

LA NASCITA E LO SVILUPPO DELLA BIOFISICA

Le origini
Clara Frontali

Dalla Biofisica strutturale alla Biofisica delle radiazioni
Mauro Belli

Struttura e dinamica di macromolecole
Filomena Mazzei

Le origini *Clara Frontali*

Fin dalle sue origini il Laboratorio di Fisica ha provveduto a mettere a disposizione, su richiesta degli altri laboratori dell'Istituto, l'utilizzo di strumenti (primo tra tutti, il microscopio elettronico) e di metodologie della fisica per lo studio di problemi di natura biologica. Tuttavia, questa attività di supporto non può ovviamente essere qualificata come Biofisica.

La definizione di questo termine è stata sempre controversa. Per alcuni rientra a buon diritto nella Biofisica la fisiologia, quando fa uso di concetti e leggi della fisica (come avviene, ad esempio, nello studio del sistema circolatorio). Per altri la Biofisica è l'applicazione, ad un particolare problema biologico, di metodologie che richiedano competenze specifiche (ad esempio di meccanica quantistica, o di struttura della materia), anche senza che chi queste competenze possiede abbia una visione chiara del significato del problema dal punto di vista della biologia.

Bisogna dire che negli anni '50, sull'onda del successo nella risoluzione della struttura del DNA e di molecole proteiche come la mioglobina mediante cristallografia ai raggi X, molti fisici considerarono la biologia come un terreno di "prede facili", da conseguire utilizzando il loro armamentario di conoscenze fisiche, ma senza avere l'umiltà necessaria per affrontare la complessità dello studio dei processi biologici.

Da questo punto di vista, la creazione – nell'ambito del Laboratorio di Fisica – di un Reparto di Biofisica e Biologia Molecolare fu decisamente un fatto in controtendenza¹. Lo sviluppo di linee di

¹ Il Reparto di Biofisica e Biologia Molecolare, attivato nel 1960 per volontà di Mario Ageno, fu diretto da Anna Reale Scafati e successivamente da Clara Frontali.

ricerca focalizzate su problematiche relative alla struttura di macromolecole biologicamente significative (dette anche “macromolecole informazionali”, secondo il nuovo paradigma del flusso dell’informazione genetica), reca indiscutibilmente l’impronta originale del pensiero di Mario Ageno. Nel mettere l’accento sull’uso degli “strumenti concettuali della fisica” (1) quando si affrontano problemi che appartengono al campo della biologia, Ageno avverte “Nessuna attività di ricerca priva di una chiara problematica biologica può essere qualificata biofisica”.

L’avvio di tali linee di ricerca fu altrettanto indiscutibilmente catalizzato dall’interazione con ricercatori esterni, in particolare con quelli – come Franco Graziosi e Luigi Silvestri – più attenti a quanto avveniva in campo internazionale con le acquisizioni sperimentali e l’elaborazione dei modelli propri della nascente disciplina, la biologia molecolare. E ciò in un momento in cui il mondo accademico italiano tardava a cogliere l’essenza del nuovo modo di pensare ed il valore fondante delle nuove metafore.

Nel 1962, su invito di Ageno, Graziosi tenne un corso di “Biologia per fisici” che ebbe un forte influsso sulla formazione di un gruppo di giovani (e meno giovani: tra gli allievi del corso il più attento, vivace e critico era proprio Mario Ageno). Come paradigma di ricerca biofisica veniva presentata, ad esempio, la nota esperienza dei fisici Salvador Luria e Max Delbruck: una semplice analisi – basata sulla statistica di Poisson – della comparsa di caratteri di resistenza in cloni batterici fatti riprodurre in parallelo dimostrava l’insorgenza casuale di mutazioni spontanee ed eliminava definitivamente l’ipotesi di ereditarietà di caratteri acquisiti.

Tra il 1962 ed il 1965 continuò la stretta interazione tra il Reparto ed il gruppo che faceva capo a Franco Graziosi: ne facevano parte allora, tra gli altri, figure che diverranno di spicco come Mario Terzi e Glauco Tocchini-Valentini. L’intero gruppo trovò infatti ospitalità presso il Laboratorio di Fisica dell’ISS nell’attesa di trasferirsi (cosa che avvenne nel 1965) a Napoli, al nuovo Istituto di Genetica e Biofisica creato dal CNR (diretto inizialmente da Adriano Buzzati Traverso e successivamente dallo stesso Graziosi). Nello stesso anno, il 1965, nasce la Società Italiana di Biofisica e Biologia Molecolare (dove l’aggettivo “molecolare” si riferisce ad entrambe le discipline), di cui Mario Ageno sarà presidente, succedendo ad Adriano Buzzati Traverso.

Sono anni di grande fermento, nei quali viene finalmente risolto per via sperimentale il problema del codice che consente la traduzione dal linguaggio (a triplette di nucleotidi) del DNA o dell'RNA, a quello delle proteine ivi codificate. Il codice così determinato risulta privo di evidenti regolarità, quali quelle ipotizzate nelle soluzioni basate su proprietà di simmetria proposte in precedenza (anche da fisici della levatura di George Gamow): tra queste, anche quella proposta da Ageno (2).

Il modello sperimentale privilegiato dai biologi molecolari in quegli anni è rappresentato dai virus batterici (o batteriofagi, o ancora più brevemente "fagi"). Ciò è dovuto, da un lato, al fatto che i fagi si prestano bene a titolazioni quantitative (permettendo, ad esempio, la determinazione di curve dose-effetto e del volume d'urto nello studio dell'azione delle radiazioni ionizzanti), dall'altro alla facilità nella purificazione dell'acido nucleico in condizioni tali da permettere lo studio delle proprietà chimico-fisiche della molecola integra.

Data la notevole disponibilità di fondi per apparecchiature di cui godeva l'ISS in quegli anni, il Reparto poté dotarsi della strumentazione allora di punta per questo tipo di indagini. L'ultracentrifuga analitica aveva assunto nuove importanti potenzialità da quando – accanto alle tradizionali misure di velocità di sedimentazione – era stata introdotta da Vinograd e Stahl la tecnica dell'equilibrio in gradiente di densità (l'elegante tecnica che aveva permesso a Meselson ed agli stessi Vinograd e Stahl di accertare il meccanismo di replicazione della molecola del DNA). La stessa tecnica permetteva di discriminare lo stato "nativo" (a doppia elica) del DNA dallo stato ad eliche separate dopo "denaturazione" per fusione dei legami idrogeno, resa irreversibile da rapida rimozione delle condizioni denaturanti. Permetteva inoltre di determinare la composizione in basi del DNA (3). Il lavoro condotto in collaborazione con il gruppo di Franco Graziosi sul DNA del fago α di *B. megatherium*, con la dimostrazione di una diversa densità (e quindi composizione) delle due eliche complementari, ebbe notevole risonanza internazionale e aprì la via alla successiva purificazione di una singola elica (4, 5).

Negli anni 1965-1970 la linea portante delle ricerche condotte nel Reparto fu incentrata sullo studio delle proprietà chimico-fisiche del DNA, sia fagico che batterico. Misure turbidimetriche, spettrofotometriche e di dicroismo circolare affiancavano le tecniche di ultracentrifugazione analitica nello studio dei processi di de-

naturazione e di “rinaturazione” del DNA e della loro dipendenza dalla concentrazione salina del mezzo (6-9). Lo studio della cinetica del processo di rinaturazione (possibile in condizioni – di temperatura o di pH – in cui si ha equilibrio tra rottura e riformazione dei legami idrogeno) permetteva di valutare la frazione ripetitiva e di stimare la “complessità” del genoma di un dato organismo (10).

Il ruolo giocato dai legami idrogeno in tutti questi processi, come pure nella struttura dell’acqua, fu fonte di elaborazione teorica sulla natura del legame idrogeno, che trovò espressione in una serie di lavori non strettamente biologici. Processi di condensazione reversibile del DNA a basso pH vennero studiati ed interpretati sulla base dell’interazione tra nucleotidi e ioni H (11-13). Altre linee di ricerca portate avanti nel Reparto sono presentate in altri articoli del presente volume.

La ricca strumentazione di cui era corredato il Reparto era integrata da apparecchiature costruite dallo staff di tecnici dell’officina e del Servizio di elettronica del Laboratorio, la cui qualificazione era costantemente incoraggiata e seguita. Vanno qui ricordate figure come quelle di Alfredo Rosati, Corindo Felici, Riccardo Crateri, Antonio Araco, Giacomo Monteleone, Carlo Ramoni (poi divenuto ricercatore), Claudio Ranghiasi, Mario Flamini ed altri ancora. Le apparecchiature in vetro venivano invece commissionate ai bravissimi soffiatori del Servizio tecnico dell’ISS.

La costante interazione con il Reparto di Microscopia Elettronica permise di migliorare le tecniche di osservazione delle forme poliedriche dei virus di piccole dimensioni, e portò Mario Ageno a proporre una elaborazione teorica sulla genesi delle architetture virali. Tecniche di ricostruzione tridimensionale furono applicate in particolare allo studio del fago G, isolato e caratterizzato nel Reparto (14), il cui materiale genetico è costituito da un’unica molecola di DNA di dimensioni eccezionali.

Nel Reparto di Biofisica Molecolare fu anche messa a punto la tecnica di adsorbimento di molecole di DNA su monostrati proteici per consentirne la visualizzazione al microscopio elettronico in condizioni di minimo stress. Venne così confermato l’elevato peso molecolare del DNA del fago G, che – data la sua omogeneità – divenne poi uno standard di uso internazionale.

La stessa tecnica venne applicata con successo allo studio della flessibilità della molecola del DNA. Il problema riguarda la possibi-

lità dell'impacchettamento della molecola – relativamente rigida nel suo stato nativo – all'interno del capsido fagico. In collaborazione con il gruppo diretto da Alessandro Bettini presso l'Istituto di Fisica dell'Università di Padova venne sviluppato un originale metodo di analisi delle immagini ottenute al microscopio elettronico che permetteva di determinare in modo diretto la flessibilità del DNA, tenendo conto del passaggio dalle tre dimensioni del DNA in soluzione alle due dimensioni della molecola adsorbita (15-17).

Negli anni '70, l'era della genomica trovò il Reparto preparato: studi di genomica funzionale vennero portati avanti con particolare attenzione al genoma di parassiti malarici ed ai meccanismi di riarrangiamento genico presumibilmente coinvolti nel differenziamento sessuale del parassita. Questa attività verrà portata avanti con successo dal Reparto di Biofisica Molecolare, transitato dal 1977 in poi – in seguito alla ristrutturazione dell'ISS – nel nuovo Laboratorio di Biologia Cellulare e Immunologia, e successivamente integrato con competenze bioinformatiche per l'analisi al computer delle sequenze di DNA.

La problematica legata ai rischi ipotizzati per le applicazioni delle tecniche di ingegneria genetica, che tanta eco suscitò in ambito internazionale fin dagli anni '70, coinvolse l'ISS nella elaborazione di normative riguardanti il contenimento fisico e biologico degli organismi geneticamente modificati (OGM) ed il controllo della loro introduzione nell'ambiente. Le competenze di genetica molecolare presenti nel Reparto permisero all'ISS di svolgere un ruolo particolarmente attivo nella elaborazione sia delle linee guida dell'OCSE (Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico) che delle direttive CEE in merito, e successivamente nell'implementazione delle stesse nel nostro Paese.

Dalla Biofisica strutturale alla Biofisica delle radiazioni

Mauro Belli

Le ricerche di Biofisica strutturale, mirate alla caratterizzazione della struttura di molecole biologiche e alla comprensione della relazione tra struttura e funzioni, nascono e si sviluppano negli anni '60 nel Reparto di Biofisica e Biologia Molecolare dei Laboratori di Fisica sotto l'impulso di Mario Ageno.

Come già indicato da Clara Frontali nel suo contributo, in questo periodo i Laboratori di Fisica si aprono alla collaborazione con il gruppo di Biologia Molecolare di Franco Graziosi, dell'Università di Roma, in particolare studiando la struttura e le proprietà del DNA. Con Anna Reale Scafati, Clara Frontali, Elisabetta Dore ed altri giovani ricercatori la Biofisica inizia così ad assumere un ruolo sempre più rilevante. Accanto allo studio del DNA, la macromolecola informazionale centrale, illustrato nella precedente sezione, nel periodo post-Ageno vengono sviluppate indagini su altre macromolecole e complessi legati alla trasmissione e all'elaborazione dell'informazione biologica, in particolare RNA e ribosomi. L'aspetto principale sul quale si indirizza la ricerca è la relazione esistente tra struttura e funzioni biologiche.

In precedenza, cioè all'inizio degli anni '60, Anna Reale Scafati era stata inviata da Ageno ai Laboratoires de biophysique dell'Università di Ginevra, un vivace ambiente internazionale dove operava Edouard Kellenberger, noto esperto di microscopia elettronica dei batteriofagi. Lì era rimasta un anno e mezzo, specializzandosi in genetica batterica. Tornata all'ISS, aveva continuato le sue ricerche studiando, in particolare, un fenomeno detto "soppressione fenotipica delle mutazioni" (1), consistente nel fatto che un antibiotico poteva correggere (sopprimere) una mutazione genica in una popolazione batterica attraverso un meccanismo che, sorprendentemente, non si trasmetteva per via genetica in quanto modificava il fenotipo cellulare senza modificarne il genotipo. Anna Reale Scafati aveva osservato che era possibile ottenere questa soppressione fenotipica anche sottoponendo le cellule batteriche ad una carenza di ioni Mg^{++} , necessari alla struttura dei ribosomi, sedi della sintesi proteica. In questo periodo, cioè attorno agli anni '70, vi è un forte interesse, da parte della comunità scientifica internazionale, nei riguardi della struttura di questi complessi, legato ai tentativi di chiarire i meccanismi fondamentali della sintesi proteica.

Nel Reparto di Biofisica Molecolare si forma, quindi, un gruppo di ricerca attorno ad Anna Reale Scafati, composto da Antonio Araco, Mauro Belli, Vincenzo Falbo, Colomba Giorgi e Marina Maggini, rivolto a comprendere il ruolo svolto dagli ioni metallici, in particolare Mg^{++} , nella struttura dei ribosomi batterici (2). Per caratterizzare le proprietà chimico-fisiche di questi complessi

s'impiegano principalmente le tecniche di "light-scattering", la spettroscopia nell'UV e la misura del coefficiente di sedimentazione mediante le ultracentrifughe preparative utilizzando anche metodi messi a punto *ad hoc* (3). All'epoca la determinazione delle proprietà idrodinamiche delle macromolecole era effettuata prevalentemente mediante le centrifughe analitiche o preparative, con tecniche che, associate all'uso di densimetri di alta precisione, consentivano la misura del peso molecolare. Tali tecniche richiedevano quindi apparecchiature piuttosto costose e metodologie molto sofisticate e saranno in seguito sostituite da altre, in particolare da quelle elettroforetiche.

Dopo l'uscita di Anna Reale Scafati dall'ISS, il gruppo, coordinato da Mauro Belli e composto da Antonio Araco e Colomba Giorgi con la collaborazione di Giuseppe Onori (che da contrattista dell'ISS era intanto transitato all'Università di Perugia) sviluppa metodi di spettrofotometria nell'UV per determinare il grado di struttura secondaria ("stacking" delle basi) dell'RNA ribosomico (4). Il gruppo caratterizza il ruolo strutturale di ioni bivalenti, in particolare del magnesio, nei ribosomi batterici di *E. coli* e nell'RNA ribosomico con l'impiego estensivo della spettroscopia nell'UV, sia di assorbimento che in dicroismo circolare (5-7). Con il successivo inserimento nel gruppo di Filomena Mazzei viene studiato anche il ruolo strutturale delle proteine ribosomiche. In tal modo sono ottenute evidenze sperimentali a supporto dell'idea che la struttura compatta dei ribosomi sia il risultato di un'interazione coordinata tra i suoi componenti, quali RNA, proteine e ioni metallici (8, 9).

Intanto il riordino dell'ISS a seguito della legge n. 519 del 1973, che ha effetto solo a partire dal 1977, porta ad una riorganizzazione con il passaggio dalla tradizionale impronta disciplinare dei Laboratori ad una orientata verso le tematiche d'interesse sanitario. I Laboratori di Fisica focalizzano in questo senso la loro missione assumendo il nome di Laboratorio delle Radiazioni, diretto da Gloria Campos Venuti, dato che le radiazioni, ionizzanti e non ionizzanti, costituiscono la tematica comune della gran parte delle attività sia di ricerca che di controllo e consulenza. Il gruppo della Biofisica del DNA (Clara Frontali ed Elisabetta Dore) si trasferisce nel Laboratorio di Biologia Cellulare ed Immunologia; anche Antonio Araco transita in quel Laboratorio. Queste transizioni, seppure coerenti

con il riordino dell'ISS, lasciano enormi vuoti di professionalità, e la perdita di competenze rivolte agli aspetti biologici renderà in qualche caso più lunga ed accidentata la strada verso la realizzazione degli auspicati approcci interdisciplinari.

Nel 1977 è costituito all'interno del Laboratorio delle Radiazioni il Reparto di Biofisica delle Radiazioni, diretto da Mauro Belli e composto da Gianni Mariutti (che si occupa del tema specifico dell'ipertermia e dei suoi effetti biologici) e successivamente da Filomena Mazzei e da Maria Antonella Tabocchini, all'epoca borsista, una biologa che sarà importante nella successiva implementazione di un proficuo rapporto interdisciplinare tra fisica e biologia. Vengono inoltre inseriti, seppure in epoche diverse, i tecnici Franco Notargiacomo e Maurizio Vischetti.

La rifocalizzazione del nuovo Laboratorio richiede quindi una nuova attenzione verso le moderne tematiche delle radiazioni. È interessante notare che il danno prodotto da raggi X nel DNA virale aveva ricevuto attenzioni già all'epoca di Ageno, come testimonia una relazione presentata da Clara Frontali e Mario Terzi al 1° Convegno di Biofisica organizzato all'ISS nel 1963.

Nella seconda metà degli anni '70 la realizzazione della *facility* per radiazione di sincrotrone presso l'acceleratore Adone dei Laboratori Nazionali di Frascati (LNF) dell'INFN fa letteralmente "esplodere" l'interesse per le possibili applicazioni, non solo in ambito nazionale ma anche in quello internazionale. A Frascati vi era già una tradizione nell'utilizzo di questa radiazione come testimoniano gli studi pionieristici di Fisica Atomica presso il Sincrotrone (descritti in altra sezione di questo Quaderno). Il successore di questo acceleratore, l'anello di accumulazione Adone, che stava a sua volta diventando obsoleto per le particelle elementari, poteva fornire fasci di elettroni che, nei loro percorsi curvi, diventavano sorgenti di radiazione collimate e di alta brillantezza. Nel 1976 nasce PULS, il Progetto per l'Utilizzazione della Luce di Sincrotrone.

Il Reparto di Biofisica delle Radiazioni, che sino allora aveva sostanzialmente utilizzato le apparecchiature presenti nell'ISS, s'interessa alle applicazioni della radiazione di sincrotrone alla biofisica degli acidi nucleici, come potente metodologia complementare a quelle tradizionali. Per questa decisione fu essenziale l'orientamento favorevole di Gloria Campos Venuti che dirigeva allora il Laboratorio, e

l'interesse di Anna Reale Scafati che, potendo riprendere il lavoro di ricerca grazie all'ospitalità dell'ISS e all'associazione all'INFN, costituì un tramite tra il gruppo di Mauro Belli e il PULS di Frascati.

Mauro Belli stabilisce collaborazioni con alcuni ricercatori dei LNF (tra i quali Mario Piacentini e Francesco Antonangeli) per lo studio delle proprietà ottiche di molecole biologiche nell'intervallo spettrale dell'UV da vuoto (VUV) della radiazione di sincrotrone e, per l'utilizzazione della componente di raggi X molli, con altri ricercatori dei LNF (Emilio Burattini, Settimio Mobilio, Calogero Natoli, Libero Palladino, poi transitato all'Università dell'Aquila) e delle Università dell'Aquila (Armando Reale, che aveva lavorato per diversi anni nei Laboratori di Fisica, e Antonio Bianconi, che transiterà poi all'Università della Sapienza di Roma).

Ben presto queste collaborazioni presentano progetti di ricerca al PULS. Nasce così un esperimento sulle proprietà ottiche nel VUV di basi azotate allo stato di vapore, al quale partecipano, oltre Mauro Belli, anche Mirella Matzeu, Filomena Mazzei e Giuseppe Onori. L'esperimento, denominato UVA, viene finanziato dall'INFN. La seconda collaborazione s'indirizza all'applicazione delle tecniche di spettroscopia ad alta risoluzione con raggi X molli per acquisire informazioni sul sito di legame di ioni metallici in molecole biologiche in soluzione. Anche questo esperimento, denominato RIBEX, è approvato dall'INFN. Mauro Belli partecipa, da un lato, alla realizzazione sperimentale delle linee di fascio dedicate alla biofisica e, dall'altro, agli studi preliminari ma indispensabili (non essendoci all'epoca indicazioni nella letteratura scientifica internazionale) sull'interpretazione di spettri di assorbimento X in composti del Mn^{++} allo stato solido aventi diversi tipi di simmetria. Il gruppo utilizza la spettrometria EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) e successivamente XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure), nome coniato da Antonio Bianconi per indicare gli spettri dovuti a risonanze di "scattering multiplo" del fotoelettrone in vicinanza della soglia di assorbimento. La spettrometria XANES è usata dalla collaborazione ISS-LNF-Università dell'Aquila per il primo articolo internazionale di luce di sincrotrone prodotto da Adone (10) e successivamente s'impone come nuovo metodo sperimentale della biofisica per lo studio della relazione tra funzione biologica delle metallo-proteine, o di altri complessi metallo-biomolecola, e la struttura atomica del sito attivo.

La collaborazione ottiene con questa esperienza le informazioni di base necessarie ad affrontare lo studio di complessi in soluzione quali MnATP e CuATP (11-13), la cui rilevanza biologica è legata al fondamentale ruolo dell'ATP come attivatore di molte reazioni enzimatiche indispensabili alla vita cellulare, oltre che al loro valore come modelli del legame metallo-acidi nucleici. Per il CuATP, in particolare, il gruppo, al quale si era aggiunto Giuseppe Onori ed altri ricercatori dell'Università di Perugia, dimostra che il sito di legame del metallo cambia con il pH della soluzione e valuta le distanze interatomiche Cu-O nei vari casi (13-16). Inoltre viene rivelata e misurata, per la prima volta con questo metodo, la distorsione tetragonale di Jahn-Teller presente nel cluster CuO₆ in soluzione (17).

Le misure su questi composti in soluzione non sarebbero però state possibili senza lo sviluppo di particolari cuvette a tenuta di vuoto, progettate e realizzate grazie alla competenza dei servizi di tecnologia ed officina del Laboratorio, in particolare da Riccardo Crateri e Giuseppe Di Nunzio.

Parallelamente alla "*avventura*" con la radiazione di sincrotrone, nel Reparto di Biofisica delle Radiazioni vengono ripresi, all'inizio degli anni '80, gli studi sugli effetti della radiazione UV su materiale biologico, che erano stati iniziati dal gruppo di Marta Cremonese con Mirella Matzeu, Chiara Giampaoli e Giuseppe Onori ed erano stati sospesi a seguito della prematura scomparsa di Marta Cremonese. Vi partecipano, oltre ai ricercatori del Reparto (Mauro Belli, Filomena Mazzei e Maria Antonella Tabocchini), anche Mirella Matzeu (entrata in seguito nel Reparto) e Giuseppe Onori. Le ricerche, effettuate su DNA purificato o estratto da nucleosomi, evidenziano che l'esposizione a radiazione UV produce fotoprodotto, anche diversi dai dimeri di pirimidine, in grado di modificare la conformazione del DNA (18), aspetto importante per il riconoscimento del danno da parte degli enzimi riparativi cellulari. Questa tematica verrà ulteriormente sviluppata, includendo gli aspetti della dosimetria UV, principalmente da Mirella Matzeu, Filomena Mazzei e Gianni Mariutti, come descritto in altra sezione.

Dunque, intorno alla metà degli anni '80, convivono i due aspetti fondamentali dell'interazione delle radiazioni con la materia biologica: l'uno, che vede la radiazione utilizzata come sonda per ottenere informazioni sulla struttura e, in generale, sulle proprietà del-

la materia biologica, e l'altro che mira ad ottenere informazioni sulle modificazioni apportate dalla radiazione su tale materia. Nel primo aspetto ricade l'uso della radiazione di sincrotrone come descritto, e nel secondo l'uso della radiazione UV in relazione ai fotoprodotti ed alle variazioni conformazionali indotte. Naturalmente, queste due "facce della medaglia" non sono sempre separabili, perché i due aspetti possono anche sovrapporsi.

Verso la metà del 1980 l'interesse del Reparto (al quale si erano aggiunte Flavia Barone e una borsista, Elvira Rongoni) per le modificazioni causate dalle radiazioni ha un importante sviluppo verso le radiazioni ionizzanti. Utilizzando raggi X si dimostra che nella cromatina le proteine istoniche hanno un ruolo protettivo per il DNA (19). In questo periodo Mauro Belli e gli altri ricercatori del Reparto vengono attratti dai formidabili ma stimolanti problemi ancora presenti nella radiobiologia molecolare e cellulare, un settore che all'epoca conta ancora in Italia un numero esiguo di studiosi. Un'influenza determinante su questa attrazione, alla cui base culturale non è estranea del resto la precedente esperienza scientifica descritta, è data dalla presenza a Roma di uno tra i più rappresentativi scienziati italiani del settore, Marcello Quintiliani, già Direttore del Laboratorio di Chimica Biologica dell'ISS, passato nel 1973 all'Istituto di Fotochimica e Radiazioni di Alta Energia del CNR di Bologna e poi tornato a Roma a dirigere l'Istituto di Tecnologie Biomediche del CNR. A Roma era tornato anche Orazio Saporà, un biologo già allievo di Quintiliani con ottime competenze di biochimica, dopo una pluriennale esperienza nel Regno Unito. Inizia un serrato scambio d'idee che evidenzia come, nonostante la grande quantità di informazioni radiobiologiche disponibili, non vi sia ancora una vera teoria dell'azione delle radiazioni sulla materia biologica. Ciò convince l'allora Direttore del reparto di Biofisica delle Radiazioni della necessità di ottenere dati sperimentali mirati alla soluzione di alcuni problemi chiave. Due appaiono chiaramente tra i più rilevanti e congeniali alla precedente esperienza: la relazione esistente tra le caratteristiche fisiche della radiazione e la sua efficacia biologica, e quella tra le lesioni indotte sul DNA ed il danno sulle funzioni cellulari. Questo approccio, che si avvale dell'impiego di diverse radiazioni (raggi X, gamma e particelle cariche densamente ionizzanti), si rivela fruttifero (20) e rappresenterà per molto tempo

il tema prevalente della ricerca condotta nel Reparto delle Radiazioni e poi nel Reparto di Biofisica (denominazione assunta dopo un ulteriore riordino dell'ISS). Le ricerche fanno uso inizialmente di raggi X, emessi dagli apparecchi disponibili nell'ISS nel Laboratorio di Chimica Biologica e nello stesso Laboratorio delle Radiazioni, dove la professionalità appassionata di Lucio Pugliani è fondamentale per l'adattamento delle apparecchiature agli esperimenti radiobiologici. Un altro passo significativo è l'uso di cellule di mammifero coltivate *in vitro* come sistema sul quale poter mettere in relazione il danno al DNA con le modifiche delle funzioni cellulari, passo per il quale sono preziose le competenze biologiche integrate nel Reparto.

Un altro fattore favorevole a questa transizione è l'incontro con Giuliano Moschini, un fisico nucleare dei Laboratori Nazionali di Legnaro (LNL) dell'INFN, interessato alle applicazioni di questa disciplina. Nei Laboratori di Fisica era stata costituita da tempo una Sezione dell'INFN (la Sezione Sanità, poi divenuta Gruppo collegato Sanità) alla quale i componenti del reparto delle Radiazioni erano associati in quanto presenti negli esperimenti con radiazione di sincrotrone finanziati dall'INFN, cosicché vi erano frequenti rapporti con gli altri gruppi INFN dediti ad attività di fisica applicata. Moschini evidenzia che alcuni degli acceleratori dei LNL, non più estensivamente utilizzati per la Fisica Nucleare, potevano essere utilmente impiegati per produrre fasci di protoni monoenergetici per la Fisica applicata. Nasce così l'idea di realizzare una linea di fascio per lo studio degli effetti di protoni su sistemi biologici, anche viventi (linea di Radiobiologia). Fattori di questa idea sono, oltre a Giuliano Moschini, Mauro Belli, Maria Antonella Tabocchini e Orazio Saporà. La collaborazione si estende a Roberto Cherubini ed altri ricercatori dei LNL e a Giustina Simone, all'epoca ricercatrice del CNR a Bologna ed allieva di Quintiliani, poi trasferitasi stabilmente nel Reparto nel quale si inserirà successivamente anche Fiorenza Ianzini. Il progetto prende corpo e nel 1985 la linea viene effettivamente realizzata presso l'acceleratore CN da 7 MV dei LNL con la dimostrazione delle sue possibilità nello studio di effetti su cellule di mammifero coltivate *in vitro* (21). I fasci di protoni di bassa energia del CN da 7 MV si confermano, secondo le previsioni, un potente strumento d'indagine radiobiologica. La loro energia variabile permette di esplorare gli effetti prodotti nell'intorno del picco di Bragg, dove essi aumentano il loro trasferimento lineare di energia

(LET). La piccola dispersione in energia di questi fasci rappresenta un vantaggio determinante rispetto ad altri esperimenti precedenti condotti con fasci degradati energeticamente e permette la determinazione dettagliata di curve di risposta al variare dell'energia o del LET.

Gli studi sistematici intrapresi ai LNL con fasci accelerati di protoni e di ioni elio di varia energia producono un set di dati su cellule di mammifero coltivate *in vitro* praticamente unico in letteratura, perché riguardante diversi effetti cellulari studiati nelle stesse condizioni sperimentali, ciò che è fondamentale per lo sviluppo di modelli biofisici dell'azione delle radiazioni ionizzanti. Essi forniscono la prima evidenza sperimentale che l'efficacia biologica di ioni leggeri dipende dal tipo di particella a parità di trasferimento lineare di energia (LET), i protoni rivelandosi in generale più dannosi di altri ioni più pesanti sia a livello dell'inattivazione cellulare sia a livello dell'induzione di mutazioni (22-25), suggerendo l'importanza della struttura di traccia della radiazione, cioè di un insieme di caratteristiche fisiche non riducibili ad un unico indicatore (LET).

Questo è un risultato inaspettato per la comunità scientifica, soprattutto per quella di radioprotezione, che usa il LET come il solo indice della qualità della radiazione e quindi della sua efficacia (aspetto espresso tramite il fattore di qualità e il fattore di peso della radiazione). Seguendo le buone regole della scienza si cerca una conferma con esperimenti indipendenti presso un altro Centro. Essa viene da confronti diretti tra protoni e ioni elio dello stesso LET intrapresi al Variable Energy Cyclotron di Harwell, in collaborazione con Dudley T. Goodhead del Medical Research Centre (MRC), su diversi *end points* cellulari (26-28). L'esperimento, svolto nell'ambito di un progetto finanziato dall'Euratom (il primo passo nell'inserimento del Reparto nella dimensione europea), indica che la struttura di traccia delle particelle sulla scala dei nanometri ha conseguenze biologiche significative, confermando inoltre un'ipotesi di lavoro dello stesso Goodhead. Queste ricerche innescano un forte interesse in ambito internazionale in relazione alla comprensione dei meccanismi d'azione delle radiazioni ionizzanti, anche se le ricadute pratiche in radioprotezione, a causa delle approssimazioni utilizzate in questo campo, non sono immediatamente evidenti. Esplorando le origini molecolari di questi meccanismi, la collaborazione ISS-LNL-CNR studia la produzione e la riparazione delle doppie rotture nel DNA (che sono con-

siderate le lesioni radioindotte più significative) nelle cellule irradiate, mostrando che il tipo e l'energia delle particelle, sebbene influiscano scarsamente sul numero iniziale di tali lesioni, influiscono sulla velocità di ricongiungimento dei frammenti del DNA (29-31).

È evidente che questi risultati sono possibili grazie all'approccio multidisciplinare con l'integrazione, nel nucleo delle competenze fisiche del Reparto, di adeguate competenze biologiche e con lo sviluppo di un metodo di lavoro comune. Questo approccio si rivela un importante "valore aggiunto" rispetto a quelli presenti nella maggior parte dei gruppi universitari o comunque basati su competenze monodisciplinari, in cui competenze complementari sono ottenute attraverso collaborazioni con altri gruppi.

La verifica dell'ipotesi di lavoro secondo la quale la qualità della radiazione determina la "qualità" delle lesioni al DNA, cioè la loro riparabilità e quindi le conseguenze biologiche della radiazione stessa, richiede l'uso di radiazioni ionizzanti con diversa distribuzione spaziale delle ionizzazioni da essa prodotte. Sulla base dei lavori effettuati da Goodhead con i raggi X molli, il Reparto pensa si possa trarre vantaggio da un particolare tipo di sorgente X, costituita da un plasma ad altissima temperatura prodotto da un opportuno fascio laser di potenza presso il Centro di Frascati dell'ENEA. All'inizio degli anni '90 si forma una collaborazione con Tommaso Letardi ed altri ricercatori dell'ENEA-Frascati e con Armando Reale e Libero Palladino dell'Università dell'Aquila per sviluppare la sorgente plasma-laser a Frascati, uno sviluppo tecnologico che richiede alcuni anni (32, 33) prima dell'applicazione a cellule coltivate *in vitro* (34-36), e che conferma che questi X ultramolli sono biologicamente più efficaci dei raggi gamma, pur essendo sempre radiazioni fotoniche, a causa dell'alta densità di ionizzazione locale prodotta dai fotoelettroni secondari. Nello stesso periodo il Reparto dimostra che la distribuzione delle lesioni sul DNA indotte dalle radiazioni fotoniche convenzionali può essere influenzata dalla diversa conformazione che la macromolecola assume localmente (37), evidenziando il ruolo combinato della struttura spaziale dei depositi energetici e della struttura del bersaglio biologico.

A metà degli anni '90 la transizione dell'attività del Reparto dalla biofisica delle strutture alla biofisica delle radiazioni è completata. Il Reparto è inserito in progetti europei nell'ambito del Programma di

ricerca Euratom, che si susseguiranno nei vari Programmi Quadro (6°, 7° e Horizon 2020) con varie collaborazioni con altri gruppi europei. La designazione di Mauro Belli nel 1978 come delegato italiano nel Comitato del programma di ricerca “Radioprotezione” della CE, fortemente appoggiata dall’allora direttore Gloria Campos Venuti, sarà determinante per ottenere una pronta informazione di ciò che si sviluppava in ambito europeo. Ciò non diede luogo a risultati pratici in termini di contratti europei nel settore della ricerca in radioprotezione essendo questa attività nel Laboratorio di quegli anni orientata verso la consulenza con il Ministero della Sanità. Successivamente questa esperienza, ad iniziare dal 2001 con il Programma di ricerca Euratom-Fissione, sarà l’occasione per l’inserimento del Reparto in vari progetti di ricerca europei e per collaborare all’elaborazione di un documento europeo (38) sulla strategia per la ricerca dei rischi alle basse dosi ed al varo di una piattaforma europea nel settore, denominata MELODI (Multidisciplinary European Low Dose Initiative), con l’inserimento in ruoli importanti dell’ISS e di altre istituzioni italiane.

L’esperienza sugli effetti biologici delle particelle cariche sarà poi preziosa per affrontare una nuova sfida rappresentata dalle applicazioni dei fasci di queste particelle alla terapia dei tumori. Una grande opera di sensibilizzazione della comunità scientifica italiana a questa applicazione è intrapresa negli anni ’90 da Ugo Amaldi, che conia per essa il termine di “adroterapia” e crea la collaborazione TERA (Terapia con Adroni). Il Laboratorio di Fisica dell’ISS parteciperà attivamente alle iniziative per dotare anche il nostro Paese di questo tipo di *facility* con il Progetto speciale del Ministero della Sanità denominato TOP (Terapia Oncologica con Protoni), coordinato da Martino Grandolfo, in cui un intero sottoprogetto sarà dedicato alla Biofisica e Radiobiologia dei protoni e sarà coordinato, come la Sezione Radiobiologia della collaborazione TERA, da Mauro Belli. Infatti la variazione della qualità del fascio terapeutico nei vari punti della curva di Bragg richiede la valutazione della concomitante variazione degli effetti biologici rilevanti, in modo da trasformare le curve isodose in curve isoeffetto. Quando l’auspicato Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica (CNAO) sarà finalmente realizzato a Pavia nel 2010, l’*expertise* del Reparto, dal 2009 diretto da Maria Antonella Tabocchini, sarà poi utilizzata per la caratterizzazione bio-

logica dei fasci del CNAO. Ugualmente, l'esperienza detta troverà un fertile terreno di applicazione nella radioprotezione nello spazio in quanto i meccanismi d'interazione con la materia biologica delle particelle cariche considerate nella radioterapia con adroni (protoni e ioni più pesanti) sono in gran parte comuni a quelli delle particelle cariche presenti nella radiazione spaziale e le competenze sviluppate all'ISS nella radiobiologia adronica si mostrano preziose per queste applicazioni. Così dal 2000 il Reparto sarà coinvolto, su proposta della NASA ed assieme ad altri gruppi italiani, in progetti supportati dall'Agenzia Spaziale Italiana per svolgere esperimenti al NASA Space Radiation Laboratory a Brookhaven (USA) e al National Institute of Radiological Sciences (NIRS) di Chiba (Giappone).

Questa sommaria carrellata sullo sviluppo della Biofisica delle Radiazioni avrebbe una grave lacuna se non si menzionasse il ruolo svolto dalla Società Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni (SIRR) fondata a Roma il 4 marzo 1983 da Marcello Quintiliani (che ne divenne il primo Presidente), Giorgio Arcangeli, Marcello Benassi, Carissimo Biagini, Gloria Campos Venuti, Mario Coppola, Francesco Mauro e Giovanni Silini. La SIRR, come si legge nello Statuto, si propone di riunire i cultori di discipline che prevedono l'impiego delle radiazioni, allo scopo di promuovere il progresso della ricerca scientifica interdisciplinare nel campo delle radiazioni ionizzanti e non ionizzanti. Alla SIRR si deve il merito di aver riunito nella Società vari gruppi italiani attivi nel settore, di aver disseminato le informazioni sui risultati di queste ricerche e di aver favorito i contatti internazionali attraverso l'Associazione "madre", l'International Association for Radiation Research. A questa crescita darà importanti contributi l'allora Laboratorio delle Radiazioni con Gloria Campos Venuti ed il Reparto di Biofisica delle Radiazioni (in seguito divenuto reparto di Biofisica) vi sarà particolarmente presente dando alla SIRR ben tre Presidenti (Mauro Belli, Giustina Simone, Maria Antonella Tabocchini).

Struttura e dinamica di macromolecole

Filomena Mazzei

Quando ricordo gli inizi della mia attività nel Laboratorio di Fisica dell'Istituto Superiore di Sanità non posso fare a meno di pensare che la prova scritta del concorso per l'assunzione aveva ri-

guardato “Le onde in Fisica classica ed in Fisica moderna”. Non so se questo abbia in qualche modo segnato l’impostazione del mio lavoro nel Laboratorio di Fisica, ma mi rendo conto che, pur senza dimenticare le finalità istituzionali dell’Istituto e pur contribuendo io stessa alla promozione e allo svolgimento di attività più finalizzate (come nel caso della radioprotezione del paziente), ho costantemente dedicato parte del mio tempo a ricerche di tipo fondamentale utilizzando sistemi semplici e modelli matematici per l’interpretazione dei dati sperimentali.

Il Laboratorio di Fisica negli anni ’80 sembrava essere il posto giusto per tentare una mediazione tra ricerca di base e ricerca applicata, e così la mia passione per lo studio della struttura e dinamica degli acidi nucleici si è naturalmente incrociata con quella dell’effetto delle radiazioni sul DNA, in particolare l’ultravioletto, che ho condiviso con Mirella Matzeu per molti anni. Molti nostri studi furono inizialmente rivolti alla comprensione degli effetti delle radiazioni UV sulla struttura secondaria e terziaria e sulle proprietà termodinamiche del DNA, ma l’idea che la conformazione del DNA potesse anche essere un elemento di modulazione nella distribuzione del danno da radiazioni fu verificata dal nostro gruppo solo qualche anno dopo.

Erano gli anni in cui si cominciava a capire che altre forme del DNA, oltre alla classica forma B, erano possibili e che la struttura tridimensionale del DNA era fortemente influenzata dalla sequenza delle basi (1). Marini *et al.* (2), avevano pubblicato i risultati di una ricerca in cui si dimostrava che un frammento del DNA di cinetoplasto di *L. tarentolae* migrava in modo anomalo in un gel, dato non consistente con il suo reale peso molecolare, e provava l’esistenza di una forma di DNA naturalmente curva. Questo studio stimolò molto la nostra curiosità; avremmo dimostrato in seguito con Flavia Barone e Mauro Belli che la conformazione del DNA poteva influenzare la distribuzione delle singole rotture, prodotte in seguito all’esposizione alle radiazioni, utilizzando un frammento di DNA “curvo” da *Crithidia fasciculata* e l’irraggiamento con radiazione gamma (3).

Alla ricerca del modello più semplice su cui testare le nostre ipotesi, con Mirella iniziammo a utilizzare oligonucleotidi sintetici, di lunghezza e sequenza definita, in cui singoli difetti o lesioni specifi-

che, introdotte in fase di sintesi, si proponevano di simulare l'effetto dei danni indotti sul DNA da agenti chimici o fisici. Accanto all'analisi termodinamica cominciammo ad affiancare altri metodi fisici quali l'elettroforesi (ora tecnica assai diffusa in tutti i laboratori), la spettrofotometria UV, il dicroismo circolare, la dispersione dielettrica (4). L'idea di base era che se la sequenza del DNA era così rilevante per la definizione della struttura terziaria, allora anche piccole perturbazioni, quali quelle determinate dall'introduzione di danni, potevano rivelarsi significative. Attraverso la modificazione dell'orientamento relativo delle basi, della larghezza dei solchi del DNA, e quindi della struttura tridimensionale, esse potevano costituire anche un motivo strutturale di riconoscimento per le proteine della riparazione del DNA. Questa ipotesi era più facilmente verificabile in un contesto in cui la sequenza del DNA era nota, grazie all'uso di oligonucleotidi sintetici, e le modifiche controllate nel tipo, numero e posizione. In definitiva, tale approccio consentiva una più rigorosa interpretazione del risultato sperimentale.

Il passo successivo fu pensare al DNA come a una struttura in movimento. Iniziammo così con Francesco Pedone, professore di Macromolecole biologiche dell'Università Sapienza di Roma, uno studio sulle proprietà dinamiche di frammenti di DNA aventi sequenze particolari, con l'obiettivo di misurare le loro proprietà elastiche ed in particolare la rigidità rispetto alla torsione, parametro che pensavamo rilevante anche nell'interazione del DNA con le proteine. A tale scopo utilizzammo la tecnica dell'anisotropia di polarizzazione della fluorescenza. Ai piccoli frammenti di DNA a doppia elica facevamo intercalare il bromuro di etidio che, eccitato con luce di opportuna lunghezza d'onda, fluoresce. Confrontando DNA con la stessa composizione in basi ma diversa distribuzione dimostrammo che la sequenza del DNA influenza fortemente la sua dinamica (5). Analogamente dimostrammo che anche la presenza di strutture insolite, come le triple eliche, si rifletteva su tali proprietà (6). Ancora più interessante fu stabilire che un singolo danno – allora studiammo il danno prodotto nel DNA dall'ossidazione della guanina (8-oxoguanina) – poteva modificare sensibilmente la rigidità del DNA (7) e costituire un segnale per il suo riconoscimento e riparazione da parte di specifici enzimi (8).

Tutte queste ricerche furono svolte con un costo assai limitato, anticipando uno stile di lavoro che oggi, a causa della riduzione dei finanziamenti per l'acquisto di nuova strumentazione, sta diventando pratica comune e necessaria. La maggior parte degli strumenti che servì per questa attività di ricerca fu messa a disposizione da colleghi dell'Istituto, che per varie ragioni non ne avevano più bisogno. Così il tavolo antivibrante e un vecchio laser vennero dal laboratorio di Martino Grandolfo e Paolo Vecchia, il fluorimetro K2-ISS da Orazio Sapora, Claudio Ranghiasi aiutò Francesco Pedone a "rattoppare" letteralmente il tubo del laser con fibre di carbonio e riuscimmo a lavorare. Questa fu anche l'occasione per iniziare una collaborazione con un gruppo di entusiasti giovani ricercatori dell'Università di Milano, tra cui Giberto Chirico e Maddalena Collini, che in quegli anni stavano mettendo a punto tecniche di fluorescenza dinamica per lo studio di biomolecole. La loro collaborazione fu preziosa anche in seguito, quando mi interessai allo studio della dinamica in sistemi di "quasi" singola molecola. Usammo in questo caso la spettroscopia di correlazione di fluorescenza a due fotoni per studiare l'attività di alcuni enzimi coinvolti nella riparazione del danno ossidativo nel DNA (9). Si trattava allora di un modo innovativo di studiare i sistemi biologici rispetto all'approccio dominante che, misurando proprietà di insieme e fornendo informazioni sulle caratteristiche medie, non permetteva la descrizione dell'eterogeneità presente nei sistemi in studio.

Valutando a ritroso queste intense esperienze di collaborazione non posso fare a meno di notare i cambiamenti avvenuti negli ultimi anni. Naturalmente l'attitudine al lavoro di *équipe* e allo scambio disinteressato di esperienze e di proposte di ricerca continua a rappresentare una costante dell'attività scientifica anche nel nostro Istituto, ma è tuttavia evidente che le occasioni per esercitare questo stile di lavoro tendono progressivamente a diminuire. Gran parte del tempo disponibile rischia ormai di essere assorbito dalla ricerca di fondi per progetti a carattere sempre più finalizzato e vengono meno in questo modo le occasioni per un'esplorazione di temi a carattere più generale, certamente più esposti a insuccessi, ma anche più promettenti nella individuazione di nuove linee di ricerca.

Vengono di seguito riportati i riferimenti bibliografici relativi a ciascun contributo

Bibliografia del contributo di Clara Frontali

1. Ageno M. *Introduzione alla Biofisica*. Milano: Mondadori; 1973.
2. Ageno M. Deoxyribonucleic acid code. *Nature* 1962;195:998-9.
3. Frontali C, Hill LR, Silvestri LG, The Base composition of deoxyribonucleic acid of Streptomyces. *J Gen Microbiol* 1965;38:243-50.
4. Aurisicchio S, Dore E, Frontali C, Gaeta F, Toschi G. Chromatographic purification of one of the complementary strands of phage α DNA. *Biochim Biophys Acta* 1964;80:514-6.
5. Ageno M, Dore E, Frontali C, Arcà M, Frontali L, Tecce G, Interaction between denatured DNA and RNA involving only one strand. *J Mol Biol* 1966;15:555-72.
6. Ageno M, Dore E, Frontali C. The alkaline denaturation of DNA. *Biophys J* 1969;9:1281-311.
7. Ageno M, Dore E, Frontali C. An analysis of the hyperchromic spectra of alkali-melted DNA. *Biopolymers* 1970;9:116-23.
8. Dore E, Frontali C, Gratton E. The role of ions in the acid melting of DNA. *Biopolymers* 1972;11:2033-41.
9. Cancellieri A, Frontali C, Gratton E. Dispersion effect on turbidimetric size measurement. *Biopolymers* 1974;13:735-43.
10. Dore E, Frontali C, Grignoli M. The molecular complexity of phage G DNA. *Virology* 1977;79:442-8.
11. Dore E, Frontali C, Gratton E. Physico-chemical description of a condensed form of DNA. *Biopolymers* 1972b; 11: 443-459.
12. Dore E, Frontali C, Gratton E. The effect of temperature on acid condensation of DNA. *Biopolymers* 1973;12:1171-6.
13. Dore E, Frontali C, Notargiacomo S. Electron microscopic observation of DNA condensates at low pH values. *J Mol Biol* 1973;78:391-3.
14. Donelli G, Dore E, Frontali C, Grandolfo ME. Structure and physico-chemical properties of bacteriophage G: a homogeneous DNA of molecular weight 5.108. *J Mol Biol* 1975;94:555-65.
15. Frontali C, Dore E, Ferrauto A, Gratton E, Bettini A, Pozzan MR, Valdevit E. An absolute method for the determination of the persistence length of native DNA from electron micrographs. *Biopolymers* 1979;18:1353-73.
16. Bettini A, Pozzan MR, Valdevit E, Frontali C. Microscopic persistence length of native DNA: its relation to average dimensions. *Biopolymers* 1980;19:1689-94.
17. Frontali C. Excluded volume effect on the bidimensional conformation of DNA molecules adsorbed to protein films. *Biopolymers* 1988;27:1329-31.

Bibliografia del contributo di Mauro Belli

1. Reale Scafati A. 1967. Streptomycin suppression of ambivalent phage mutations. *Virology* 32:543-552.
2. Reale Scafati A, Araco A, Belli M, Falbo V, Giorgi C, Maggini M. 1976. Unfolding of E.coli ribosomes: evidence for pre-existing breaks in the large subunit. *Nucleic Acids Res* 3:2171-2182.
3. Belli M. 1973. The evaluation of standard sedimentation coefficient in band sedimentation of macromolecules. *Biopolymers* 12:1853-64.
4. Araco A, Belli M, Giorgi C, Onori G. 1975. The secondary structure of *E. coli* ribosomes and ribosomal RNAs: a spectrophotometric approach. *Nucleic Acids Res* 2:373-81.
5. Belli M, Onori G, Araco A, Giorgi C. 1976. Changes in the ultraviolet absorption of *E. coli* rRNA on ribosome unfolding. *Biopolymers* 15:1229-32.
6. Onori G, Araco A, Belli M, Giorgi C. Spectroscopic studies on the unfolding of *E. coli* ribosomes. *Studia Biophysica* 1977;65:155-60.
7. Araco A, Belli M, Onori G. Structure changes of *E. coli* rRNA on ribosome unfolding. *Studia Biophysica* 1979;75:25-30.
8. Araco A, Belli M, Mazzei F, Onori G. Spectroscopic studies of the structure of the RNA in the ribosome. Influence of Mg^{++} ions and ribosomal proteins. *Studia Biophysica* 1980;78:57-71.
9. Araco A, Belli M, Mazzei F, Onori G. Metal ions in RNA structure. *Studia Biophysica* 1981;84:11-2.
10. Belli M, Scafati A, Bianconi A, Mobilio S, Palladino L, Reale A, Burattini E. X-ray absorption near edge structures (Xanes) in simple and complex Mn compounds. *Solid State Commun* 1980;35:355-61.
11. Belli M, Scafati A, Bianconi A, Burattini E, Mobilio S, Natoli CR, Palladino L, Reale A. EXAFS and XANES structure determination of Mn^{++} binding in ATP complexes. *Il Nuovo Cimento* 1983;2D:1281-304.
12. Belli M, Bianconi A, Burattini E, Mobilio S, Natoli CR, Palladino L, Reale A, Scafati A. Mn(II) binding to nucleotides and nucleic acids. In: Bianconi A, Incochia L, Stipcich S (Eds). *EXAFS and NEAR edge structure*. (Springer Series in Chemical Physics 27). Berlin, Heidelberg, New York, Tokio: Springer Verlag; 1983. p. 345-8.
13. Rongoni E, Scafati A, Matzeu M, Belli M, Onori G, Reale A, Balerna A, Bianconi A, Bernieri E. UV-induced reduction of Cu(II) in DNA complex studied by Cu-K-edge XANES. *Biopolymers* 1986; 25:217-21.
14. Onori G, Belli M, Scafati A, Mobilio S, Bernieri E, Bianconi A, Garcia J. Study of Cu-ATP complexes. In: Bianconi A, Castellano AC (Eds). *Biophysics and synchrotron radiation*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1987. p. 212-22.
15. Onori G, Santucci A, Scafati A, Belli M, Della Longa S, Bianconi A, Palladino L. Cu K-Edge XANES of Cu(II) ions in aqueous solution: a measure of the axial ligand distances. *Chemical Physics Lett* 1988;149:289-94.

16. Onori G, Santucci A, Scafati A, Belli M, Della Longa S, Bianconi A, Palladino L. Study of Cu(II)-ATP complexes by Xanes spectroscopy. *Physica B* 1989;158:128-32.
17. Palladino L, Della Longa S, Reale A, Belli M, Scafati A, Onori G, Santucci A. X-ray absorption near edge structure (XANES) of Cu (II) ATP and related compounds in solution. Quantitative determination of the distortion. *J Chem Phys* 1993;98(4):2720-6.
18. Belli M, Onori G, Quaranta OM, Tabocchini MA. UV induced conformational changes in nucleosomal DNA. *Medecine Biologie Environ* 1982;10:227-230.
19. Barone F, Belli M, Rongoni E, Sapora O, Tabocchini MA. X-Ray induced DNA double strand breaks in polynucleosomes. In: Burns FJ, Upton A, Silini G (Eds). *Radiation carcinogenesis and DNA alterations*. Plenum Publishing Corporation;1986. p. 293-6.
20. Sapora O, Barone F, Belli M, Maggi A, Quintiliani M, Tabocchini MA. Relationships between cell killing, mutation induction and DNA damage in X-irradiated V79 cells: the influence of oxygen and DMSO. *Int J Radiation Biol* 1991;60:467-82.
21. Belli M, Cherubini R, Galeazzi G, Mazzucato S, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini MA. Proton irradiation facility for radiobiological studies at a 7 MV Van de Graaff accelerator. *Nucl Instrum Meth Phys Res* 1986;A256:576-80.
22. Belli M, Cherubini R, Finotto S, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini MA. Relative biological effectiveness of low energy protons for cell inactivation. *Physica Medica* 1987;III,2:79-82.
23. Belli M, Cherubini R, Finotto S, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini MA. RBE-LET relationship for the survival of V79 cells irradiated with low energy protons. *Int J Radiation Biol* 1989;55:93-104.
24. Belli M, Cera F, Cherubini R, Ianzini F, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini MA, Tiveron P. Mutation induction and RBE-LET relationship of low-energy protons in V79 cells. *Int J Radiation Biol* 1991;59:459-65.
25. Belli M, Cera F, Cherubini R, Ianzini F, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini MA, Tiveron P. RBE-LET relationship for survival and mutation induction of V79 cells irradiated with low-energy protons: re-evaluation of the LET values at the LNL facility. *Int J Radiat Biol* 1992;61(1):145-6.
26. Goodhead DT, Belli M, Mill AJ, Bance DA, Allen LA, Hall SC, Ianzini F, Simone G, Stevens DL, Stretch A, Tabocchini MA, Wilkinson RE. Direct comparison between protons and alpha-particles of the same LET. I. Irradiation methods and inactivation of asynchronous V79, HeLa and C3H 10T1/2 cells. *Int J Radiat Biol* 1992;61(5):611-24.
27. Belli M, Goodhead DT, Ianzini F, Simone G, Tabocchini AM. Direct comparison of biological effectiveness of protons and alpha-particles of the same LET. II. Mutation induction at the HPRT locus in V79 cells. *Int J Radiat Biol* 1992;61(5):625-9.
28. Jenner TJ, Belli M, Goodhead DT, Ianzini F, Simone G, Tabocchini MA. Direct comparison of biological effectiveness of protons and alpha-particles of the same LET. III. Initial yield of DNA double-strand breaks in V79 cells. *Int J Radiat Biol* 1992;61(5):631-7.

29. Belli M, Cera F, Cherubini R, Ianzini F, Moschini G, Sapora O, Simone G, Tabocchini MA, Tiveron P. DNA double-strand breaks induced by low energy protons in V79 cells. *Int J Radiat Biol* 1994;65:529-36.
30. Cera F, Cherubini R, Dalla Vecchia M, Favaretto S, Moschini, Tiveron P, Belli M, Ianzini F, Levati L, Sapora O, Tabocchini MA, Simone G. Cell inactivation, mutation and DNA damage induced by light ions: dependence on radiation quality. In: Goodhead D, O'Neill P, Menzel H (Eds). *Microdosimetry. An interdisciplinary approach*. 1997. p. 191-4.
31. Belli M, Cherubini R, Dalla Vecchia M, Dini V, Moschini G, Signoretti C, Simone G, Tabocchini MA, Tiveron P. DNA DSB induction and rejoining in V79 cells irradiated with light ions: a constant field gel electrophoresis study. *Int J Radiat Biol* 2000;76:1095-104.
32. Palladino L, Reale A, Taglieri G, Batani D, Bollanti S, Di Lazzaro P, Flora F, Letardi T, Schina G, Belli M, Scafati A. XUV Generation from plasma produced by a XeCl excimer laser on a Cu target. *Il Nuovo Cimento* 1993;15D:1133-46.
33. Bollanti S, Di Lazzaro P, Flora F, Giordano, Letardi T, Schina G, Zheng CE, Filippi L, Palladino L, Reale A, Taglieri G, Batani D, Mauri A, Belli M, Scafati A, Reale L, Albertano P, Grilli A, Faenov, Pikuz T, Cotton R. Long-duration soft X-ray pulses by XeCl laser driven plasmas and applications. *J X-Ray Sci Technol* 1996;5:261-77.
34. Belli M, Nottola A, Flora F, Jin T. Irradiation of cultured mammalian cells with ultrasoft X-rays: experimental set-up and dose calculation for non-monochromatic beams. *Radiat Phys Chem* 1999;54:393-402.
35. Bollanti S, Cotton R, Di Lazzaro P, Flora F, Letardi T, Lisi N, Batani D, Conti A, Mauri A, Palladino L, Reale A, Belli M, Ianzini F, Scafati A, Reale L, Tabocchini MA, Albertano P, Faenov AY, Pikuz T, Oesterheld A. Development and characterisation of an XeCl excimer laser-generated soft-X-ray plasma source and its applications. *Il Nuovo Cimento* 1996;18:1241-55.
36. Flora F, Bollanti S, Di Lazzaro S, Giordano G, Letardi T, Nottola A, Marinai A, Vigli-Papadaki K, Schina G, Albertano P, Palladino L, Reale A, Belli M, Ianzini F, Tabocchini AM, Grilli A, Ya Faenov A, Pikuz T. 1999. Applications of a soft X-ray plasma source pumped by a long pulse excimer laser. In: Corcoran VJ, Goldman TA (Eds). *Proceedings of the International Conference on Lasers '98*. Tucson, AZ, December 7-11, 1998. McLean, VA. STS Press; 1999. p. 454-61.
37. Barone F, Belli M, Mazzei F. Influence of DNA conformation on radiation-induced single-strand breaks. *Radiat Environ Biophys* 1994;33:23-33.
38. HLEG. *High Level and Expert Group Report on European Low Dose Risk Research-Radiation Protection*. Office for Official Publications of the European Communities: European Commission EUR 23884; 2009.

Bibliografia del contributo di Filomena Mazzei

1. Wells RD, Goodman TC, Hillen W, Horn GT, Klein RD, Larson JE, Muller UE, Neuendorf SK, Panayotatos N, Stirdivant SM. DNA structure and gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1980;24:167-267.
2. Marini JC, Levene SD, Crothers DM, Englund PT. Bent helical structure in kinetoplast DNA. *Proc Natl Acad Sci* 1982;79:7664-8.

3. Barone F, Belli M, Mazzei F. Influence of DNA conformation on radiation-induced single-strand breaks. *Rad Env Biophys* 1994;33:23-33.
4. Bonincontro A, Matzeu M, Mazzei F, Minoprio A, Pedone F. Influence of defects on the electrophoretic, thermodynamic and dielectric properties of a 21 base pair DNA in solution. *Biochim Biophys Acta* 1993;1171(3):288-94.
5. Barone F, Matzeu M, Mazzei F, Pedone F. Structural and dynamical properties of two DNA oligomers with the same base composition and different sequence. *Biophys Chem* 1999;78:259-69.
6. Barone F, Chirico G, Matzeu M, Mazzei F, Pedone F. Triple helix DNA oligomer melting measured by fluorescence polarization anisotropy. *Eur Biophys J* 1998;27:137-46.
7. Barone F, Cellai L, Giordano C, Matzeu M, Mazzei F, Pedone F. Gamma-Ray footprinting and fluorescence polarization anisotropy of a 30-mer synthetic DNA fragment with one 2'-deoxy-7-hydro-8-oxoguanosine lesion. *Eur Biophys J* 2000;28:621-8.
8. Barone F, Dogliotti E, Cellai L, Giordano C, Bjoras M, Mazzei F. Influence of DNA torsional rigidity on excision of 7,8-dihydro-8-oxo-2-deoxyguanosine in the presence of opposing abasic sites by human OGG1 protein. *Nucleic Acids Res* 2003;31:1897-1903.
9. Collini M, Caccia M, Chirico G, Barone F, Dogliotti E, Mazzei F. Two-photon fluorescence cross-correlation spectroscopy as a potential tool for high throughput screening of DNA repair activity. *Nucleic Acids Res* 2005;33:165.