

Short Term Mobility: relazione finale della Dr. Barbara Storti

Il programma STM svolto dalla Dr. Barbara Storti presso il KTH Royal Institute of Technology, SciLifeLab nel periodo 16 Ottobre 2016-5 Novembre 2016 aveva come obiettivo generale la validazione e la caratterizzazione di nuove proteine fluorescenti fotocromiche (ovvero fotoconvertibili reversibilmente tra due stati ottici, in questo caso non emissivo, *-dark-*, e emissivo *-bright-*). Tali proteine costituiscono reporter genetici per applicazioni di nanoscopia di fluorescenza, ovvero microscopia di fluorescenza con risoluzione spaziale significativamente inferiore al limite classico posto dalla diffrazione ottica (200-300 nm per luce visibile). E' da notare che la nanoscopia di fluorescenza coniuga tecniche di acquisizione di immagini dotate di alta sensibilità (arrivando alla rilevazione della singola molecola) e capacità di risolvere dettagli spaziali su scala nanometrica, permettendo la comprensione dettagliata dei processi biochimici nella cellula. Proprio per l'estremo interesse che queste tecniche rivestono nell'ambito della biologia e della biofisica, l'attività scientifica della Dr. Storti si è rivolta al conseguimento di diversi obiettivi, incluso quello dichiarato, resi possibili dalla presenza di strutture scientifiche di eccellenza presso il SciLife Lab-KTH Royal Institute of Technology. Il dettaglio dell'attività svolta, per ciascun obiettivo, è riportata di seguito.

1. Preparazione (mutagenesi di DNA ed espressione batterica) e purificazione di nuove protein fotoconvertibili (fotocromiche) caratterizzate dalla presenza della mutazione E222Q nella loro sequenza primaria.

L'obiettivo è stato pienamente conseguito. Più specificamente, prima dell'inizio dell'attività presso il SciLife Lab, sono state progettate nuove proteine fotocromiche che avevano in comune la mutazione E222Q rispetto alla sequenza primaria della wild type GFP. Significativamente, è stato dimostrato dal gruppo dove la Dr. Storti svolge la sua attività di ricerca presso il CNR-NANO che la mutazione E222Q conferisce la proprietà di fotoconvertibilità reversibile a molte proteine fluorescenti derivanti da *Aequorea victoria* (*Aequorea* Fluorescent Proteins (AFPs))(1) Per alcune proteine fotocromiche, presso lo Sci-Life Lab è stato possibile realizzare e modulare, tramite protocolli di mutagenesi, proprietà fotofisiche quali il colore, la brillantezza e la velocità di fotonversione. In particolare l'attenzione si è focalizzata sullo studio di proteine fotoconvertibili con emissione nel verde. Le proprietà fotofisiche di queste proteine sono state poi caratterizzate tramite spettri di fluorescenza a diversi pH e misure di Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). La strumentazione FCS allo Sci-Life Lab ha permesso l'utilizzo di hardware e software di più recente sviluppo. Le misure FCS effettuate hanno permesso di studiare alcune caratteristiche di

fotoconversione tra i due stati (bright e dark) come la velocità di transizione e le lunghezze d'onda che permettono il passaggio dalla forma attiva alla forma inattiva (Fig. 1). Per ridurre il rumore presente sulla scala dei tempi brevi (500 ns-10 μ s), invece della classica tecnica di autocorrelazione le curve sono state raccolte operando una cross-correlazione dei segnali (derivanti dalla stessa molecola fluorescente) raccolti in due intervalli di lunghezze d'onda diversi (500-515 nm e 516-580 nm). Inoltre sono state raccolte almeno 5 curve per ogni combinazione di potenze e tipo di laser (488 nm da solo e/o combinato con 405 nm) e poi le diverse curve sono state mediate al fine di ridurre eventuali artefatti dovuti a rumore o segnali spuri. La tendenza che emerge osservando le curve è quella di una generale accelerazione del passaggio dalla forma accesa a quella spenta quando si usano alte potenze del laser a 488 nm con conseguente aumento della velocità di fotoconversione tra i due stati quando si associa l'illuminazione a 488 nm con quella a 405 nm fino ad osservare una vera e propria inflessione della curva portando il 405 al 10% della sua potenza.

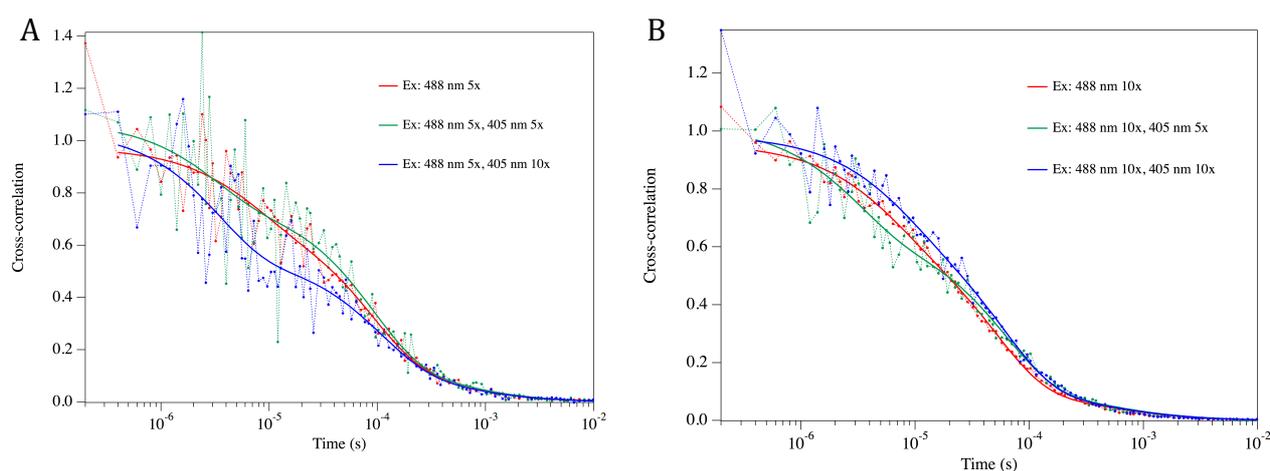


Figura 1. Curve FCS della proteina WQ in HEPES pH 8.1. E' stato studiato il comportamento della WQ sotto diverse condizioni di irraggiamento in termini di potenza e combinazione di laser. *A* Le curve sono state raccolte usando sempre il laser a 488 nm con una potenza del 5x (pari a 24 μ W) e poi si sono raccolte curve aggiungendo il laser a 405 nm a diverse potenze (5x pari a 0.61 μ W e 10x pari a 1.30 μ W) al fine di studiare la velocità di passaggio tra la forma accesa e la forma spenta. *B* Stesso esperimento compiuto in *A* mantenendo però questa volta la potenza del laser a 488 nm al 10x (pari a 47.7 μ W).

2. Acquisizione di immagini di superrisoluzione (principalmente tramite la tecnica di Reversible Saturable Optical Linear Fluorescence Transitions –RESOLFT(2)) di campioni proteici sia *in vitro* sia a livello intracellulare.

L'obiettivo è stato pienamente conseguito mediante una prima caratterizzazione delle proteine fotocromiche ingegnerizzate al microscopio RESOLFT intrappolandole in un gel di poliacrilammide. Questa procedura ci ha permesso di testare le proteine ingegnerizzate per il loro utilizzo in questa tecnica di super-risoluzione. Il principio della tecnica RESOLFT è quello di illuminare il campione in maniera disomogenea usando un *pattern* del tutto simile ad una ciambella che abbia al centro un'intensità di illuminazione molto bassa (zero in condizioni ideali). Solo in questo punto centrale le molecole non sono nello stato *dark*, bensì nello stato "brillante", in grado di emettere fluorescenza. Se questa area emissiva è più piccola del convenzionale limite di diffrazione, si ottiene un'immagine nanoscopica.

Come primo step verso la creazione di immagini RESOLFT nanoscopiche, abbiamo cercato di ottimizzare la fotoconversione dei nostri reporters attraverso lo studio una serie di cicli di accensione e spegnimento. L'ottimizzazione della fotoconversione consente di migliorare la risoluzione spaziale minimizzando lo spegnimento irreversibile

A tal fine le nostre proteine sono state intrappolate in un gel e ne abbiamo testato alcune fondamentali caratteristiche:

- 1) la "fatica" della proteina ovvero la sua capacità di recuperare completamente lo stato attivo (acceso, bright) dopo essere stata spenta ripetendo i cicli per 500 volte consecutive. Nel RESOLFT infatti le molecole sono soggette a molti cicli di fotoconversione al fine di raccogliere un elevato numero di fotoni e massimizzare il rapporto segnale/rumore ($S/N > 5$).
- 2) I tempi di decadimento o bleaching della proteina, che definiscono la velocità con cui la proteina può compiere un ciclo di accensione e spegnimento della fluorescenza e la sua capacità di spegnersi completamente senza lasciare fluorescenza residua (background). Infatti la tecnica RESOLFT permette di acquisire immagini da cellule viventi purchè l'acquisizione, e quindi i tempi di fotoconversione, sia il più veloce possibile per evitare che durante la misura le cellule si muovano o cambi comunque l'intono della proteina cellulare oggetto di studio.

Le proprietà (1) e (2) sono state investigate usando diverse potenze e tempi del laser a 405 nm, che (ri)attiva lo stato emissivo della proteina, e diverse potenze del laser a 488 nm che spegne la fluorescenza della proteina mediante fotoconversione ad uno stato *dark* reversibile. Le analisi effettuate hanno permesso di selezionare una proteina particolarmente idonea a misure di RESOLFT,. Questa proteina, denotata di seguito come WQ, contiene la mutazione E222Q e ha

emissione di fluorescenza nella regione verde (picco di fluorescenza con massimo a 505-510 nm). WQ è caratterizzata da una bassissima “fatica” nella ripetizione dei cicli di fotonversione (circa il 3% dopo 500 cicli) e la conversione dallo stato emissivo allo stato spento avviene su tempi molto rapidi (100-200 μ s) in condizioni canoniche di illuminazione per il RESOLFT (10-50 μ W di intensità di eccitazione a 488 nm) . (Fig. 2)



Figura 2. Analisi delle caratteristiche fotocromiche della proteina WQ. Questa immagine rappresenta la variazione in intensità della WQ intrappolata nel gel di poliacrilammide durante 500 cicli di fotoconversione. Quindi ogni linea orizzontale di questo tappeto rappresenta un ciclo di riattivazione con il laser a 405 nm, pausa, osservazione e contemporaneo spegnimento operato tramite illuminazione con il laser a 488 nm. Questa sequenza è stata ripetuta per 500 volte (500 linee totali).

Presso il SciLifeLab, la proteina WQ è stata espressa in maniera transiente in cellule U2OS e fusa al gene della paxillina, una proteina espressa nelle adesioni focali. Questo campione è stato utilizzato per ottimizzare i parametri di tempo e potenza dei laser per ottenere un'immagine il più possibile risolta con la tecnica RESOLFT. Si noti che la Dr. Testa guida uno dei gruppi leader mondiali nella visualizzazione di sistemi fluorescenti su scala nanometrica mediante tecnica RESOLFT (<https://www.scilifelab.se/researchers/ilaria-testa>). Con queste misure siamo riusciti ad ottenere una risoluzione di 60-80 nanometri acquisendo le immagini su cellule viventi (Fig. 3). Tale risultato ci ha confermato le enormi potenzialità delle proteine fotocromiche ingegnerizzate nel gruppo della Dr Storti e ci permetterà di applicare queste tecniche su campioni biologici di nostro interesse relative al progetto FAS “Diamante” di cui la Dr Storti fa parte.

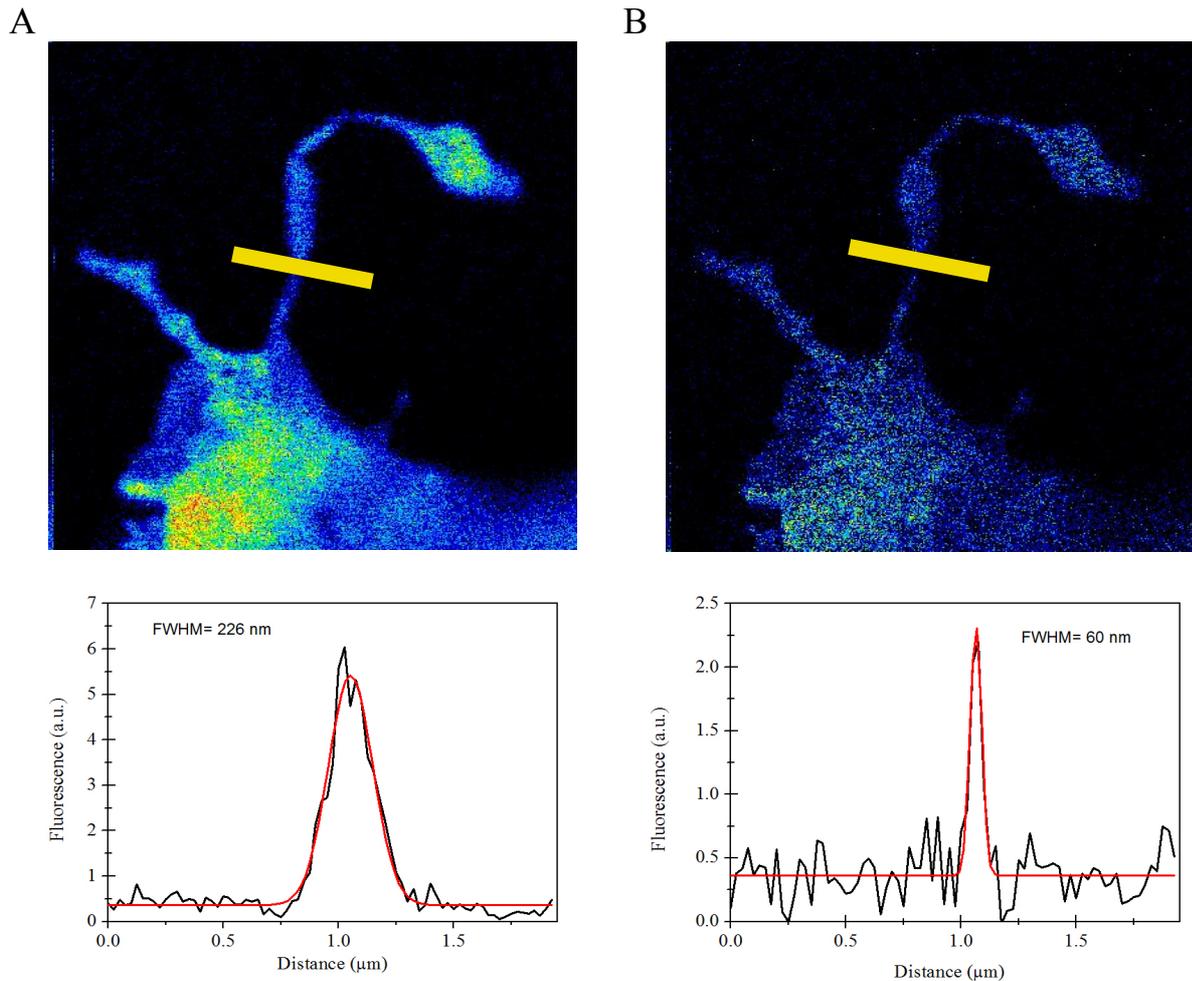


Figura 3. Confronto tra risoluzione ottenuta con un microscopio confocale e quella ottenuta per mezzo della tecnica RESOLFT in cellule esperimenti Paxillina-WQ. *A* Immagine confocale e grafico del profilo di intensità di una microstruttura filopodiale corrispondente alla regione rappresentata nell'immagine dalla linea gialla. *B* Stessa immagine ottenuta usando la tecnica RESOLFT scansionando il campione usando il seguente schema: 60 μs di attivazione con il laser a 405 nm, 200 μs di ciambella per spegnere le molecole con il laser a 488 nm usato con alte potenze, 25 μs di lettura del segnale super-risolto con il laser a 488 nm a bassa potenza. All'immagine originale è stato poi sottratto il rumore di fondo registrato applicando la sola illuminazione con il laser a 488 nm usata per la lettura al fine di migliorare il rapporto segnale rumore. Come si può osservare dal calcolo della Full Width at Half Maximum (FWHM) ovvero la "larghezza a metà altezza" (calcolato fittando il profilo con una funzione gaussiana) si ha un guadagno in risoluzione di circa 160 nanometri usando la tecnica RESOLFT abbinata alle caratteristiche della nostra proteina.

1. Bizzarri, R., Serresi, M., Cardarelli, F., Abbruzzetti, S., Campanini, B., Viappiani, C., and Beltram, F. (2010) Single Amino Acid Replacement Makes *Aequorea victoria* Fluorescent Proteins Reversibly Photoswitchable. *J Am Chem Soc* **132**, 85-95
2. Testa, I., Urban, N., Willig, K., and Hell, S. (2013) Resolft Nanoscopy in Life Sciences: Unraveling Fine Details with Low Light Levels. *Biophysical journal* **104**, 534A-534A