

PID – Programma INFN per la Didattica 2024
8-12 Aprile 2024



RADIOBIOLOGIA UNDERGROUND ai *Laboratori Nazionali del Gran Sasso*



Patrizia MORCIANO

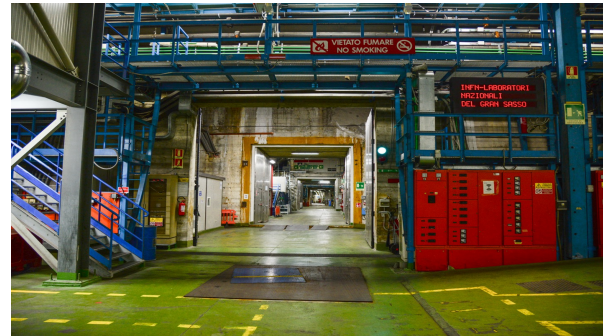
Laboratori Nazionali del Gran Sasso (LNGS)

Main mission: search for rare processes

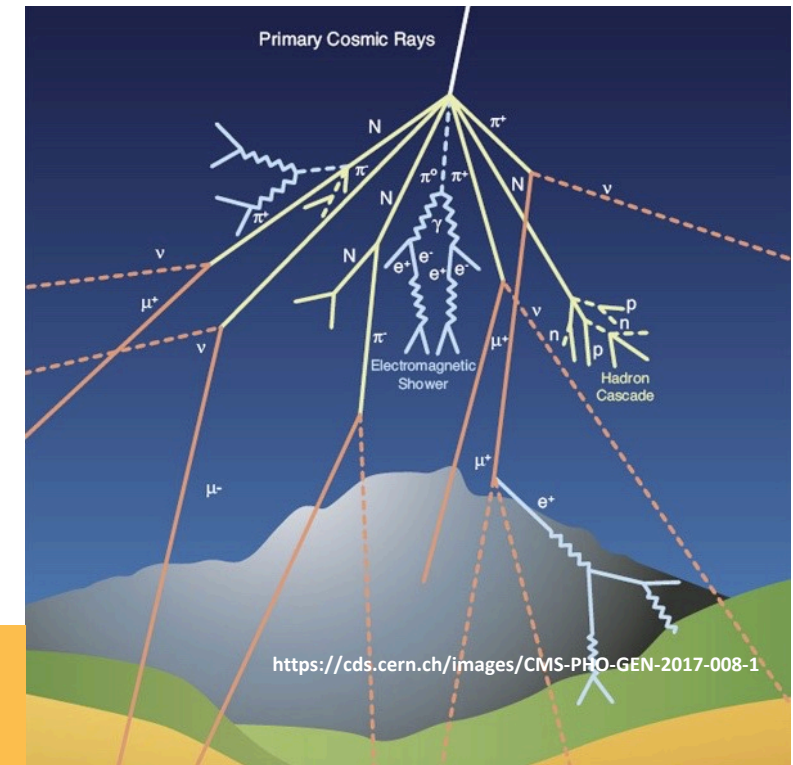
- proton decay
- neutrino interactions
- dark matter



LNGS Above-ground location



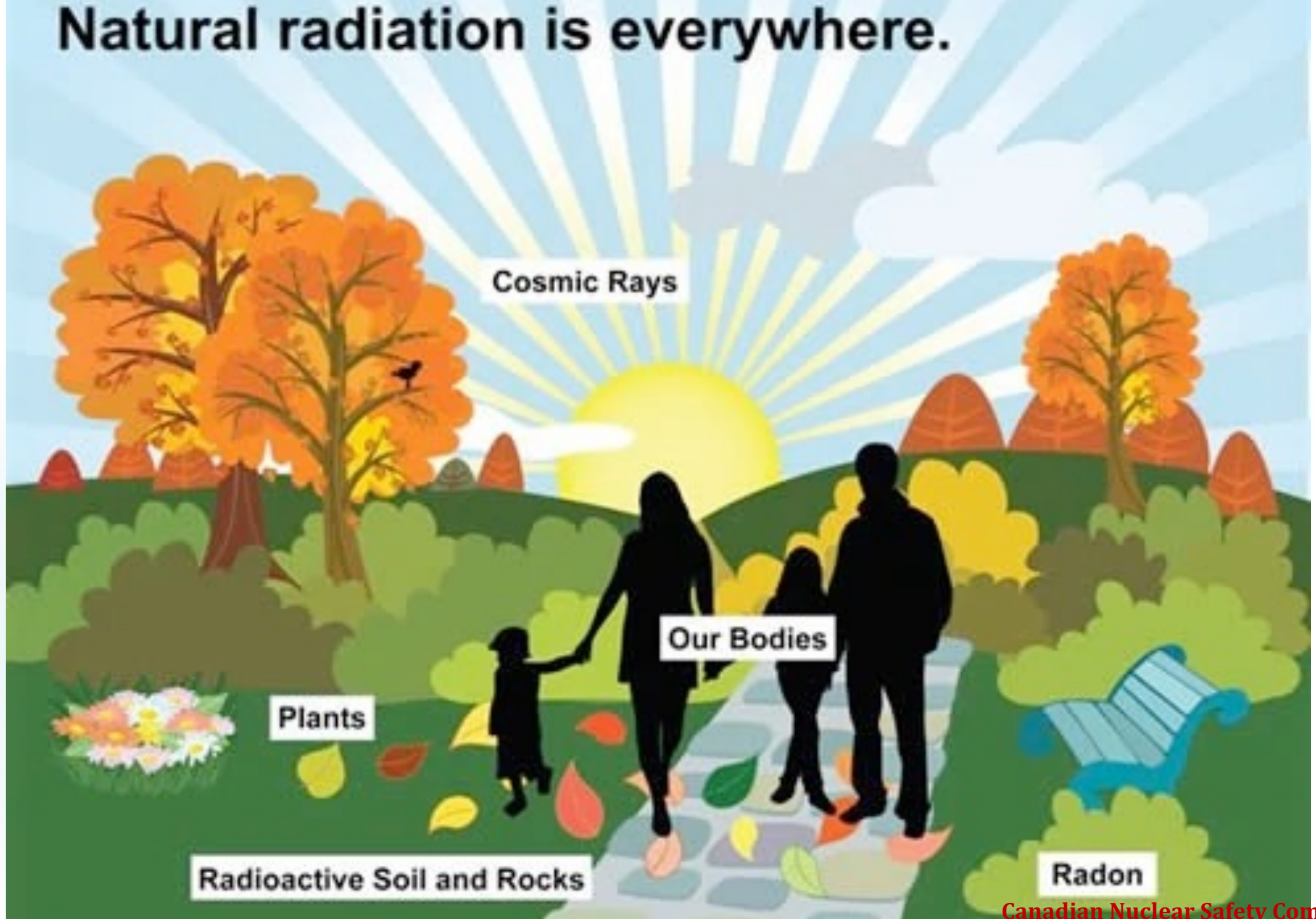
LNGS Underground location



LNGS ed il suo ambiente a bassissima radioattività ambientale offrono un'opportunità per condurre esperimenti di **UNDERGROUND RADIOBIOLOGIA**

- La **RADIAZIONE NATURALE AMBIENTALE** ha un'influenza sul metabolismo dei sistemi viventi?
- Cosa succede ad un organismo quando **RADIAZIONE NATURALE AMBIENTALE** è fortemente ridotta?

Natural radiation is everywhere.



Cosmic Rays

Our Bodies

Plants

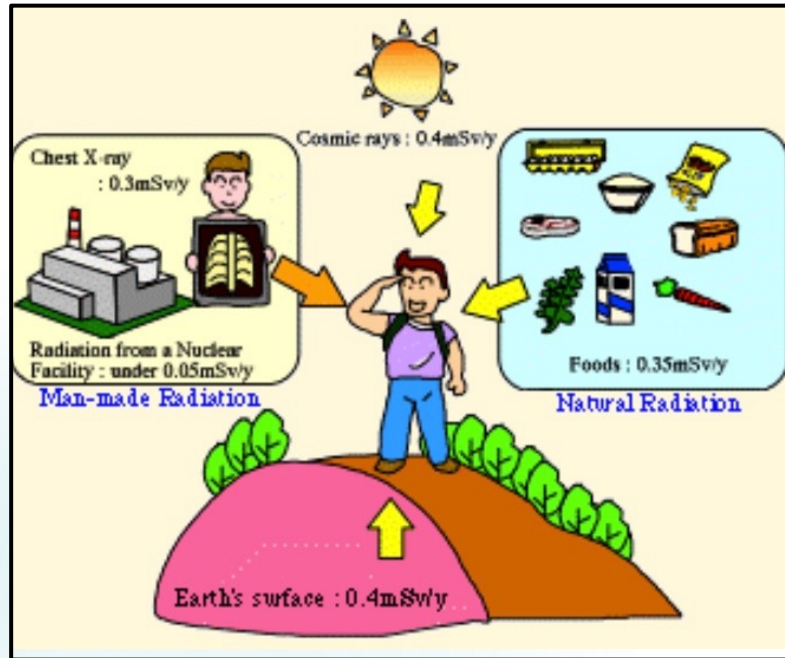
Radioactive Soil and Rocks

Radon

Esposizione alla radiazione è inevitabile per l'uomo

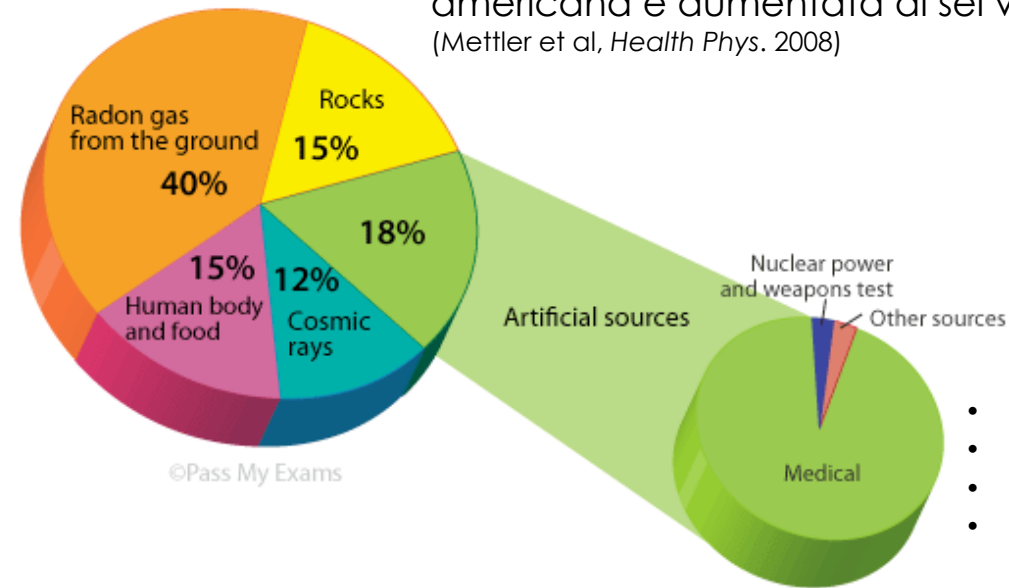
RADIAZIONE NATURALE AMBIENTALE + Radiazione artificiale

World average 2,4 mSv/year (**BEIR VII**)
Italy 3,4 mSv/year



<https://www.jaea.go.jp/english/index.html>

È stato calcolato che l'esposizione alle radiazioni ionizzanti per scopi medici nella popolazione americana è aumentata di sei volte dal 1982 al 2006. (Mettler et al, *Health Phys.* 2008)



- X-ray imaging
- TAC
- Oncologic radiotherapies
- Security Scanner

ICRP
INTERNATIONAL COMMISSION ON
RADIOLOGICAL PROTECTION

L'ICRP fissa il limite di esposizione professionale a 20 mSv/a (25 volte inferiore al limite ICRP-1931) e il limite per la popolazione generale a 1 mSv/a (500 volte inferiore).

United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation

SOURCES, EFFECTS AND RISKS OF IONIZING RADIATION
UNSCEAR 2017 Report

Report to the General Assembly
SCIENTIFIC ANNEXES A and B

" A systematic examination of the risks associated with radiation exposure at low doses and low dose rates is, therefore, particularly timely. "

Effetti biologici delle radiazioni ionizzanti

Le **radiazioni ionizzanti (IR)** rompono i legami chimici.

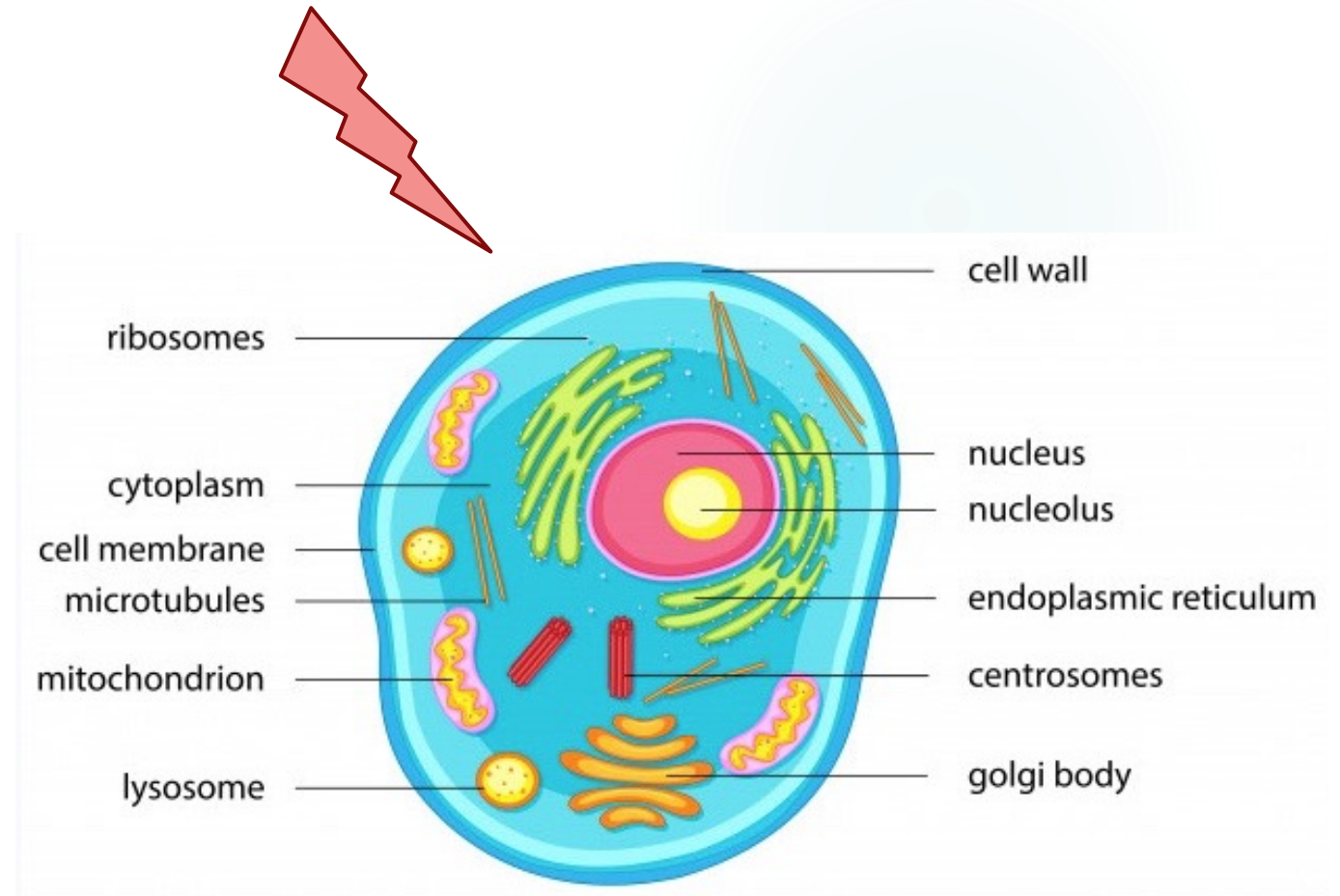
Le IR creano **radicali liberi e ROS**, come quelli prodotti da altri insulti e dai normali processi cellulari dell'organismo.

I radicali liberi e i ROS possono **modificare le biomolecole** (lipidi, proteine, acidi nucleici) nelle cellule dell'organismo, cambiando la funzione cellulare (**azione indiretta**).

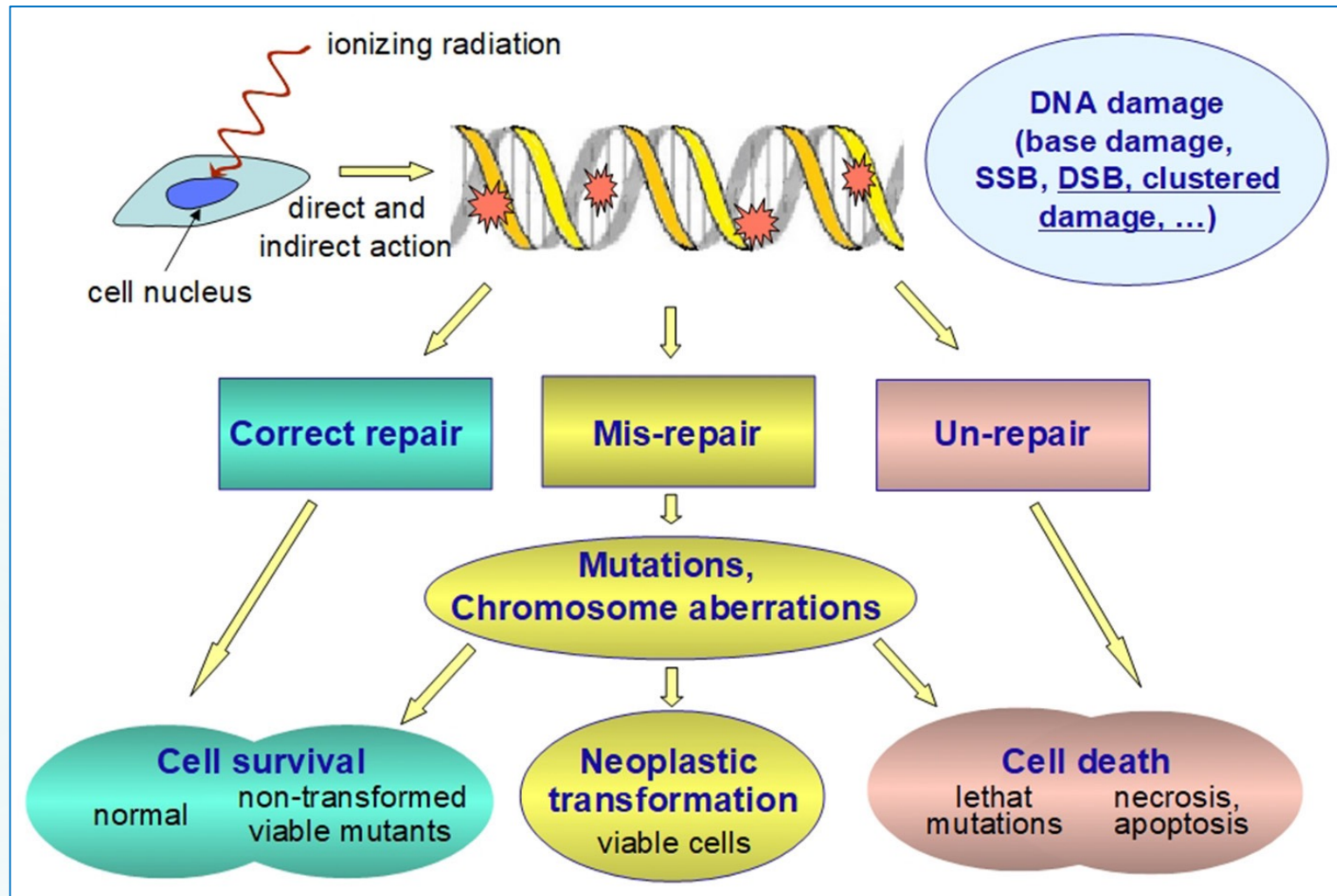
Le radiazioni ionizzanti possono agire direttamente sulle biomolecole (**azione diretta**).

Il bersaglio cellulare più importante è il DNA.

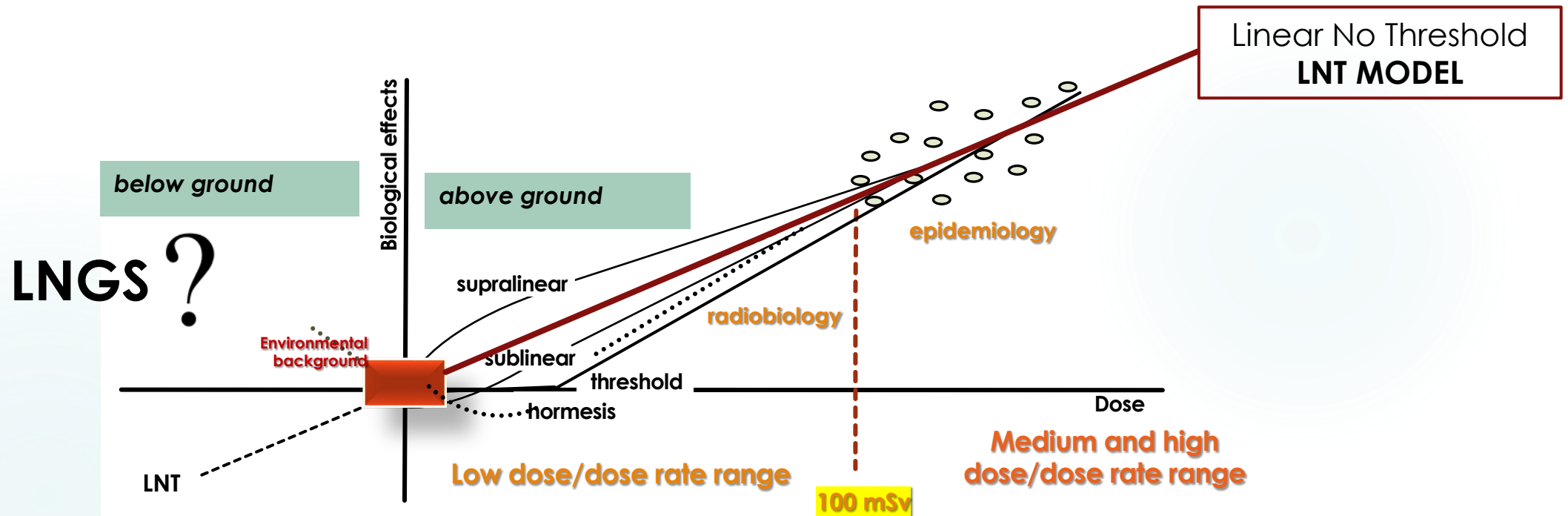
Radiazione: emissione e propagazione di energia sotto forma di **onde elettromagnetiche o di particelle** che si propagano nello spazio (suono, luce, calore..).



Effetti biologici delle radiazioni



Effetti biologici delle radiazioni



La comprensione del modo in cui le **radiazioni ambientali** influenzano la **materia vivente** è un tassello importante per chiarire gli **effetti biologici** delle esposizioni alle radiazioni a bassa dose

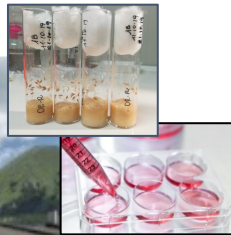
RADIOBIOLOGIA UNDERGROUND ai LNGS

**APPROCCIO SPERIMENTALE:
Colture gemelle e test biologici paralleli**



Laboratorio esterno

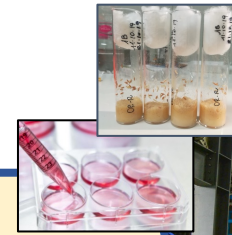
Reference Radiation Environment (RRE)



**Temperatura
Umidità relativa
Luce**

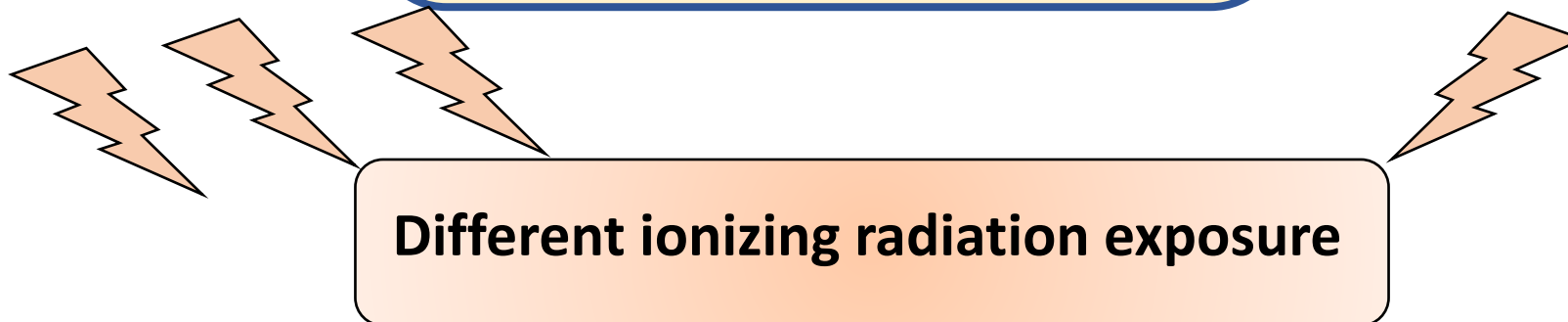
Pressione atmosferica

Terreno di coltura e reagenti



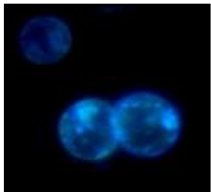
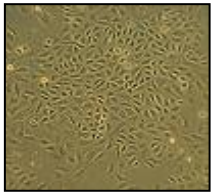
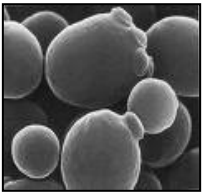
Laboratorio underground

Low Radiation Environment (LRE)



RADIOBIOLOGIA UNDERGROUND ai LNGS

In vitro



Biological model systems investigated at LNGS			
Cultured mammalian cells	Yeast Saccharomyces cerevisiae <i>cultured for 1 week (~120 generations) at LRE and RRE (University of Rome)</i>	Mutation induction (<i>hprt</i> locus)	Satta et al., Mutat Res 1995
	Chinese hamster V79 cells <i>cultured for up to 9-10 months (>120 generations) at LRE and RRE (RRE: Istituto Superiore di Sanità, Rome; external LNGS laboratory)</i>	Cell growth Antioxidant enzymes activity Apoptosis Mutation induction (<i>hprt</i> locus)	Satta et al., Radiat Environ Biophys 2002 Fratini et al., Radiat Environ Biophys 2015
	TK6 human lymphoblasts <i>cultured for up to 6 months at LRE and RRE (Istituto Superiore di Sanità Rome)</i>	Cell growth Micronuclei induction Antioxidant enzymes activity	Carbone et al. Radiat Environ Biophys 2009
	A11 mouse hybridoma cells <i>(short term experiments, few weeks)</i>	Cell proliferation caspase-3 activation PARP1 cleavage	Fischietti et al., Front Public Health 2021
Fly	Fly <i>Drosophila melanogaster</i> <i>(RRE: L'Aquila University)</i>	Life span	Morciano et al., J. Cell Physiol. 2018 Morciano et al., Radiat. Res. 2018 Esposito et al., Front Public Health 2020
		Fertility	
		DNA repair	

LRE: Low Radiation Environment at the INFN-Gran Sasso National Laboratory; RRE: Reference Radiation Environment

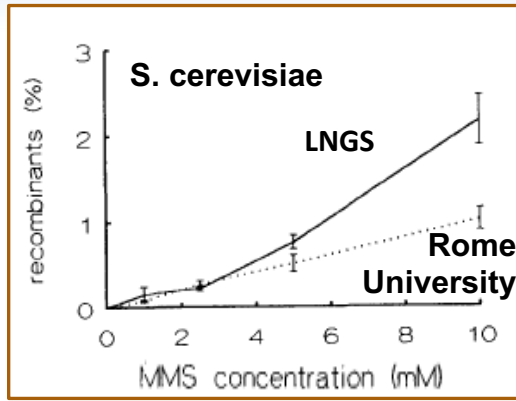
In vivo



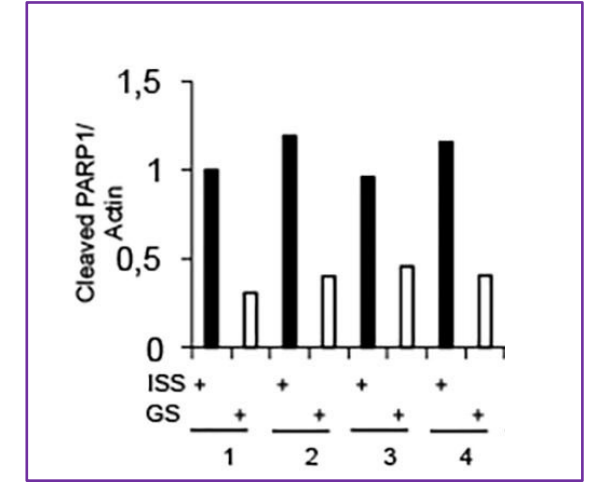
Esperimenti *in vitro* ai LNGS

su cellule eucariotiche rappresentano la più ampia serie di dati che dimostrano che le cellule coltivate in un ambiente a bassa radiazione (LRE) sono:

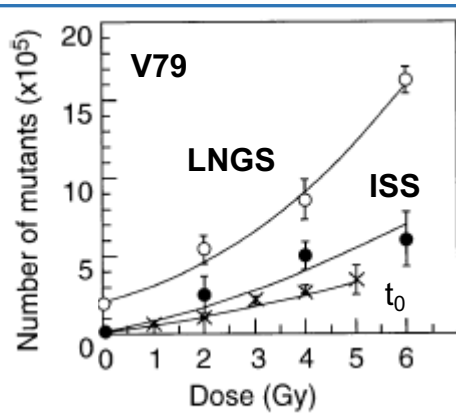
- meno pronte a rispondere al danno indotto al DNA
- meno efficienti nello scavenging delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)
- rispondono in modo diverso allo stress da sovracrescita



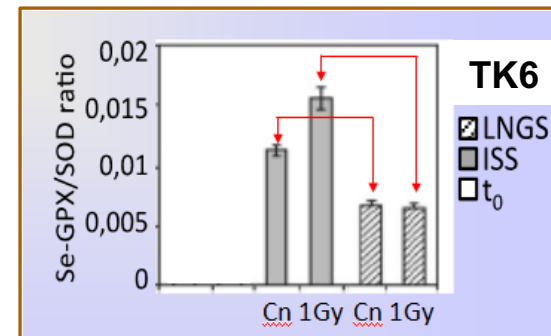
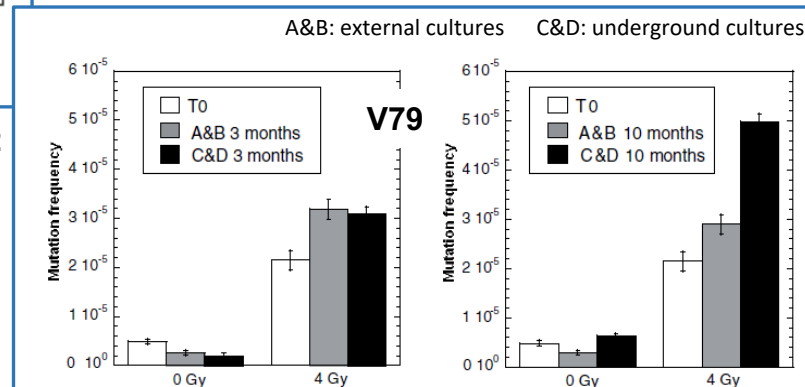
Satta et al., Mut Res 1995



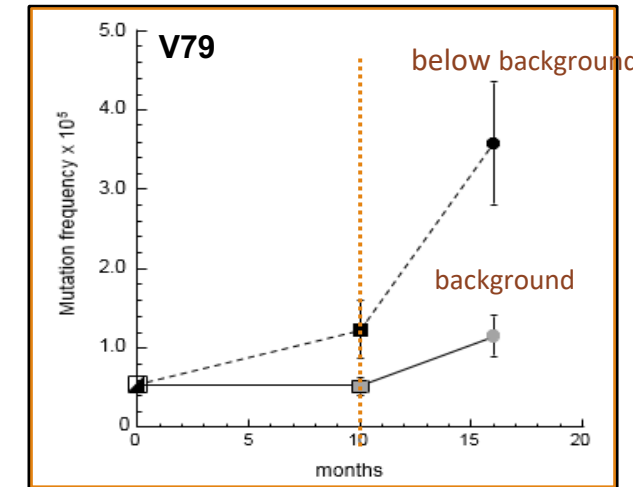
Fischietti et al., Front Public Health 2021



Satta et al., Rad Env Biophys 2002



Carbone et al., Rad Env Biophys 2009



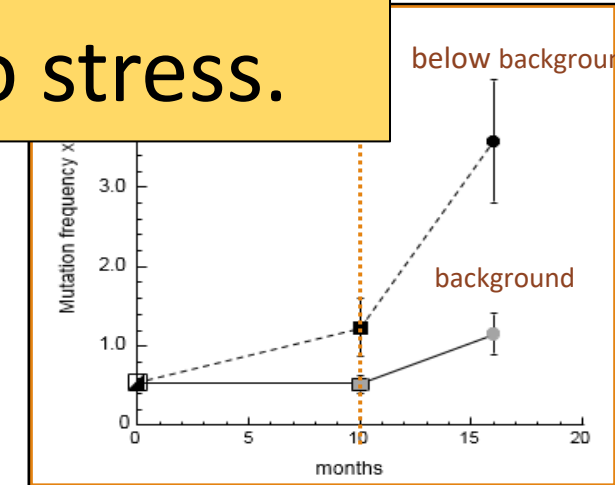
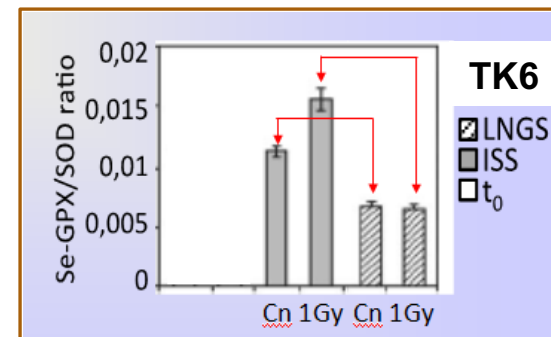
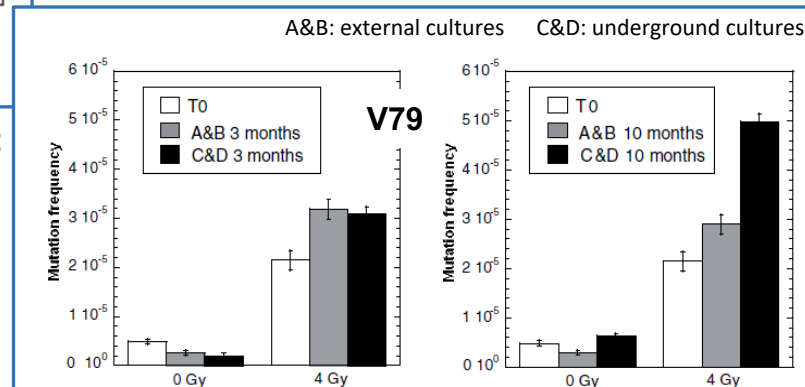
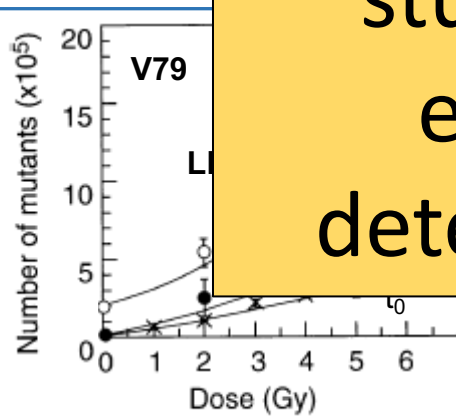
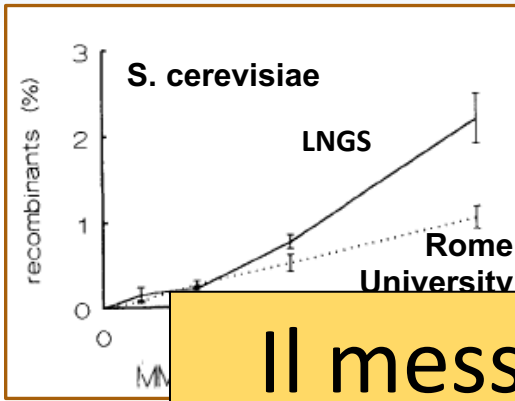
Fratini et al., Rad Env Biophys 2015

Esperimenti *in vitro* di LNGS

su cellule eucariotiche rappresentano la più ampia serie di dati che dimostrano che le cellule coltivate in un ambiente a bassa radiazione (LRE) sono:

➤ **meno pronte a rispondere al danno**

Il messaggio generale che emerge da tutti questi studi è che le radiazioni ambientali innescano efficientemente i meccanismi biologici che determinano la capacità di far fronte allo stress.



Carbone et al., Rad Env Biophys 2009

Fratini et al., Rad Env Biophys 2015

Satta et al., Rad Env Biophys 2002



Dal sistema *in vitro*... al modello *in vivo*

The Flyinglow project

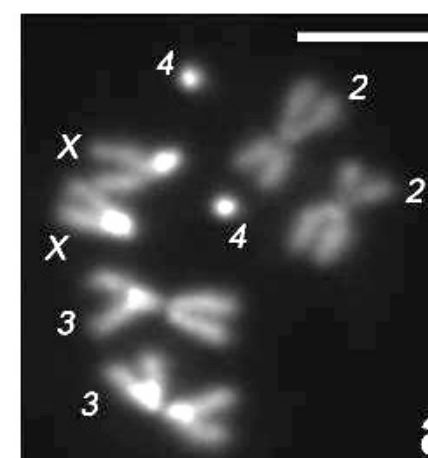
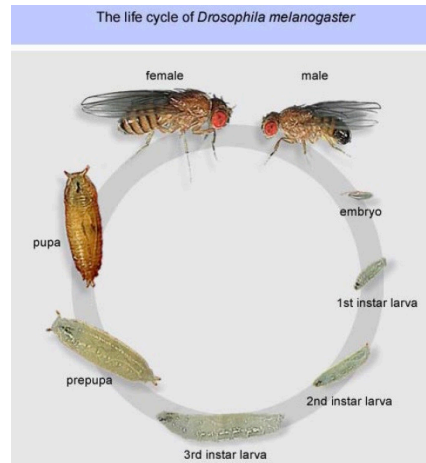
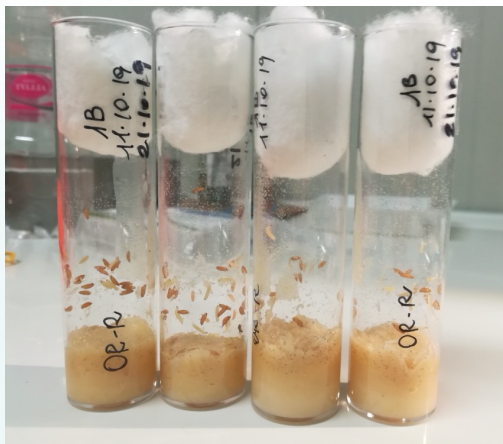
Dal 2016 utilizziamo un sistema modello multicellulare per studiare se e come la riduzione delle radiazioni ambientale influisce sullo sviluppo e sulla crescita di un organismo complesso.

Drosophila melanogaster
o moscerino della frutta



Drosophila come organismo modello

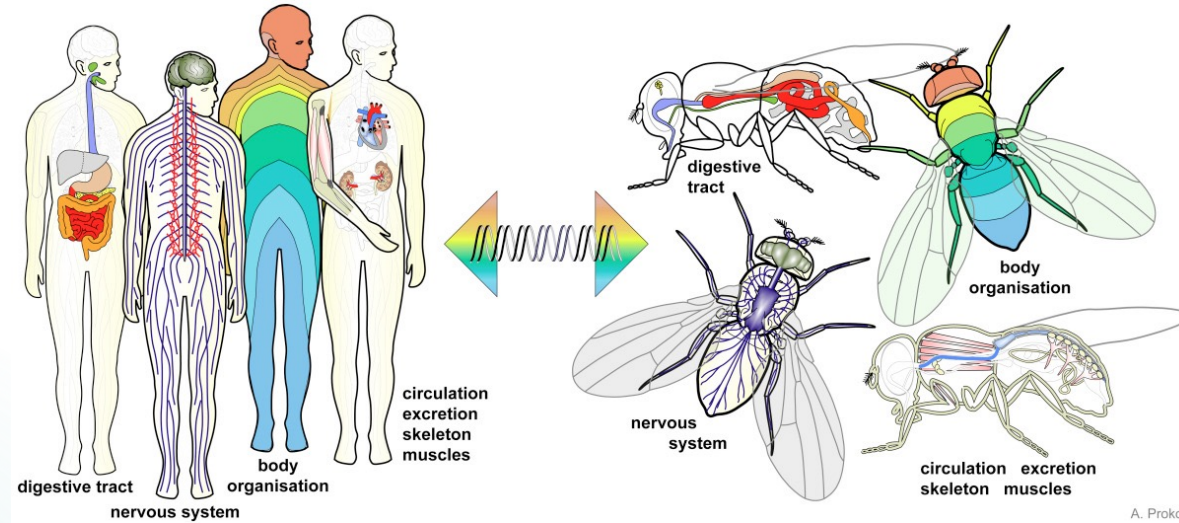
- Facile da coltivare in laboratorio con costi complessivi ridotti
- Ciclo di vita breve: circa 10 giorni dalla fecondazione all'adulto (studi multigenerazionali rapidi)



- Dimensioni ridotte: adulti di 3 mm e uova di 0,5 mm di lunghezza
- Elevata fecondità: una femmina depone fino a 100 uova/giorno.
- La *Drosophila* ha solo 4 coppie di cromosomi e il genoma è stato sequenziato nel 2001.



Drosophila come organismo modello



La maggior parte dei meccanismi biologici fondamentali e dei pathway che controllano lo sviluppo e la sopravvivenza sono conservati attraverso l'evoluzione nell'uomo e nelle mosche.

- ▶ Per quasi tutti gli organi umani esiste una corrispondenza nei moscerini e geni comuni ne regolano lo sviluppo, l'organizzazione e la funzione.
- ▶ Circa il 75% dei geni delle malattie umane ha omologo nei moscerini della frutta.
- ▶ Molte proteine dei moscerini sono codificate da un singolo gene, mentre i genomi dei mammiferi sono ridondanti, rendendo più complicate le manipolazioni genetiche.

Drosophila in radiobiologia



The Fly Room at UT-Austin; Muller is at the right, with loupe (Lilly Library, Indiana University)

In 1927, Hermann J. Muller demonstrates that X-rays can induce **mutations** using fruit flies as experimental model. He received Nobel Prize in 1946. His work is one of the critical contributing factors consolidating the linear-no-threshold (LNT) model as a standard concept for regulation of the human radiation exposure and the model universally adopted for radiation protection.



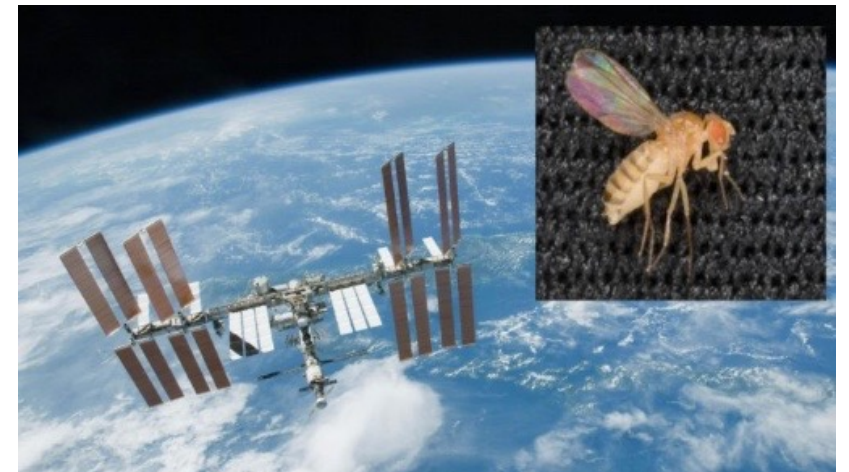
Drosophila was the first animals sent in the **space** (109 km) in 1947 aboard a U.S.-launched V-2 rocket. The purpose of the experiment was to explore the effects of radiation exposure at high altitudes.

<https://www.nasa.gov/ames/fruit-fly-lab>:

Fruit Fly Lab-01 (FFL-01) in January 2015

Fruit Fly Lab-02 (FFL-02) in June 2017

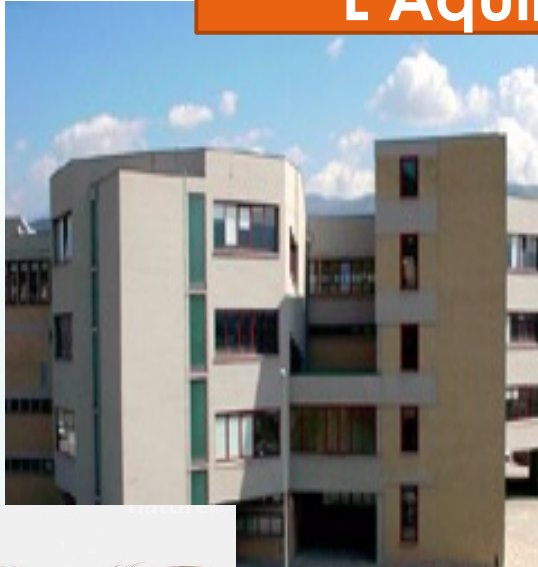
Fruit Fly Lab-03 (FFL-03) in April 2018



The Flyinglow project

**Laboratorio di riferimento esterno
(RRE)**

**University of
L'Aquila**



**Laboratorio underground
(LRE)**

LNGS



**Endpoints:
Lifespan
Fertility
Response in DNA repair mutants**

Esperimento Flyinglow: conclusioni

End point	Resultati
Lifespan	<u>Aumento della durata della vita (fino al 15%) nelle mosche che crescono a LRE: l'effetto è stato osservato dopo una generazione e si è mantenuto costante per diverse generazio</u>
Fertility	<u>Riduzione della fertilità (fino al 30%) degli adulti sia maschi che femmine che crescono a LRE: effetto osservato dopo una generazione e mantenuto costante per diverse generazioni</u>
DNA repair	<u>Selezione positiva sulla sopravvivenza del mutante omozigote ipomorfo della riparazione del DNA a LRE: l'effetto persiste quando le mosche mutanti vengono riportate a RRE (effetto transgenerazionale - effetto epigenetico).</u>

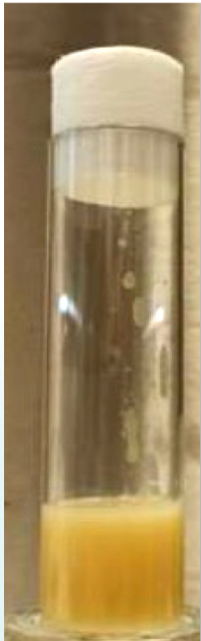
Caratterizzazione dello spettro di radiazione

	LNGS External (RRE)	LNGS Underground (LRE)
Photons and directly ionizing cosmic rays (low LET, mostly muons) (nSv/h)	47 ^a	negligible
Neutrons (high LET) (nSv/h)	21 ^b	negligible
Total terrestrial γ -rays (low LET) (nSv/h)	31 ^a	27 ^a
Radon (high LET) (Bq/m ³)	20 ^c	15 ^c
⁴⁰ K in colture medium (low LET) (nSv/h)	0,25	0,25

(^a) measures with Reuter Stokes, Automess and TLD and evaluation, at the LNGS altitude, based on UNSCEAR 2008 (Vol I. Sources and Effects of Ionizing Radiation); (^b) literature data; (^c) measures with AlphaGuard

Misure della radioattività intrinseca in collaborazione con Servizio di Chimica e Tecniche Speciali

Specific activity ^{40}K



CAP
0,05mBq/cap

VIAL
0,3 mBq/vial

MEDIUM
135 mBq/7g



fly by HR-ICP-MS
0,082 mBq/fly

Specific activity (mBq/Kg)								
		ICP-MS [§]				HPGe		
		Vial	Cap	Culture medium	Fly	Vial	Cap	Culture medium
^{323}Th		0,2	1,1	2,8	0,8			
	^{228}Ra					<5,8	<9,5	<23
	^{228}Th					<5,4	<15	<15
^{238}U		0,9	2,4	6,2	2,5			
	^{226}Ra					5 ±2	<5,8	<8,6
	^{234}Th					<340	<57	<210
	$^{234\text{m}}\text{Pa}$					<220	<250	<560
^{40}K		42	32	$19 \cdot 10^3$	$93 \cdot 10^3$	<45	<120	$17,8 \cdot 10^3$ $\pm 1,8 \cdot 10^3$
^{235}U						<4,7	<8	<19
^{137}Cs						<1,5	<5,9	<7
^7Be						30 ±10		

§ The ICP-MS analysis was performed in semi-quantitative mode
Error is estimated within 20%

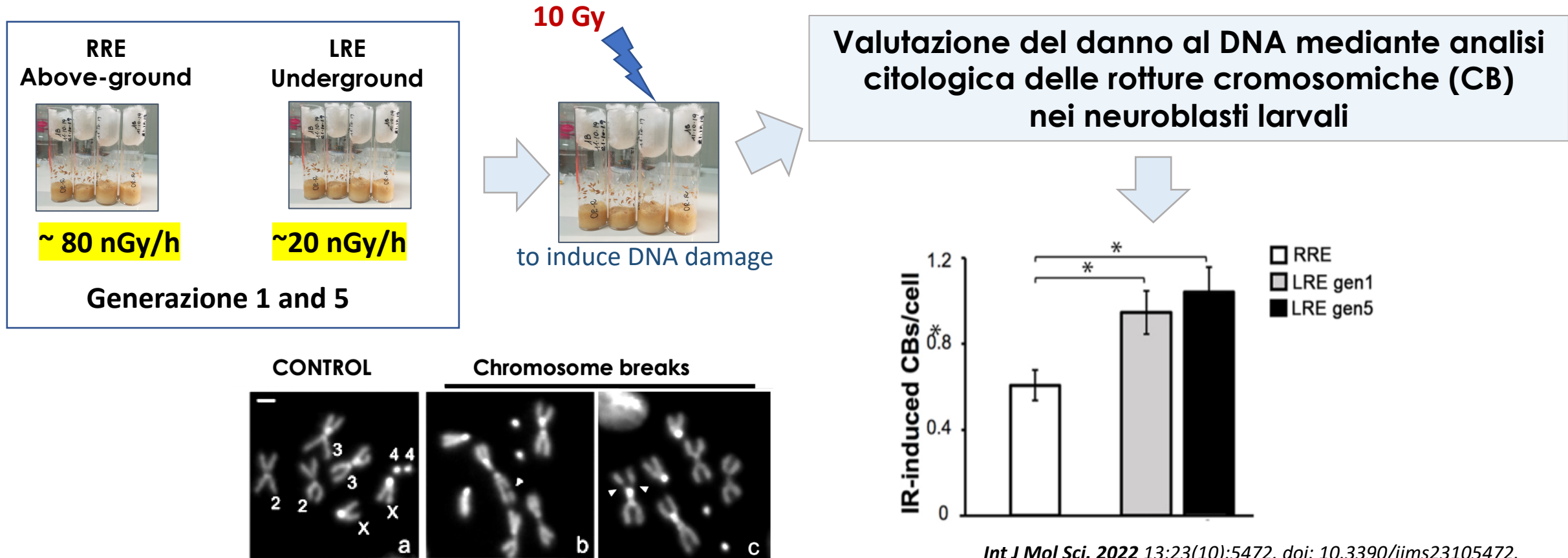
Contributo maggiore deriva dal ^{40}K nel medium di coltura:
0,25 nGy/h (Monte Carlo simulazioni)



Esperimento RENOIR

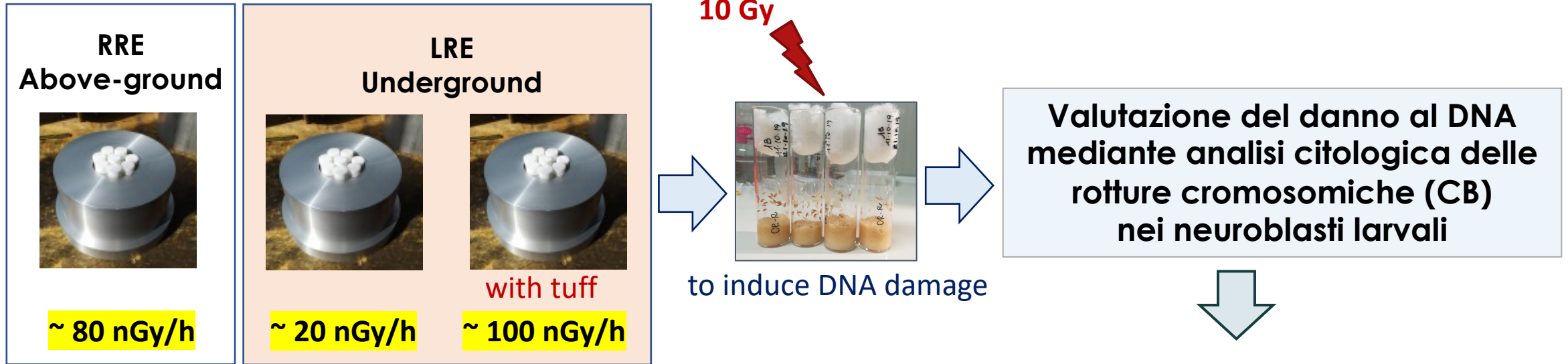
“Radiation **EN**vironment triggers biological **R**esponses in flies: **PHYSICAL** and biological mechanisms”

GOAL Indagare se la riduzione delle radiazioni di fondo influisce sulla risposta ai danni al DNA indotti dalle radiazioni nei neuroblasti di *Drosophila*.

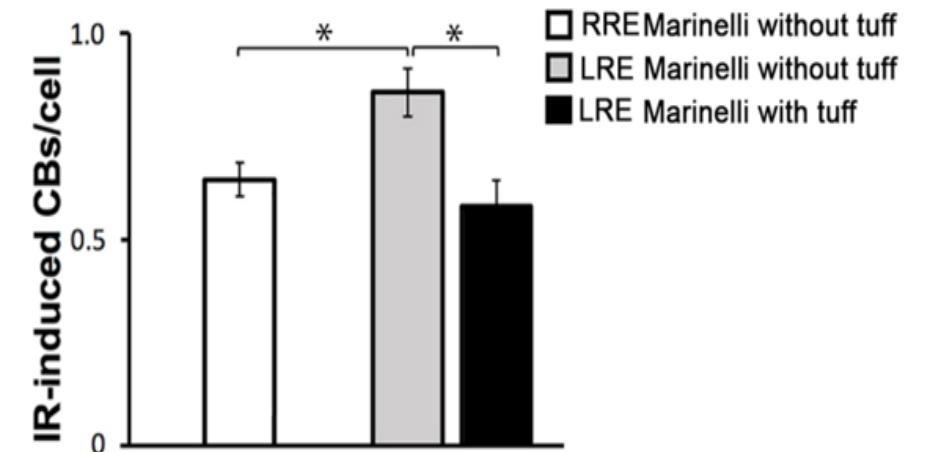




Esperimento RENOIR



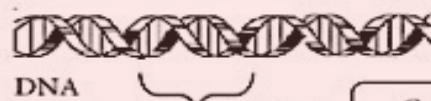
IL RIPRISTINO PARZIALE DEL CAMPO DI RADIAZIONE IN UNDERGROUND È IN GRADO DI RECUPERARE LA SENSIBILITÀ AL DANNO DELLE MOSCHE MANTENUTE IN UN CONDIZIONI DI RADIAZIONI RIDOTTE.





Esperimento RENOIR: in progress

Different environmental exposures



DNA

Genes

Genome

DNA Methylome

mRNA

Transcriptome

Proteins

Proteome

Metabolites

Metabolome

Biological responses

To measure the methylation state of a whole genome: **EPIGENETIC EFFECTS**

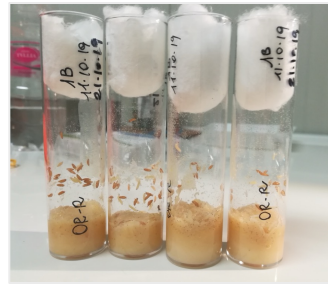
Complete set of RNA transcripts that are produced: **GENE EXPRESSION**

Comparative transcriptome and methylome analysis could provide valuable information for uncovering the molecular mechanisms activated in the reduced environmental radiation.

Gene expression profile (RNA-Seq)

RNA-Seq is currently the most widely used method for finding genes differentially expressed between two or more biological conditions of interest by a comparative bioinformatic analysis

Experimental design:



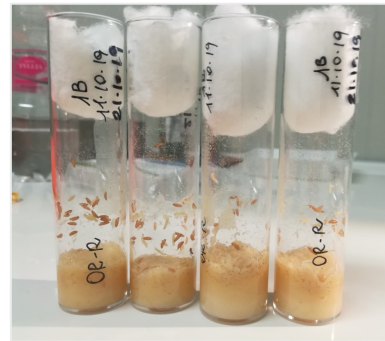
RRE



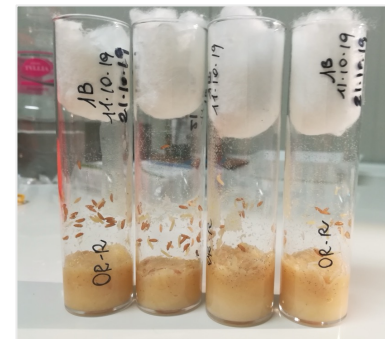
RRE



LRE



RRE gen1
RRE gen5



LRE gen1
LRE gen5

- 3 days old male adults
- 3 replicates from 2 different expts
- Total RNA extraction
- Sequencing by a Company

Gene expression profile (RNA-Seq)

430 differentially expressed (DE)

- 260 genes (encode protein factors)
- 76 transposable elements (TE)
- 39 antisense
- 41 long non coding RNA (lnc)
- 3 ribosomal RNA
- 3 snoRNA (involved in RNA processing)
- 1 mir (mir4948)
- 1 small nuclear RNA U2 (involved in mRNA splicing)
- 6 pseudogenes

➔ 399 down-regulated (240 genes, 75 TE, 39 antisense, 40 lnc RNA, 3 snoRNA, 1 mir, 1 small nuclear RNA U2)

➔ 31 up-regulated (26 genes, 3 preRNA, 1 lncRNA e 1 TE)

Using Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) differentially expressed (DE) genes were clustered into their biological meaning (Biological process and molecular function)

GOTERM_BP_DIRECT			
BIOLOGICAL PROCESS	GO term	#genes	p-value
tRNA metabolic process	GO:0006399	9	3,30E-03
innate immune response	GO:0045087	11	4,10E-03
* DNA replication	GO:0006260	8	5,00E-03
* DNA-dependent DNA replication	GO:0006261	7	6,70E-03
defense response	GO:0006952	16	6,70E-03
* double-strand break repair	GO:0006302	7	7,00E-03
* DNA metabolic process	GO:0006259	15	9,40E-03
ncRNA metabolic process	GO:0034660	14	1,10E-02
flagellated sperm motility	GO:0030317	5	1,20E-02
sperm motility	GO:0097722	5	1,20E-02
* DNA recombination	GO:0006310	8	1,20E-02
response to bacterium	GO:0009617	11	1,60E-02
immune response	GO:0006955	12	1,80E-02
tRNA modification	GO:0006400	5	1,80E-02
cellular response to heat	GO:0034605	4	1,90E-02
axoneme assembly	GO:0035082	5	1,90E-02
response to stress	GO:000695	32	2,30E-02
microtubule bundle formation	GO:0001578	5	3,50E-02
RNA modification	GO:0009451	6	3,60E-02
cilium assembly	GO:0060271	7	4,10E-02
response to heat	GO:0009408	5	4,70E-02

GOTERM_MF_ALL			
MOLECULAR FUNCTION	GO term	#genes	p-value
* damaged DNA binding	GO:0003684	4	4,20E-03
transmembrane receptor activity	GO:0004888	15	9,20E-03
serine-type endopeptidase activity	GO:0004252	10	1,50E-02
receptor activity	GO:0038023	16	1,60E-02
molecular transducer activity	GO:0060089	16	1,60E-02
ligand-gated channel activity	GO:0022834	7	2,20E-02
ligand-gated ion channel activity	GO:0015276	7	2,20E-02
serine-type peptidase activity	GO:0008236	10	2,40E-02
* single-stranded DNA binding	GO:0003697	4	3,60E-02
nucleotidyltransferase activity	GO:0016779	5	4,50E-02
endopeptidase activity	GO:0004175	12	4,80E-02

Genes involved in DNA related processes are differentially expressed (mostly down-regulated) in LRE, in agreement with the different radiation sensitivity

PID – Programma INFN per la Didattica 2024
8-12 Aprile 2024



Interdisciplinary Collaboration



Patrizia MORCIANO