Mat. Nat.*, Serie VIII, **40**, 87.
- DEARING, R. A., 1962. *Sci. Am.*, **207**, 135.
- DEARING, R. A. & R. B. SETLOW, 1963. *Biochem. Biophys. Acta*, **68**, 526.
- FREEMAN, K. B., P. V. HARIHARAN & H. E. JOHNS, 1965. *J. Mol. Biol.*, **13**, 833.
- JOHNS, H. E., J. C. LE BLANC & K. B. FREEMAN, 1965. *J. Mol. Biol.*, **13**, 849.
- MARMUR, J. & L. GROSSMAN, 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **47**, 778.
- SETLOW, R. B. & W. L. CARRIER, 1964. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **51**, 226.
- SETLOW, R. B., W. C. CARRIER & F. J. BOLLUM, 1965. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **53**, 1111.
- SETLOW, R. B., P. A. SWENSON & W. L. CARRIER, 1963. *Science*, **142**, 1464.
- WACKER, A., 1963. Molecular mechanisms of radiation effects. In: *Progress in Nucleic Acid Research* **1**, 369, Acad. Press, New York.