

Short Term Mobility: relazione finale del Dr. Ranieri Bizzarri

Il programma STM svolto dal Dr. Ranieri Bizzarri presso il Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC)-Harvard medical School nel periodo 16 Novembre 2015-5 Dicembre 2015 aveva come obiettivo generale il setup di protocolli sperimentali miranti alla visualizzazione ad alta risoluzione (nanoscopia)/alta sensibilità (singola molecola) di molecole di mRNA codificanti per la proteina BMI1 umana. BMI1 è un regolatore epigenetico della struttura cromatinica le cui funzioni sono ancora in parte oscure [1]. Proprio per l'estremo interesse che questa proteina riveste nell'ambito della biologia dello sviluppo tumorale, l'attività scientifica del Dr. Bizzarri si è rivolta al conseguimento di diversi obiettivi, incluso quello dichiarato, resi possibili dalla presenza di strutture scientifiche di eccellenza presso il BMIDC e la University of Maine (dove alcune misure sono state effettuate). Il dettaglio dell'attività svolta, per ciascun obiettivo, è riportata di seguito.

1. Visualizzazione ad alta risoluzione (nanoscopia) / alta sensibilità (singola molecola) di mRNA codificante per Bmi1 [Obiettivo primario della STM]

L'obiettivo è stato pienamente conseguito adattando il protocollo riportato in ref. [2] e commercializzato da LGC Biosearch Technology come Stellaris® RNA FISH. Più specificamente, prima dell'inizio dell'attività negli Stati Uniti è stata disegnata una sonda oligonucleotidica (sBMI1) composta da 45 sequenze di circa 20 nucleotidi e tutte complementari alla sequenza del mRNA di BMI in zone diverse e non sovrapposte. sBMI, in cui ciascuna sequenza è legata ad una molecola di tetramethylrhodamine (TAMRA), è stata sintetizzata da LGC Biosearch. TAMRA è stata selezionata come reporter fluorescente in virtù della sua elevata brillantezza (coefficiente di estinzione molare: $89000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, resa quantica: 0.7) ed eccitazione/emissione in regioni facilmente accessibili dall'ottica di sistemi di microscopia di largo uso (vedi proprietà di TAMRA in: vedi: <http://www.glenresearch.com/Technical/Extinctions.html>). La presenza di sequenze multiple tutte in grado di legarsi ad una singola molecola di mRNA e ciascuna legata ad una molecola fluorescente amplifica il segnale di riconoscimento e rende possibile la visualizzazione di singole molecole. Il protocollo di ibridazione FISH per la sonda sBMI è stato applicato a cellule A549 (cellule di tumore al polmone umane) note per avere una espressione elevata di BMI1 [3]. I risultati ottenuti hanno mostrato che, utilizzando un semplice e convenzionale sistema di microscopia wide-field, è possibile visualizzare le *single molecole* di BMI1 presenti nella cellula, dimostrando la massima sensibilità ottenibile da un sistema di imaging (Figura 1). Tra l'altro, la sparsa dislocazione a livello cellulare delle singole molecole di mRNA (distanze maggiori rispetto alla risoluzione ottica legata alla diffrazione) rende superfluo l'utilizzo di sistemi di visualizzazione

mediante nanoscopia, che sono stati invece applicati per la visualizzazione di singole molecole di *proteina* BMI1 (vedi obiettivo 2). Pertanto, la procedura sviluppata ed i dati ottenuti rendono accessibile la quantificazione dell'espressione di BMI1 in cellule tumorali ed aprono la porta a potenziali sviluppi diagnostici riguardanti l'applicazione a tessuti biopsati. E' da sottolineare come questo aspetto diagnostico sia contemplato nel progetto regionale FAS Salute – Toscana "DIAMANTE", recentemente approvato al finanziamento, e a cui il Dr. Bizzarri partecipa come responsabile dell'unità CNR-NANO.

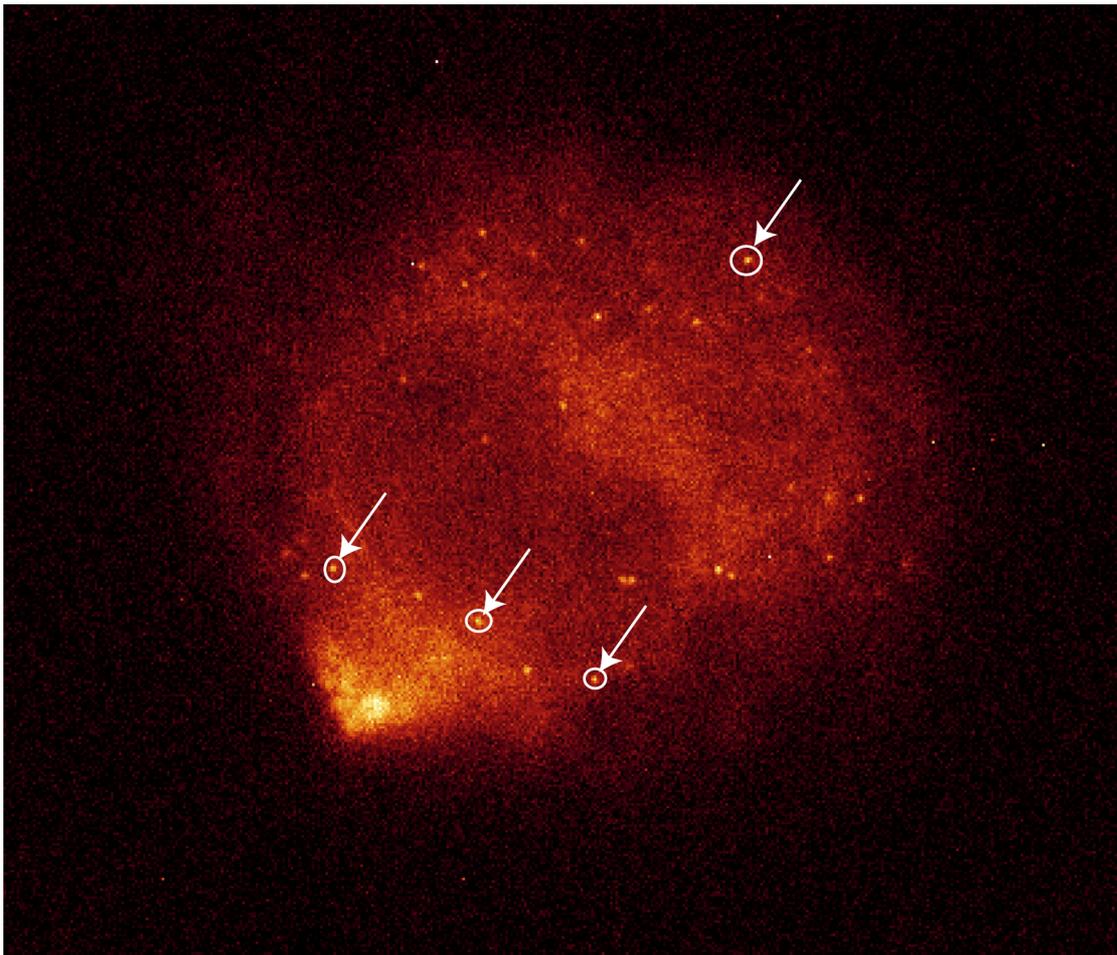


Figura 1. Cellula A549 visualizzata mediante microscopia wide-field dopo *in situ hybridization* con sBMI1-TAMRA. Quattro singole molecole di mRNA codificante per BMI1 sono circonscritte da cerchi ed evidenziate mediante frecce. Molte altre singole molecole di mRNA sono visibili nella cellula.

2. Visualizzazione ad alta risoluzione (nanoscopia) / alta sensibilità (singola molecola) di Bmi1 [Obiettivo aggiuntivo della STM]

L'obiettivo è stato pienamente conseguito mediante marcatura di BMI1 mediante proteine fluorescenti fotocromiche (ovvero fotoconvertibili reversibilmente tra due stati ottici, in questo caso

non emissivo, *-dark-*, e emissivo *-bright-*) e visualizzando l'espressione di BMI1 fluorescente mediante tecnica F-PALM [4]. Più in dettaglio, l'attività si è avvalsa dello sviluppo di due nuove proteine fluorescenti fotocromatiche da parte del Dr. Bizzarri ed il suo gruppo presso NANO-CNR. Precedentemente alla attività negli Stati Uniti, queste due proteine, WQ GFP (F64L/E222Q GFP) e EWQ GFP (F64/E222Q GFP), sono state fuse a BMI1 a dare due vettori plasmidici per espressione in cellule eucariotiche BMI1-WQ e BMI1-EWQ. Presso il BIDMC, le due proteine di fusione sono state espresse in maniera transiente in cellule A549 e, mediante microscopia confocale, se ne è valutata l'effettiva espressione cellulare e la localizzazione prevalentemente nucleare. Infine, le cellule sono state fissate ed è stata condotta l'analisi F-PALM (1-3 Dicembre 2015) presso il laboratorio del Prof. Samuel T. Hess, con cui il Dr. Bizzarri collabora da alcuni anni, presso la University of Maine (Orono, Maine). Il laboratorio del Prof. Hess è uno dei centri leader mondiali per la visualizzazione di sistemi fluorescenti su scala nanometrica mediante nanoscopia ottica F-PALM e STORM (<http://physics.umaine.edu/research/research-groups/biophysics-research-group/fpalmhome/>), e la sua relativa vicinanza a Boston ha reso possibile un'eccellente sinergia scientifica con l'attività biochimica e di microscopia confocale svolta presso il BIDMC. Dal punto di vista scientifico, si è ottenuta per la prima volta la mappa di distribuzione di *singole molecole* di BMI1 presenti nel nucleo cellulare, con precisione di localizzazione (risoluzione) dell'ordine di 30-40 nm (Figura 2). Tale elevatissima risoluzione ha permesso di identificare la presenza e, per la prima volta, la dimensione (100-130 nm) di aggregati di BMI1 (Polycomb Bodies o PcG bodies) che si ritiene abbiano un rilevante ruolo epigenetico modulando la compattezza locale della cromatina, e pertanto costituendo un fattore biochimico molto importante nella genesi tumorale [5]. Questa attività costituisce uno dei più rilevanti campi di ricerca del gruppo del Dr. Bizzarri ed il suo successivo sviluppo è attualmente in corso presso NANO-CNR, in collaborazione con BIDMC e University of Maine.

3. Sviluppo di un anticorpo primario fluorescente anti-BMI1 per visualizzazione diagnostica su cellule e tessuti [Obiettivo aggiuntivo della STM]

Classicamente, la visualizzazione di BMI1 endogeno in cellule e tessuti viene effettuata mediante tecniche di immunofluorescenza che fanno uso di un sistema anticorpo primario-secondario. Tuttavia, per rendere più veloce la procedura di marcatura e visualizzazione, l'utilizzo di un sistema a singolo anticorpo primario fluorescente sarebbe preferibile. In linea con gli obiettivi del progetto FAS – Salute (vedi obiettivo 1), parte dell'attività del Dr. Bizzarri si è rivolta allo sviluppo di un anticorpo primario fluorescente anti-BMI1 e la sua visualizzazione in cellule (A549) e tessuti (lung cancers) mediante microscopia confocale. A tale fine un anticorpo anti-BMI1 (AbBMI1, Millipore)

è stato coniugato con una sonda fluorescente ad alta brillantezza (ATTO633) ed emette nella regione rossa dello spettro, dove l'interferenza della diffusione luminosa in tessuti spessi è minore.

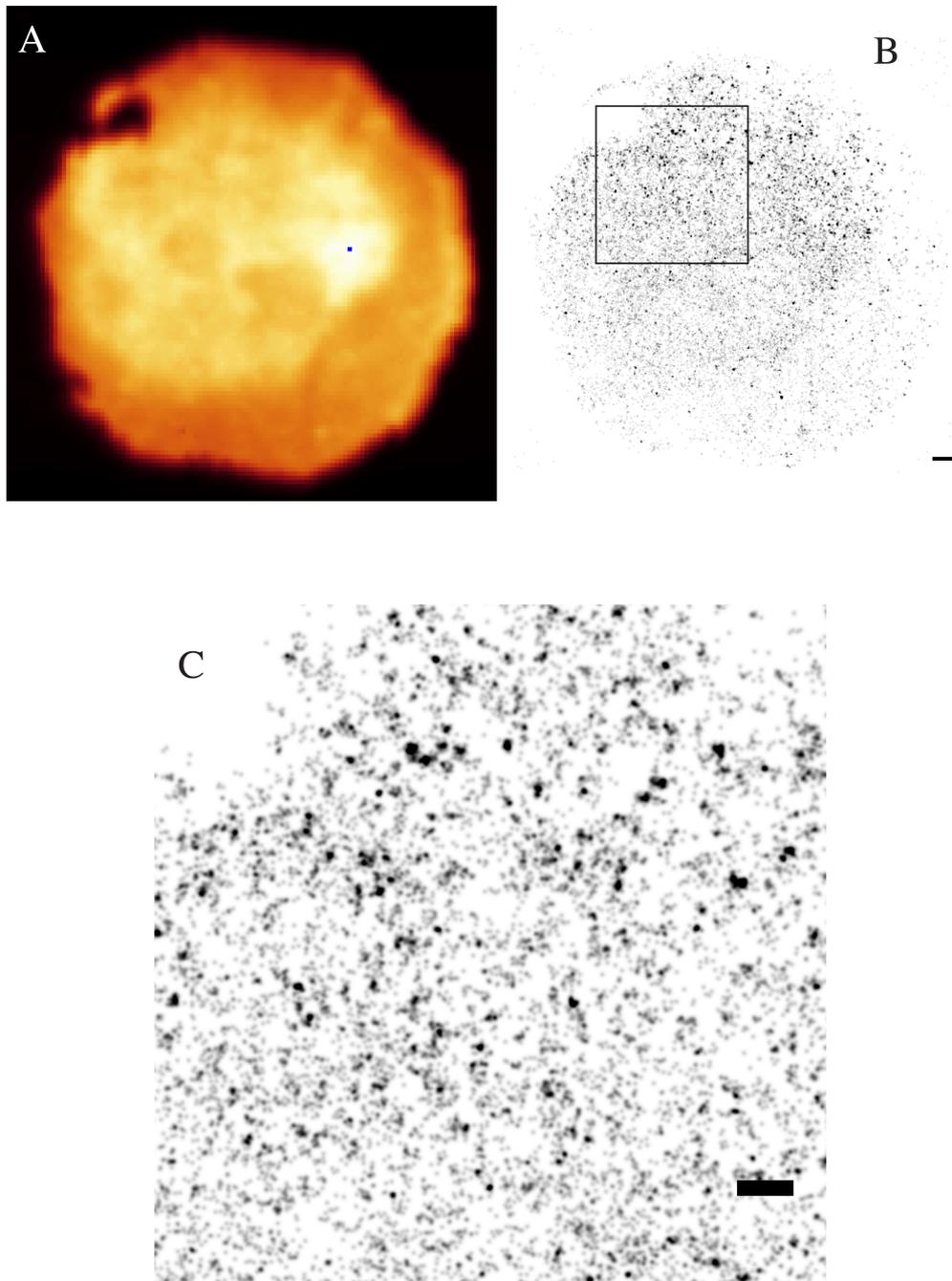


Figura 2. Cellula A549 esprime BMI1-WQ e visualizzata mediante microscopia F-PALM. (a) Immagine wide-field media dopo collezione di 40000 immagini (tempo di esposizione di ciascuna immagine: 10 ms); la zona ad intensità di fluorescenza maggiore è il nucleo cellulare dove si osservano regioni meno intense attribuibili ai nucleoli. (b) Mappa F-PALM delle singole molecole di BMI1-WQ (in nero). (c) Ingrandimento della regione circoscritta dal rettangolo nero nella mappa (b): sono osservabili i cluster di BMI1 corrispondenti ai PcG Bodies ed aventi dimensione intorno a 100-130 nm. Barra di scala: 1 μm

In particolare, è stata utilizzata una forma attiva di ATTO633 alla bioconiugazione con i gruppi amminici (ATTO633 NHS) ed una procedura di funzionalizzazione dell'anticorpo di tipo standard (pH 7.2, tampone PBS, 4 °C, 12 h di reazione) [6]. La resa di funzionalizzazione, ovvero il numero di molecole fluorescenti per molecola di anticorpo, è stata valutata mediante spettrofotometria di assorbimento. Una descrizione della procedura di bioconiugazione è riportata come appendice a questa relazione. Si sono ottenute rese di funzionalizzazione intorno a 2-3 ATTO633 per molecola di anticorpo.

Successivamente, l'anticorpo primario fluorescente è stato utilizzato in una procedura di immunofluorescenza applicata a cellule e tessuti (vedi protocollo generale in: <http://www.cbi.pitt.edu/protocols/cellimuno.htm>). Il conseguimento dell'obiettivo proposto è stato verificato dalla presenza di fluorescenza positiva nucleare relativa a BMI1 in cellule A549 e dalla correlazione di questa fluorescenza con l'espressione del costrutto BMI1-EGFP fluorescente nella regione verde dello spettro (Figura 3). Anche l'analisi di immunofluorescenza su tessuti di tumore al polmone ha confermato la validità di AbBMI1-ATTO633 come sistema di marcatura di BMI1 endogeno.

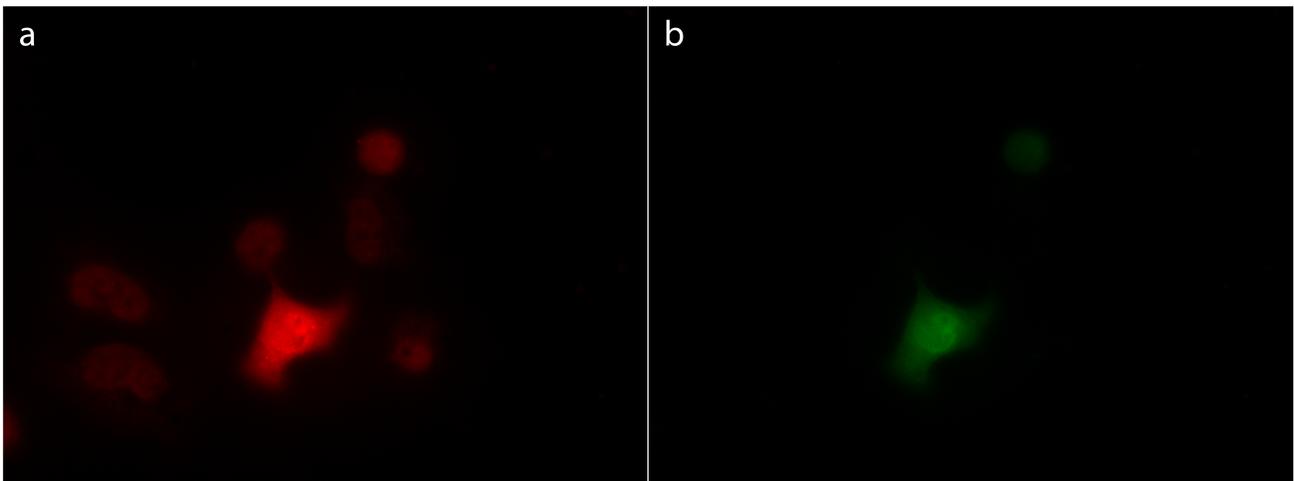


Figura 3. Immunofluorescenza su cellule A549 utilizzando AbBMI1-Atto633 come anticorpo primario. (a) Fluorescenza raccolta nel canale 580-650 nm. (b) Fluorescenza raccolta nel canale 500-550 nm. Da notare che due cellule A549 esprimono transientemente BMI1-EGFP e sono pertanto visibili nel canale verde (b). La fluorescenza relativa a BMI1 si concentra nel nucleo cellulare, con l'eccezione della cellula centrale che esprime BMI1-EGFP ad alti livelli e lo rilocalizza anche nel citoplasma.

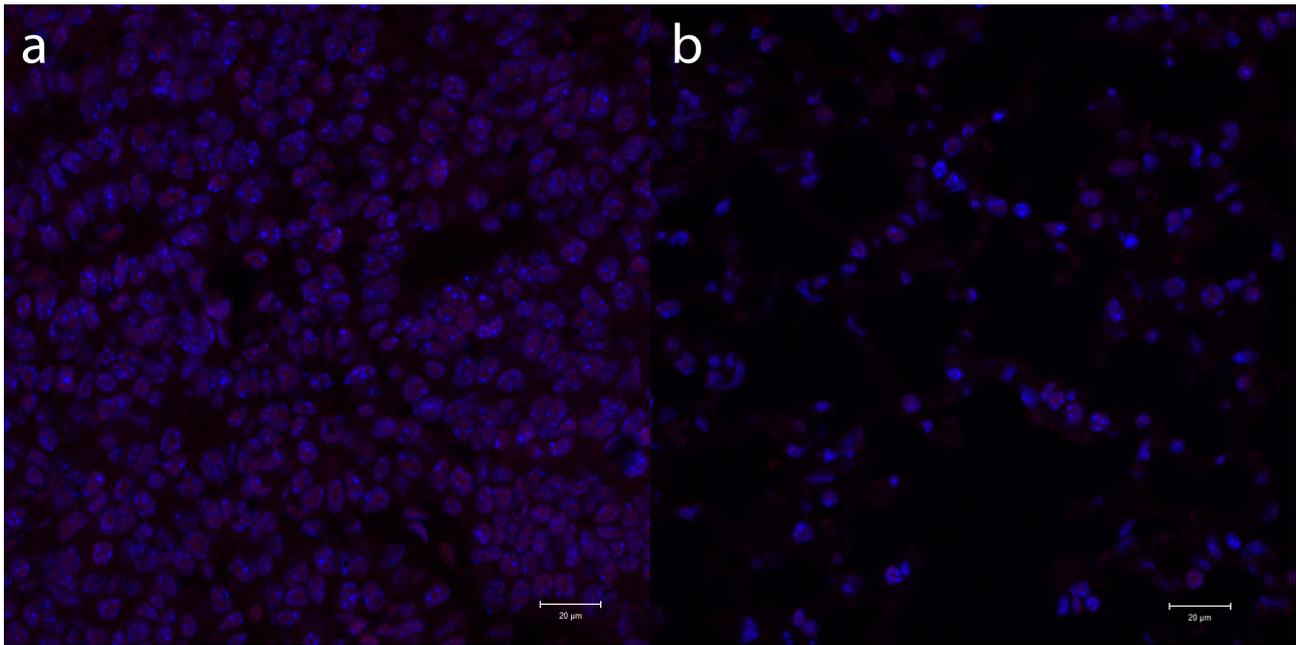


Figura 4. Immunofluorescenza su tessuti utilizzando AbBMI1-Atto633 come anticorpo primario. (a) Tessuto polmonare tumorale. (b) Tessuto polmonare non tumorale. I nuclei cellulari sono marcati con DAPI. Da notare la maggiore intensità della fluorescenza rossa (prevalentemente nucleare) nel tessuto tumorale.

Bibliografia

- [1] R. Bhattacharya, S. B. Mustafi, M. Street, A. Dey, and S. K. Dwivedi. *Genes & Diseases*, 2, 2015, pp 225-239
- [2] A. Lyubimova, S. Itzkovitz, J. P. Junker, Z. P. Fan, X. B. Wu, and A. van Oudenaarden. *Nature protocols*, 8, 2013, pp 1743-1758
- [3] M. L. Na, D. F. Chen, B. Holmqvist, L. Ran, J. Jin, J. Rebetz, and X. L. Fan. *Virology*, 456, 2014, pp 227-237
- [4] T. J. Gould, V. V. Verkhusha, and S. T. Hess. *Nature protocols*, 4, 2009, pp 291-308
- [5] I. Hernandez-Munoz, P. Taghavi, C. Kuijl, J. Neefjes, and M. van Lohuizen. *Mol Cell Biol*, 25, 2005, pp 11047-11058
- [6] G. T. Hermanson. *Bioconjugate Techniques*, 3rd Edition, 2013, pp 1-1146

APPENDICE

Antibody labeling procedure

Reactant: Anti-BMI1 clone 6 antibody [Millipore] = 1 mg/ml in 0.1M Tris pH 7.4

1. Put 500 ml of the Ab solution in a Amicon centrifugal filter tube (MWCO 30,000) and centrifuge at 3750 rpm for 15-18 min while keeping the temperature at 4 °C. Around 50 ml of unfiltered solution are to be recovered
2. Dilute the 50 ml of unfiltered, Ab-containing solution with 450 ml of PBS 1X to obtain a 1/10 dilution factor. Centrifuge again in the Amicon tube to obtain 50 ml of solution.
3. Repeat twice step (2) and then dilute the unfiltered solution to 500 ml by PBS 1X. This yields a 0.1 mg/ml Ab solution in 0.1 M PBS with $\leq 10^{-5}$ M Tris content.
4. Add 150 ml of PBS 1X to 350 ml of the 0.1 mg/ml Ab solution, yielding 500 ml of a 70 mg/ml Ab solution.
5. Add 4.7 ml of a 10 mg/ml solution of Atto633-NHS in DMSO to 500 ml of the 70 mg/ml Ab solution in PBS (stoichiometric weight ratio Ab/Atto = 3/4) and gently stir overnight at 4 °C
6. Put the reaction mixture (500 ml) in a Amicon centrifugal filter tube (MWCO 30,000) and centrifuge first at 2200 rpm for 30 min and then at 3750 rpm for 10-15 min, in both cases keeping the temperature at 4 °C.
7. Repeat step 2 and 3 to yield 500 ml of Ab-Atto633 solution in PBS
8. Quantify the concentration of Ab-Atto633 and the labeling ratio by spectrophotometry: collect absorbance at 635 nm (A_{635}) and 280 nm (A_{280}) against a PBS 1X blank and then:

$$[\text{Ab-Atto633}] \text{ (mg/ml)} = (A_{280} - 0.469 \times A_{635}) / 1.10$$

$$\text{Ab/Atto633 ratio: } (A_{635} / 130,000) / ([\text{Ab-Atto633}] / 150,000)$$