

Complesso fago-nanoparticelle di argento come sonda SERS per l'identificazione di cellule U937

**Germana Lentini^a, Enza Fazio^b, Federica Calabrese^a, Laura M. De Plano^a, Maria Puliafico^a, Domenico Franco^a, Marco S. Nicolò^a, Santina Carnazza^a,
Sebastiano Trusso^c, Alessandro Allegra^{d*}, Fortunato Neri^b, Caterina Musolino^d and Salvatore P. P. Guglielmino^a**

^a Dipartimento di Scienze Biologiche ed Ambientali, Università di Messina, Viale Ferdinando Stagno d'Alcontres 31, 98158, Messina, Italia

^b Dipartimento di Fisica e Scienze della Terra, Università di Messina, Viale Ferdinando Stagno d'Alcontres 31, 98158, Messina, Italia

^c CNR-IPCF Istituto per i processi chimico-fisici, Viale Ferdinando Stagno d'Alcontres 37, 98158, Messina, Italia

^d Dipartimento di Chirurgia generale, Oncologia ed Anatomia Patologica, Università di Messina, Via Consolare Valeria, 1, 98125 Messina, Italia

* Autore corrispondente: Dipartimento di Chirurgia generale, Oncologia ed Anatomia Patologica, Università di Messina, Via Consolare Valeria, 1, 98125 Messina, Italia. Tel.: +39 0902212364-; fax: +39 0902212355. E-mail: aallegra@unime.it (Alessandro Allegra).

Abstract (Riassunto)

La diagnosi precoce di tumore è il fattore più importante per la sopravvivenza del paziente e per il trattamento del cancro. In particolare, le cellule leucemiche sono molto eterogenee e vi è la necessità di sviluppare nuovi sistemi di rilevamento rapidi ed accurati per la diagnosi precoce ed il monitoraggio della malattia minima residua. Questo studio riporta l'utilizzo di networks molecolari costituiti dall'intera struttura di batteriofagi, che espongono sulla loro superficie peptidi specifici, direttamente assemblati con nanoparticelle d'argento come un nuova sonda SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) per l'identificazione *in vitro* di cellule U937. Una libreria phage-display di peptidi random di 9 aminoacidi è stata selezionata verso cellule U937 al fine di identificare dei peptidi che riconoscano selettivamente queste cellule. Successivamente, il clone fagico è stato assemblato con nanoparticelle d'argento ed il network risultante è stato utilizzato per ottenere un segnale SERS su bersagli molecolari cellulo-specifici. La strategia proposta potrebbe essere uno strumento molto sensibile per la progettazione di biosensori per

l'identificazione altamente specifica e selettiva di cellule tumorali ematiche e per il rilevamento della malattia residua minima in una percentuale significativa di tumori ematici umani.

Parole chiave: SERS, phage display, cellule U937, identificazione cellulare, malattia minima residua.

1. Introduzione

La scoperta di nuovi marcatori per l'identificazione e la discriminazione di tipologie cellulari, come le cellule neoplastiche, è uno dei principali obiettivi nella diagnostica del cancro. La leucemia è una delle principali malattie del sangue che colpisce le cellule staminali emopoietiche, midollo osseo e sistema linfatico. In questa neoplasia, la popolazione clonale di cellule neoplastiche mostra marcata eterogeneità in relazione alla proliferazione ed al differenziamento (Bonnet e Dick, 1997; Reya et al., 2001). Per questo motivo vi è la necessità di sviluppare nuovi approcci per il rilevamento rapido ed accurato di leucemie ai primi stadi della malattia e per il monitoraggio della malattia minima residua.

La spettroscopia Raman è una tecnica ottica, basata sull'utilizzo di un laser, utilizzata per l'analisi molecolare di un campione. Uno spettro Raman ottenuto da cellule o tessuti fornisce una "impronta digitale molecolare" di un campione in quanto permette di ottenere informazioni dettagliate sui legami e conformazioni molecolari e sulle interazioni intermolecolari. L'approccio non è invasivo ed è quindi ideale per lo studio di sistemi cellulari. Nonostante i suoi vantaggi, i suoi utilizzi pratici sono stati notevolmente limitati in quanto il segnale di scattering Raman è intrinsecamente più debole rispetto alla maggior parte degli altri segnali di fluorescenza (Qian e Nie, 2008). Vari metodi sono stati sviluppati al fine di estendere il suo limite di rilevamento. Tra questi, un aumento del segnale basato sull'utilizzo di nanostrutture di metalli nobili si è rilevato particolarmente interessante.

La Spettroscopia Raman amplificata da superfici (SERS) è uno strumento di analisi molto sensibile, adatto anche per il rilevamento di singole molecole. Nel SERS, nanoparticelle metalliche, come nanoparticelle di

argento o oro, possono migliorare gli spettri Raman delle molecole attraverso l'amplificazione locale del campo elettromagnetico incidente su un campione adsorbito su una superficie metallica (Aroca et al., 2005; Ko et al., 2008; N. Agarwal et al., 2011, Fazio et al., 2013). La sensibilità della spettroscopia SERS ha dimostrato di essere più elevata di 10^{14} - 10^{15} (Nie e Emory, 1997; Kneipp et al., 1997). Questa tecnica è stata considerata come uno strumento analitico promettente per l'analisi di campioni biologici in quanto fornisce informazioni spettroscopiche dettagliate, ciò può essere tradotto in segnale imaging ed adattato ad un sistema di imaging *in vivo* (Qian et al., 2008). Nanoparticelle di oro e argento potrebbero essere utilizzate non solo come substrati plasmonicamente attivi per il rilevamento SERS in assenza di una molecola reporter, ma anche funzionalizzate con differenti molecole Raman reporter per il targeting di ligandi specifici come peptidi, proteine, anticorpi, acidi nucleici (DNA) e frammenti di anticorpi (Zhang et al., 2011; Jokerst et al., 2011; Gao et al., 2013, Neng et al., 2013, Baniukevic et al., 2013). Più recentemente, sono state sviluppate nuove strategie utilizzando come interruttore un modello di polimerizzazione del DNA a doppio filamento e per l'aumento del segnale nanoparticelle magnetiche di argento per la detenzione spettroscopica Raman-specifica di DNA fino al livello sub-picomolare (Gao et al., 2012) e combinando enzimi a DNA che assistono alla replicazione e all'amplificazione a cerchio rotante del DNA stesso per la detezione della trombina (Gao et al., 2015).

Il targeting nucleare ed il rilevamento di singole cellule eucariotiche vitali è stato già ottenuto utilizzando nanoparticelle di oro funzionalizzate con un peptide segnale (Xie et al., 2009). Tuttavia, a causa della grande dimensione del nucleo e della sua diversità biochimica, gli spettri risultanti contenevano notevoli variazioni. Così, la capacità di localizzare sonde SERS all'interno delle cellule viventi è strettamente necessario al fine di ottenere uno spettro SERS riproducibile della cellula. Per questo motivo, è essenziale identificare sonde selettive che possano agire come nanotags SERS per il riconoscimento di cellule bersaglio. Ahmad et al. hanno realizzato una SERS guidata da un peptide (pgSERS) utilizzando nanoparticelle di argento (AgNPs) coniugate con peptidi sintetici, diretti verso membrana esterna di cellule di *Escherichia coli* (Ahmad et al., 2012). Tuttavia, i peptidi presentano svantaggi quali l'instabilità conformazionale, la sensibilità alle variazioni dei parametri fisico-chimici del mezzo e l'alto costo di sintesi e produzione.

La Phage display è una tecnica biologica che permette la presentazione di peptidi esogeni sulla superficie di un fago filamentoso. Una libreria phage display è costituita da un pool di fagi filamentosi, ognuno dei quali espone peptidi casuali sulla superficie di una delle proteine di rivestimento del fago, come la pVIII e la pIII (Smith e Petrenko, 1997). La libreria viene utilizzata per selezionare cloni fagici specifici che interagiscono con particolari obiettivi, generando sonde molecolari con elevata affinità e selettività. Per questo motivo, la tecnologia phage display ha trovato varie applicazioni in campo medico, ingegneristico e diagnostico (Arap, 2005;. Carnazza et al., 2007;. Carnazza et al., 2008;. De Plano et al., 2014). I batteriofagi filamentosi rappresentano un'alternativa interessante di anticorpi o peptidi sintetici, essi hanno alcuni vantaggi quali la robustezza, resistenza al calore e a molti solventi organici, acidi, alcali o ad altre sollecitazioni ed una produzione a basso costo (Petrenko e Smith, 2000; Petrenko e Vodyanoy, 2003). In questo articolo, viene riportato un nuovo approccio per lo sviluppo di network AgNPs-fagi biologicamente attivi che funzionano come reporter di segnale per un effetto SERS guidato su target molecolari cellulari-specifici. Una linea cellulare di linfoma istiocitico (U937) è stata utilizzata come modello *in vitro* di cellule tumorali ed una libreria fagica di peptidi random di 9 aminoacidi è stata selezionata verso cellule U937 al fine di identificare un clone che riconosca selettivamente queste cellule. Questo sistema modello rappresenta un prototipo di studio in quanto propone un metodo sensibile e riproducibile per l'imaging cellulare *in vitro*.

2. Materiali e metodi

2.1. Screening di librerie phage-display peptidiche casuali

Una libreria phage-display di peptidi random di 9 aminoacidi (gentile dono del Prof. F. Felici) è stata costruita nel vettore pC89, clonando un inserto di DNA casuale tra il terzo ed il quinto codone del gene pVIII codificanti i segmenti della proteina pVIII matura (Felici et al., 1991). Questa libreria è stata selezionata verso cellule U937 intere in sospensione. La linea cellulare U937 è stata fornita dalla American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1593.2™) e mantenuta in RPMI 1640 con L-Glutamina (Lonza, BE12-702F) supplementato con il 10% di siero bovino fetale (FBS, Lonza DE14-801F), penicillina (100 unità/ml) e

streptomycin (100 µg/ml) a 37°C in incubatore a CO₂ al 5% umidificato. Le cellule U937 erano raccolte per centrifugazione a 800 rpm per 5 minuti, lavate due volte in soluzione salina tamponata di Hank (HBSS, Sigma-Aldrich pH 7.6) e risospese alla concentrazione di 1·10⁶/ml. La selezione è stata condotta seguendo la procedura di Cao et al. (2003) con alcune modifiche. Sono stati condotti tre cicli di selezione ed i fagi ricombinanti identificati piastrandoli su L-agar addizionato con X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside), IPTG (isopropyl thiogalactoside) ed ampicillina. La presenza dell'inserito era rilevata tramite X-gal che produce una caratteristica colorazione blu quando clivato dalla β-galattosidasi. Le colonie batteriche blu, dal terzo ciclo di selezione, erano selezionate a random. Ogni colonia conteneva un singolo clone fagico.

2.2. Test ELISA

La capacità di legare le cellule target dei 13 cloni fagici selezionati è stata testata tramite ELISA utilizzando come controllo negativo il vettore pC89. 2,5·10⁴ cellule U937 in soluzione salina tampone fosfato (PBS) sono state dispensate in ciascun pozzetto di una micropiastra a 96 pozzetti (Orange Scientific) ed incubate over night a 4°C. Quindi erano fissate con metanolo per 10 minuti a temperatura ambiente (TA), lavate per tre volte con tampone di lavaggio (PBS+0,05% Tween 20) e bloccate con 100 µl di PBS+ 5% Lattalbumina + 0,05% Tween 20 per 2 ore a 37°C a 30 rpm. 1·10¹⁰ cloni fagici, diluiti in PBS + 1% Lattalbumina + 0,1% Tween 20, erano aggiunti in ciascun pozzetto e la piastra incubata per 1 ora a 37°C a 30 rpm. Dopo tre lavaggi in tampone di lavaggio, le cellule erano incubate con l'anticorpo monoclonale anti-M13 coniugato con perossidasi (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) alla diluizione 1/5000 in PBS + 1% Lattalbumina + 0,1% Tween 20 (100 µl/pozzetto) per 1 ora a 37°C. Dopo altri tre lavaggi, il legame dell'anticorpo è stato rilevato aggiungendo il sistema di substrato liquido per ELISA 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, Sigma-Aldrich), incubato per 45 minuti a TA e stoppato con 25 µl di H₂SO₄ 1 M. L'assorbanza a 450 nm è stata misurata al Multiskan (FC ThermoScientific).

2.3. Analisi della sequenza peptidica

L'inserito di DNA dei cloni fagici è stato amplificato tramite reazione a catena della polimerasi (PCR) e sequenziato. I prodotti di PCR sono stati purificati tramite il kit di purificazione PCR QIAquick (Qiagen) e

sequenziati avvalendosi del servizio di sequenziamento del CRIBI (Università di Padova, Italia) utilizzando il primer M13 -40 (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3'). Le sequenze amminoacidiche sono state allineate in base alla loro similarità utilizzando il programma di allineamento di sequenza Clustal X 2.1 con la matrice IDENTITY (disponibile su [<http://clustalx.software.informer.com/2.1/>]). Il tool Gene Doc (disponibile su [<http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/ibmpc/genedoc-readme.html>]) è stato usato per visualizzare, editare ed analizzare gli allineamenti di sequenza multipli dei peptidi (Thompson et al., 1994; Aiyar, 2000). L'analisi statistica è stata condotta per calcolare la frequenza aminoacidica e la diversità nell'ambito dei pool di peptidi nei cloni fagici selezionati.

2.4. Marcatura dei fagi con FITC

$5 \cdot 10^{10}$ PFU (Unità Formanti Placca) erano risospesi in 200 μ l di tampone $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9.2) con 5 μ l di fluoresceina isotiocianato (FITC, 5 mg/ml). I fagi erano incubati per 2 ore al buio a TA in agitatore rotante per consentire la reazione con il fluorocromo. Il campione è stato incubato over night a 4°C con 200 μ l di PEG/NaCl e poi centrifugato a 15300g (Microcentrifuga Eppendorf 5417R) a 4°C per 1 ora. Il surnatante era scartato ed il pellet risospeso in 100 μ l di soluzione salina tampone Tris [TBS, (7,88g/L Tris-HCl, 8,77g/L NaCl)]. Anche il fagemide privo di inserto (pC89) è stato marcato come controllo negativo. I fagi marcati erano conservati al buio a 4°C fino all'utilizzo.

2.5. Preparazione del campione per l'acquisizione delle immagini a fluorescenza

$2,5 \cdot 10^5$ cellule U937 erano poste su vetrini polilisinati (PLL) e fissate con metanolo assoluto freddo per 10 minuti. Le cellule erano lavate tre volte con PBS e poi incubate con 50 μ l di clone fagico marcato FITC (titolo $4 \cdot 10^{10}$ PFU/ml, rapporto cellule/fagi 1:10000) per 1 ora a 37°C. Dopo due lavaggi con PBS ed uno con acqua ultrapura, il campione era lasciato asciugare all'aria. Il vettore wild-type pC89 era utilizzato come controllo negativo per la valutazione dell'eventuale background per legame aspecifico. I campioni sono stati analizzati tramite microscopio a fluorescenza (Leica DMRE) con ingrandimento 63 $\times$.

2.6. Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle di Ag

Soluzioni colloidali di nanoparticelle di Ag sono state preparate mediante ablazione da un fascio laser impulsato di un target di Ag altamente puro (99%) immerso in acqua distillata, usando la seconda armonica

(532 nm) di un laser Nd:YAG che opera alla frequenza di ripetizione di 10Hz con una larghezza di impulso di 5 ns. Il target è stato irraggiato con una energia del laser di 50 mJ e per un tempo di ablazione di 15 min. La risposta in termini di assorbimento ottico nella regione UV-vis delle nanostrutture di Ag è stata investigata direttamente infase colloidale dopo il processo di ablazione laser, usando uno spettrometro Perkin-Elmer Lambda 750 nell'intervallo 190-1100 nm. Le dimensioni delle nanoparticelle sono state determinate eseguendo misure di Dynamic light Scattering (DLS) usando un analizzatore di nanoparticelle della Horiba (intervallo 0.3 nm – 8 micron). Una goccia della stessa soluzione è stata depositata su substrati di carbonio per eseguire misure di microscopia a scansione a sonda (SEM). Le immagini SEM sono state acquisite usando un microscopio (Merlin; modello ZEISS-Gemini 2) che opera alla tensione di accelerazione di 5KV. L'analisi EDX è stata eseguita usando uno spettrometro Quantax EDX. La dimensione sondate dall'EDX è di circa 0.7 micron. Gli spettri XPS sono stati acquisiti usando una sorgente K-Alpha (1486.6eV) che opera nella modalità ad energia costante (CAE) con una energia di 20eV per gli spettri ad alta risoluzione ed uno spot di 400 micron. Le immagini TEM sono state acquisite usando un microscopio JEOL-2010 che opera alla tensione di accelerazione di 200 kV.

2.7. Preparazione e caratterizzazione dei network fago-AgNPs

I network fago-AgNPs erano preparati incubando le nanoparticelle di Ag con i cloni fagici, risospesi in tampone TBS, in rapporto 4:1 a 30°C in agitatore orbitale a 320 rpm (KS130 Basic IKA) over night. Al fine di separare i network fago-AgNPs dai fagi non legati e dall'argento libero, i network erano purificati tramite centrifugazione a 20800g per 30 minuti. Il complesso era conservato a 4°C fino all'utilizzo.

2.8. Preparazione del campione per l'analisi Raman

2.8.1. Cellule U937

$2 \cdot 10^5$ cellule erano poste su provini di CaF_2 polilisinati e fissate con metanolo assoluto freddo per 10 minuti. Dopo due lavaggi in PBS ed uno in acqua ultrapura, il campione era lasciato asciugare all'aria.

2.8.2. Fagi

50 μ l di sospensione fagica erano posti su provini di CaF_2 polilisinati. Il campione era lasciato asciugare all'aria.

2.8.3. U937 + fagi

$2 \cdot 10^5$ cellule erano poste su provini di CaF_2 polilisinati e fissate con metanolo assoluto freddo per 10 minuti. Dopo tre lavaggi in PBS, le cellule erano incubate con 50 μ l del clone fagico (titolo $4 \cdot 10^{10}$ PFU/ml, rapporto cellule/fagi 1:10000) per 1 ora a 37°C. Dopo due lavaggi con PBS ed uno con acqua ultrapura, il campione era lasciato asciugare all'aria.

2.8.4. AgNPs + U937

$2 \cdot 10^5$ cellule erano poste su provini di CaF_2 polilisinati e fissate con metanolo assoluto freddo per 10 minuti. Dopo tre lavaggi in PBS, le cellule erano incubate con 50 μ l di AgNPs per 1 ora a 37°C. Dopo due lavaggi con PBS ed uno con acqua ultrapura, il campione era lasciato asciugare all'aria.

2.8.5. AgNPs-fago

50 μ l di sospensione di network AgNPs-fago erano posti su provini di CaF_2 polilisinati. Il campione era lasciato asciugare all'aria.

2.8.6. U937 + AgNPs-fago

$2 \cdot 10^5$ cellule erano poste su provini di CaF_2 polilisinati e fissate con metanolo assoluto freddo per 10 minuti. Dopo tre lavaggi in PBS, le cellule erano incubate con 50 μ l di network AgNPs-fago per 1 ora a 37°C. Dopo due lavaggi con PBS ed uno con acqua ultrapura, il campione era lasciato asciugare all'aria prima della caratterizzazione con microscopia Raman nel range 200-1800 cm^{-1} . I campioni erano analizzati tramite spettroscopia micro-Raman utilizzando uno spettrometro Horiba XploRa equipaggiato con un microscopio Olympus BX40, un sensore CCD Peltier ed un laser a 532 nm (2,33 eV) come fonte di eccitazione. Un tempo di acquisizione di 100 secondi ha consentito un sufficiente rapporto segnale/rumore (S/N). I parametri di misura non inducevano danni cellulari. Per garantire la riproducibilità, gli esperimenti sono stati condotti in triplo.

3. Results and discussion

3.1 Screening di librerie phage-display peptidiche casuali ed analisi delle sequenze

Una libreria phage-display di peptidi random di 9 aminoacidi è stata selezionata verso intere cellule di linfoma istiocitico diffuso (U937) in sospensione. I cloni fagici più reattivi, in termini di specificità di legame verso cellule di U937, derivanti dal terzo round di selezione di affinità, venivano amplificati ed i loro DNA sequenziati per determinare la sequenza dei peptide esposti. La sequenza amminoacidica dedotta, era allineata utilizzando il software CLUSTALX 2.1 basato sulla matrice IDENTITY, mentre la sequenza consenso era ottenuta attraverso il software GENEDOC. Tutte le sequenze contenevano due residui amminoacidici carichi positivamente (Lisina e Arginina) nella regione ammino-terminale e residui non polari in posizione centrale. Tali regioni potevano essere direttamente coinvolte nell'interazione con le cellule da riconoscere (cellule target). Tra tutti i peptidi, la sequenza esposta dal fago EIII1 mostrava la similarità con la consenso più significativa quando tutte le sequenze dei cloni venivano allineate con quest'ultima (Fig. 1).

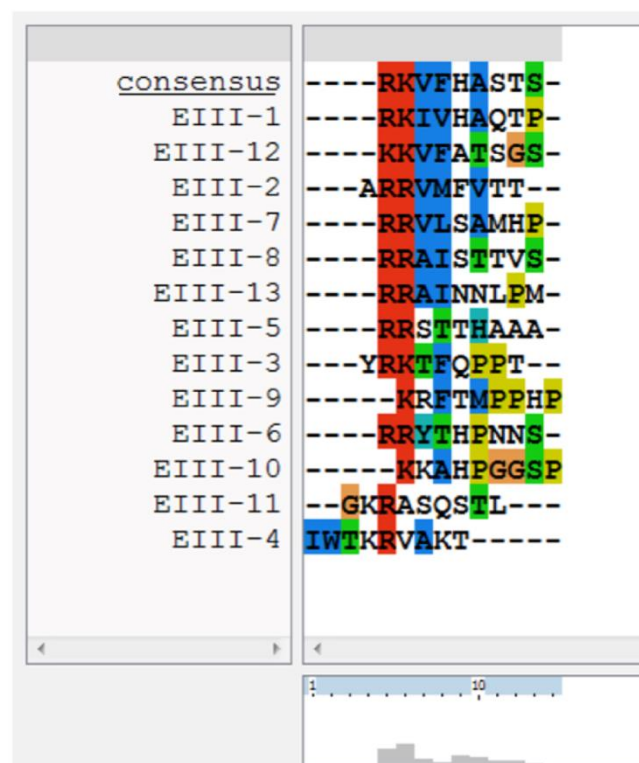


Fig. 1.

Il legame relativo dei cloni fagici veniva stimato attraverso test ELISA, utilizzando come controllo negativo il vettore fagico privo di inserto, pC89. I risultati mostravano che tutti i cloni selezionati avevano reattività e specificità simili per le cellule target U937 (dati non mostrati).

Data la similarità di sequenza e i risultati ELISA tra i cloni affini selezionati, il clone fagico che presentava l'inserto con sequenza dedotta RKIVHAQTP, denominato EIII1, veniva scelto come modello per testare l'autoassemblaggio fago-nonoparticelle di argento (AgNPs).

3.2 Analisi delle immagini a fluorescenza

Per confermare il riconoscimento delle cellule target, il clone EIII1 veniva marcato con FITC, fluorocromo ammino-reattivo per l'imaging in vitro. Sebbene questo fluorocromo si leghi alla proteina maggiore di rivestimento fagico, pVIII, come dimostrato da Jaye *et al.* (2004), la selettività di legame dei peptidi esposti sulla proteina capsidica veniva mantenuta.

Il clone EIII1 risultava legare specificamente le cellule di U937, come osservato dalla fluorescenza verde prodotta da FITC (Fig. 2a, 2b). La fluorescenza veniva abbassata quando veniva utilizzato il fagemide privo di inserto, pC89, indicando una specificità del peptide espresso da EIII1 (Fig. 2c).

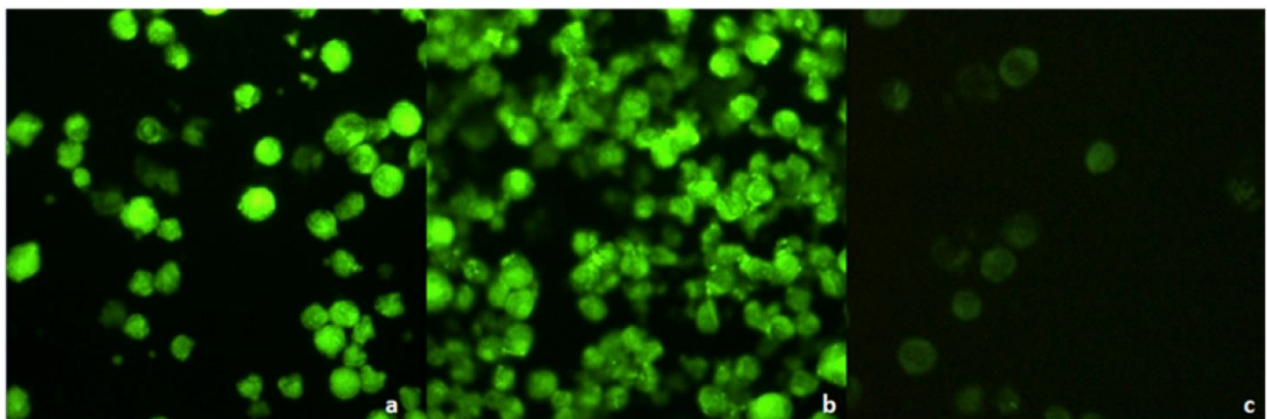


Fig. 2. a, b, c.

3.3 Nanoparticelle di argento

Gli spettri di assorbimento ottico dei nano colloidali di Ag mostrano una banda di assorbimento ben definita (Fig.3a). Il picco massimo di questo contributo di assorbimento, dovuta alla risonanza plasmonica di superficie, è centrato a 406 nm. L'allargamento del picco plasmonico chiaramente indica la presenza di nanoparticelle (NPs) dalle dimensioni diversificate. Le dimensioni e distribuzioni sono state determinate da misure di DLS e TEM (Fig. 3b). I campioni di Ag consistono di una distribuzione di nanoparticelle quasi sferiche, le cui dimensioni sono minori di 10 nm con un PDI di 0.4 (dove 0.4 si riferisce alla popolazione polidispersa); sono state osservate anche alcune nanoparticelle più grandi di 50 nm che sono caratterizzate da un potenziale Zeta di -27 mV, indicando una elevata stabilità della soluzione colloidale, escludendo la possibilità di processi di aggregazione.

3.4 Network fago-AgNPs

Il prodotto derivante dall'incubazione del clone fagico EIII1 con le AgNPs dopo un overnight a 30°C, risultava in una soluzione di colore giallastro. Esso veniva inizialmente caratterizzato tramite spettroscopia ottica di assorbimento UV-vis. Lo spettro della soluzione AgNPs-EIII1 mostrava una banda intensa ben definita centrata a 406 nm, scritta al contributo plasmonico di superficie delle AgNPs ed una banda meno intensa intorno a 269 nm, derivante dai residui aromatici del fago (Fig. 3c). Tale contributo era simile a quanto osservato in letteratura (Schmid, 2001; Overman et al., 2005). Successivamente i complessi AgNPs-EIII1 venivano caratterizzati mediante SEM. Alcuni networks, costituiti da intere strutture fagiche direttamente assemblate con AgNPs, erano evidenti all'immagine SEM, come mostrato in Fig. 3d.

In particolare nanostrutture assemblate Ag-phage venivano formate dai film fagici assemblati lungo tutta la scala micrometrica investigata (Fig. 3e). La Fig. 3f mostra lo spettro Ag 2p XPS del network Ag-NPs-EIII1. La riga Ag 3d mostra due grossi picchi a 374.1 e 368.1 eV, correlati rispettivamente all' $\text{Ag}3d_{3/2}$ e all' $\text{Ag}3d_{5/2}$. Ulteriormente la detezione XPS di C, O, Cl e principalmente dell' N e Ag è un segnale di riferimento che suggerisce l'assorbimento del fago vicino alle AgNPs. Questo risultato suggerisce che il fago ha un'alta affinità per l'Ag, indice dell'assemblaggio delle AgNPs con il fago. I dati di composizione XPS

venivano confermati dai risultati EDX, come mostrato nella Tabella 1. La maggior parte delle AgNPs sono nelle regioni in cui la sonda EDX mostrava la presenza di azoto, carbonio e ossigeno. Questo risultato indica inoltre che le strutture fagiche erano decorate e/o chimicamente legate alle AgNPs.

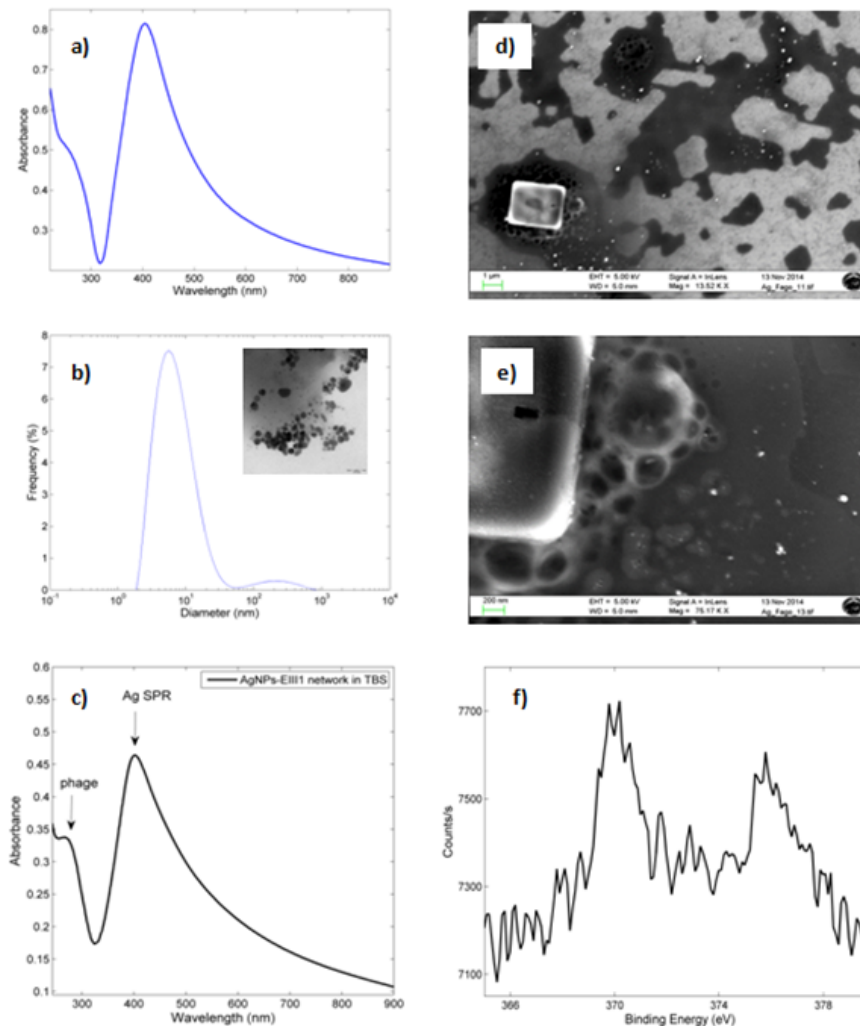


Fig. 3. a, b, c, d, e, f.

La superficie del fago contiene oltre 2700 copie della sua principale proteina di rivestimento, pVIII, di cui circa il 50% esponeva peptidi leganti le cellule target (Wang et al., 2006). Così, l'aggancio del clone EIII1 con le AgNPs avveniva probabilmente attraverso la porzione N-terminale delle proteine pVIII. Questo consisteva in una specifica interazione tra i gruppi funzionali della proteina di rivestimento pVIII e la superficie delle AgNPs. Il potenziale zeta del clone EIII1 e del network AgNPs-EIII1 network, calcolato attraverso la mobilità elettroforetica, erano rispettivamente -25 mV and -15 mV. Il potenziale zeta del network AgNPs-EIII1 si

spiega sulla base della distribuzione del fago rispetto alle AgNPs e della loro interazione elettrostatica. Inoltre, tali risultati indicano che l'assemblaggio AgNPs–EIII1 era abbastanza stabile.

Tabella 1.

Composizione elementare EDX ed XPS del network AgNPs-EIII1

Elemento	Serie	EDX C norm (wt %)	EDX C atom. (wt %)	XPS C. atom (%)
Ag	L	88.0	49.5	2.20
C	K	5.2	26.3	65.0
O	K	4.4	16.7	27.0
N	K	1.3	5.8	3.90
Cl	K	1.1	1.7	1.90

3.5 Analisi Raman

L'interazione tra il network AgNPs–EIII1 e le cellule U937 veniva valutato, anche, mediante spettroscopia Raman. Inizialmente, venivano analizzati gli spettri Raman delle sole cellule U937 e del solo clone fagico EIII1(Fig. 4). Gli spettri Raman registrati su differenti campioni ed in differenti posizioni per ogni singolo campione erano simili. Lo spettro Raman delle cellule U937 (Fig. 4) mostrava differenti picchi assegnabili alle proteine (901.5, 990.4, 1269 and 1675 cm^{-1}), acidi nucleici (1094 and 1345 cm^{-1}) e zuccheri (1462 cm^{-1}) (Allegra et al., 2014). La presenza ed, in particolare, la posizione dei picchi Raman, generalmente osservati nelle cellule U937, sono fortemente influenzati dal metodo di fissazione delle cellule (Chan et al., 2009; Ranc et al., 2013). Nel nostro caso, il trattamento con metanolo induceva un incremento dell'intensità dei contributi attribuibili alle proteine ed ai carboidrati di membrana. Tale effetto è spiegato sulla base dell'azione del metanolo sui lipidi di membrana. D'altra parte, i picchi ascritti alla composizione proteica rimangono quasi totalmente invariati. Nonostante ciò, il trattamento delle U937 con metanolo non

modifica la capacità del clone fagico di riconoscere il target cellulare, come mostrato dall'analisi in fluorescenza.

Lo spettro Raman del clone EIII1 (vedi Fig. 4) era caratterizzato da alcuni contributi localizzati a 1196, 1248, 1283, 1388, 1627 and 1751 cm^{-1} , attribuibili allo stretching vibrazionale delle amidi, e da altri picchi centrati a 621, 751.7 and 1463 cm^{-1} , dovuti ai residui aromatici delle proteine di rivestimento del fago (Aslanian et al., 1982; Aubrey and Thomas, 1991). Inoltre, lo spettro Raman del clone fagico EIII1 mostrava una banda debole a 883.5 cm^{-1} ed un intenso contributo a 1062 cm^{-1} , riferito allo stretching vibrazionale del gruppo PO^{2-} riferito al DNA fagico impacchettato (Benevides et al., 1991). Per valutare le modifiche strutturali delle U937, dopo il riconoscimento del fago, venivano condotte misure Raman anche sul complesso assemblato U937-EIII1. In Fig. 4 viene mostrato lo spettro Raman del complesso U937-EIII1. Dallo spettro si rende evidente che le features Raman delle U937, dovute ai contributi di proteine, acidi nucleici e zuccheri, si spostano a lunghezze d'onda più basse (1078, 1252, 1323, 1455 e 1667 cm^{-1}). Un'ulteriore indicazione dell'interazione dell'intera struttura fagica con le cellule U937 viene evidenziata dalla presenza di nuovi picchi centrati a 764, 972, 1010, 1177 e 1600 cm^{-1} . Lo spostamento dei picchi Raman veniva ricondotto all'interazione tra il peptide fagico ingegnerizzato con le cellule U937 (Miskovsky et al., 1998; Fabriciova et al., 2004; Jurasekova et al., 2009). I nuovi picchi erano ascritti agli stretching vibrazionali di saccaridi e proteine, suggerendo che il target di legame del fago era rappresentato da una glicoproteina cellulare (Lu et al., 2013).

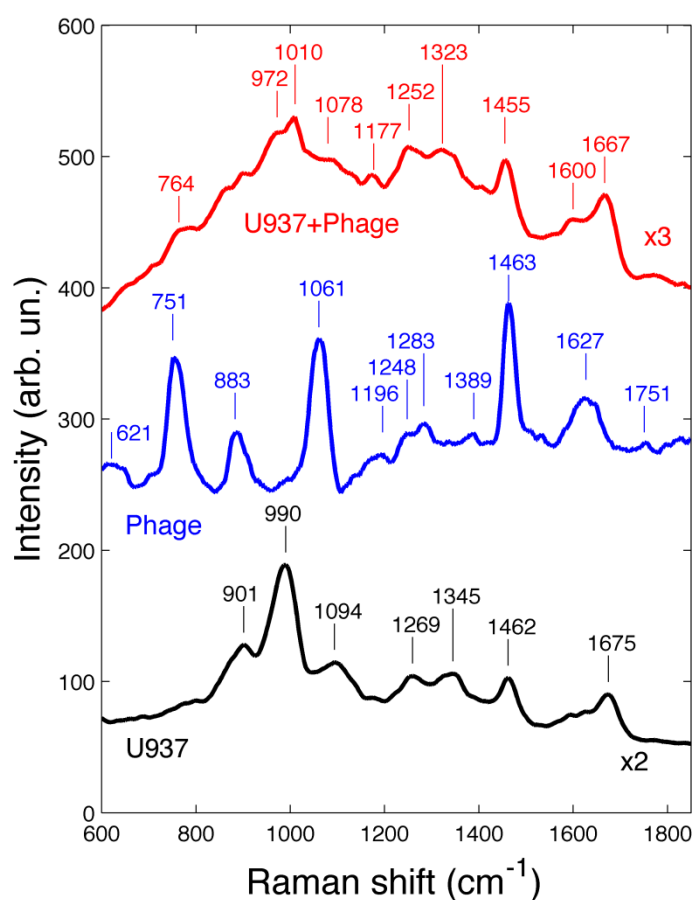


Fig. 4.

I principali costituenti biochimici del complesso U937-EIII1 sono proteine, acidi nucleici e zuccheri. Sebbene il riconoscimento specifico consente di riconoscere la sovrapposizione di molte specie chimiche, derivanti sia dal fago che dalla cellula, l'analisi di molte bande che emergono nella stessa posizione, e perciò sovrapposte, risultava essere difficile. A tal proposito, bande marcatori specifiche per alcuni tipi molecolari, venivano assegnate ad alcune delle componenti biochimiche considerate. Non era possibile utilizzare le bande più evidenti come marcatori in quanto risultanti dalla sovrapposizione di più bande ascrivibili a differenti componenti molecolari e perciò tra loro indistinguibili. Per tale ragione, veniva utilizzata l'analisi SERS per valutare specifici cambiamenti strutturali nelle U937, dal momento che l'incremento del segnale spettrale era dipendente dal modo in cui la proteina fagica pVIII si legava alla superficie delle AgNPs, e conseguentemente alle cellule U937.

In Fig. 5 vengono mostrati gli spettri Raman dei complessi assemblati AgNPs-U937 and AgNPs-EIII1. Lo spettro Ag-U937 risultava essere simile allo spettro relativo alla sola cellula U937, mentre il network AgNPs-

EIII1 mostrava alcune differenze rispetto al solo clone fagico EIII1. Le principali differenze erano: i) uno spostamento significativo delle features Raman associate ai contributi proteici, osservati a 1173, 1275, 1369, 1739 and 1838 cm^{-1} ; ii) un incremento dei picchi Raman associati a proteine e DNA (questi ultimi erano osservati a 880.9 e 1059 cm^{-1}); iii) un lieve incremento e spostamento delle features associate al clone fagico EIII1 da 621, 751.7, 1463 e 1627 cm^{-1} a 644.5, 754.3, 1461 e 1620 cm^{-1} . In accordo alla letteratura, questi cambiamenti spettrali dipendono sia dall'orientamento che dalla distanza delle molecole dalla superficie della nano-struttura metallica (Podstawka et al., 2004). Tuttavia, questo comportamento è indice degli stretching vibrazionali dei residui amminoacidici esposti dalla proteina capsidica pVIII, suggerendo la sua interazione con le AgNPs nel network (Stewart and Fredericks, 1999). Se le vibrazioni Raman delle molecole reporter sono strette e non sovrapposte, l'inclusione del network AgNPs-EIII1 nelle cellule U937 (i cui segnali vibrazionali caratteristici fungono da reporter Raman) potrebbe potenzialmente monitorare interazioni sia differenti che nuove. A tal proposito, abbiamo effettuato misure Raman sull'intero sistema U937-EIII1-AgNPs, il cui spettro viene mostrato in Fig. 5. Le cellule U937 riconosciute dal network EIII1-AgNPs mostravano la comparsa di nuovi picchi Raman a 862.6, 1132 and 1154 cm^{-1} in aggiunta all'incremento dell'intensità di alcune delle principali features Raman delle U937 (in particolare, i contributi relative alle proteine a 760.6, 1013, 1154, 1169, 1177, 1248, 1320, 1455, 1589 e 1667 cm^{-1}). Queste caratteristiche spettrali si riferiscono a complessi oligossacaridici, ovvero le molecole coinvolte nell'interazione sonda-cellula target (Rehman et al., 2012). L'elevato campo elettrico vicino le nanoparticelle di Ag permettono un differente meccanismo di accoppiamento tra il campo elettrico e le vibrazioni. Le regole di selezione per questo processo differiscono fortemente dalle regole di selezione usualmente trovate per il Raman. L'osservato effetto SERS indotto dalle NPs di Ag con la comparsa di nuovi picchi Raman è da attribuire alla ridotta simmetria delle molecole investigate o la presenza di un forte campo in prossimità alla superficie delle nanoparticelle metalliche (Fazio et al., 2012).

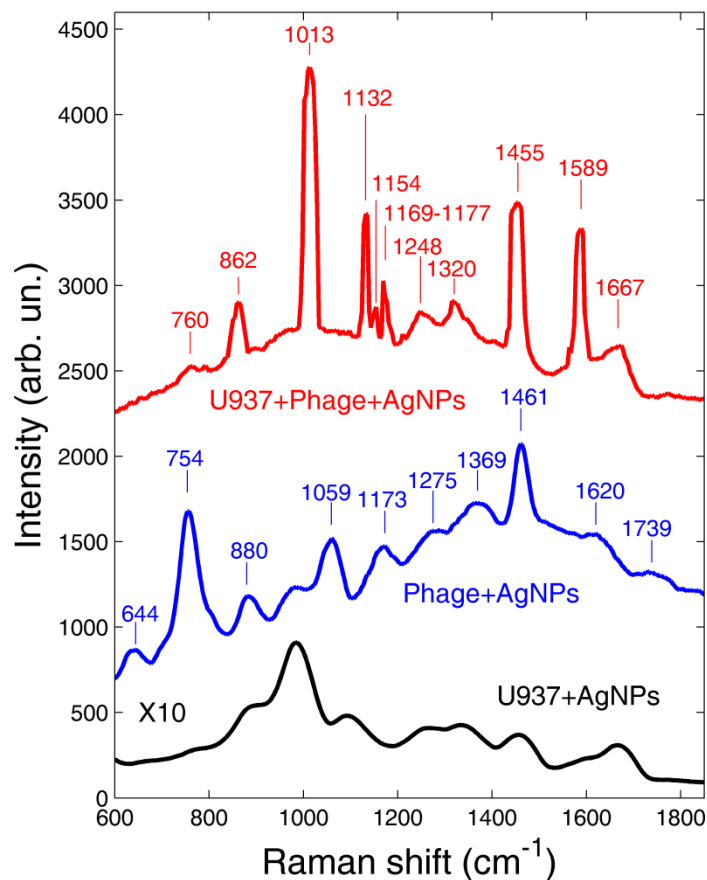


Fig. 5.

In questo caso, il target cellulare specifico, a cui il complesso EIII1-AgNPs si legava, era probabilmente rappresentato da un recettore glicoproteico localizzato sulla membrana plasmatica. Perciò, il network AgNPs–fago, da noi assemblato, potrebbe funzionare come segnale reporter per spettroscopia SERS. Un approccio simile è stato adottato da Souza *et al.*, che ha effettuato un targeting biomolecolare specifico utilizzando il fago filamentoso fd, ingegnerizzato per mostrare sulla superficie della sua proteina pIII il peptide targeting RGD-4C (Souza *et al.*, 2006). Tali fagi erano complessati a nanoparticelle di oro in networks molecolari biologicamente attivi ed usati per marcare cellule in sospensione. L'organizzazione spontanea di questi networks era ulteriormente manipolata attraverso l'incorporazione di imidazolo, una molecola legante i metalli. Tuttavia, questi networks mostravano un alto background nel segnale SERS che abbassava il rapporto di dosaggio segnale- rumore, esponendo i tags a cambi spettrali e ad aggregazione.

Alla stessa maniera di Souza *et al.*, il network da noi proposto ha il vantaggio di integrare in un unico segnale reporter le proprietà delle AgNPs, preservando le proprietà biologiche del fago e senza l'aggiunta di

ulteriori segnali reporters (come ad esempio imidazolo o complessi del rutenio bipyridile). Inoltre, non vi è necessità di nessuna informazione preliminare circa la natura del target cellulare. In particolare, emerge che il network molecolare, risultante dall'intera struttura fagica direttamente assemblata con AgNPs rappresenta una nuova sonda SERS per l'identificazione *in vitro* di cellule U937, che può essere potenzialmente estesa per il rilevamento di target molecolari specifici per altre tipologie cellulari. La strategia proposta potrebbe essere un metodo estremamente sensibile per l'identificazione di cellule cancerose ematologiche e per il rilevamento della malattia residua minima in una percentuale significativa di tumori ematici umani. Infine, l'approccio proposto potrebbe rappresentare un metodo per la rapida identificazione di cellule neoplastiche ed allo stesso tempo il network AgNPs-phage potrebbe essere utilizzato come carrier per terapie farmacologiche ed per il riconoscimento e killing di cellule tumorali. Infatti, è ben noto che le AgNPs sono direttamente coinvolte nella distruzione della catena respiratoria mitocondriale, promuovendo la produzione di ROS production, interrompendo la sintesi di ATP e causando il danneggiamento del DNA (Rosarin et al., 2012).

4. Conclusioni

La spettroscopia Raman è una tecnica rapida e non distruttiva, sensibile ai cambiamenti chimici e fisici di molecole biologiche. Essa può essere utilizzata per riconoscere con elevata sensibilità i cambiamenti di quantità e/o conformazione che avvengono in acidi nucleici, proteine, lipidi e carboidrati. Nonostante i suoi vantaggi, il segnale di scattering Raman è intrinsecamente debole, così vari metodi di miglioramento sono stati sviluppati per estendere il suo limite di rivelamento.

La SERS è una variazione della spettroscopia Raman che offre un miglioramento significativo del segnale in presenza di nanoparticelle metalliche, rendendo il rilevamento veloce, più semplice e più accurato. Tuttavia, la sfida principale con SERS è il raggiungimento di spettri ripetibili e riproducibili. L'approccio SERS sviluppato in questa ricerca rappresenta un importante metodo per ridurre la complessità di analisi SERS di cellule eucariotiche che permette di identificare bersagli molecolari cellulo-specifici. La linea cellulare

promonocitica umana U937 è utilizzata come modello in vitro di cellule tumorali ed una libreria fagica di peptidi random di 9 aminoacidi è stata selezionata verso cellule U937 al fine di identificare un clone che riconosca selettivamente queste cellule. Il network nanostrutturato Ag⁺-batteriofago rappresenta una nuova sonda SERS per l'identificazione delle cellule U937, potenzialmente estensibile per il rilevamento di altre cellule neoplastiche e, a sua volta, per la rilevazione della malattia residua minima. Questo sistema modello rappresenta un prototipo di studio per la progettazione di biosensori altamente sensibili e selettivi per il rilevamento rapido e non invasivo di cellule cancerose.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato parzialmente finanziato dal Ministero Italiano dell'Educazione, Università e Ricerca (MIUR) mediante il Programma nazionale PON R&C 2007-2013, progetto *“Hippocrates– Sviluppo di Micro e Nano-Tecnologie e Sistemi Avanzati per la Salute dell’uomo (PON02 00355)”*. Gli autori sono anche grati per il supporto finanziario dell' A.B.A.L. onlus Messina (Italia) (<http://abalmessina.it/>) per la selezione del clone e per l'utilizzo dello spettrometro Raman XploRA e per il gentile dono delle librerie paheg-display da parte del Prof. Franco Felici.

Referenze

Agarwal, N., Fazio, E., Neri, F., Trusso, S., Castiglioni, C., Lucotti, A., Santo, N., Ossi, P.M., 2011. Cryst. Res. Technol. 46, 836-840.

Ahmad, I., Athamneh, M., Senger, R. S., 2012. Appl. Environ. Microbiol. 78(21), 7805-08.

Aiyar, A., 2000. Methods Mol. Biol. 132, 221-41.

Allegra, A., Fazio, E., Franco, D., Nicolò, M., Trusso, S., Neri, F., Musolino, C., Guglielmino, S., 2014. Leuk. Lymphoma. 3, 1–3.

Arap, M. A., 2005. Genet. Mol. Biol. 28(1), 1-9.

Aroca, R. F., Alvarez-Puebla, R. A., Pieczonka, N., Sanchez-Cortes, S., Garcia-Ramos, J. V., 2005. Adv. Colloid Interfac. 116(1-3), 45–61.

Aslanian, D., Rontò, G., Toth, K., 1982. Acta Physica Academiae Scientiarum Hungaricae. 53(1-2), 25-32.

Aubrey, K. L., Thomas, G. J. Jr., 1991. *Biophys. J.* 60, 1337-49.

Baniukevic, J., Boyaci, I.H., Bozkurt A. G., Tamer, U., Ramanavicius, A., Ramanaviciene A., 2013. *Biosens Bioelectron.* 43, 281-88.

Benevides, J. M., Stow, P. L., Ilag, L. L., Incardona, N. L., Thomas, G. J. Jr., 1991. *Biochemistry.* 30(20), 4855-63.

Bonnet, D., Dick, J. E., 1997. *Nat. Med.* 3, 730-37.

Cao, J., Zhao, P., Miao, X. H., Zhao, L. J., Xue, L. J., Qi, Z. T., 2003. *Cell. Res.* 13(6), 473-79.

Carnazza, S., Gioffrè, G., Felici, F., Guglielmino, S., 2007. *J. Phys.: Condens. Matter* 19, 395011(13pp).

Carnazza, S., Foti, C., Gioffrè, G., Felici, F., Guglielmino, S. P.P., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23(7), 1137-44.

Chan, J. W., Taylor, D. S., Thompson, D. L., 2009. *Biopolymers.* 91(2), 132-9.

De Plano, L. M., Calabrese, F., Lentini, G., Nicolò, M. S., Franco, D., Fazio, E., Trusso, S., Allegra, A., Neri, F., Guglielmino, S. P. P., 2014. *New Biotechnol.* 31: S107.

Fabriciova, G., Sanchez-cortes, S., Garcia-Ramos, J. V., Miskovsky, P., 2004. *Biopolymers.* 74, 125-30.

Fazio, E., Neri, F., Savasta, S., Spadaro, S., Trusso, S., 2012. *Phys. Rev. B* 85, 195423(7pp).

Fazio, E., Neri, F., Valenti, A., Ossi, P.M., Trusso, S., Ponterio, R.C., 2013. *Appl. Surf. Sci.* 278, 259-264.

Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R., Cesareni, G., 1991. *J. Mol. Biol.* 222, 301-10.

Gao, F., Du, L., Tang, D., Lu, Y., Zhang, Y., Zhang, L., 2015. *Biosens. Bioelectron.* 66, 423-30.

Gao, F., Lei, J., Ju, H., 2013. *Anal. Chem.* 85, 11788-93.

Gao, F., Zhu, Z., Lei, J., Ju, H., 2012. *Chem. Commun.*, 48, 10603-5.

Ko, H., Singamaneni, S., Tsukruk, V. V., 2008. *Small* 4(10), 1576-99.

Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L. T., Itzkan, I., Dasari, R. R., Feld, M. S., 1997. *Phys Rev Lett.* 78: 1667-70.

Jaye, D. L., Geigerman, C. M., Fuller, R. E., Akyildiz, A., Parkos, A., 2004. *J. Immunol. Methods.* 295, 119-27.

Jokerst, J. V., Miao, Z., Zavaleta, C., Cheng, Z., Gambhir, S. S., 2011. *Small* 7(5), 625-33.

Jurasekova, Z., Marconi, G., Sanchez-cortes, S., Torreggiani, A., 2009. *Biopolymers.* 91, 917-27.

Lu, X., Liu, Q., Benavides-Montano, J. A., Nicola, A. V., Aston, D. E., Rasco, B. A., Aguilar, C., 2013. *J. Virol.* 87(6), 3130-3.

Miskovsky, P., Jancura, D., Sanchez-Cortes, S., Kocisova, E., Chinsky, L., 1998. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 6374-79.

- Neng, J., Harpster, M. H., Wilson, W. C., Johnson, P. A., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 41:316-21.
- Nie, S. M., Emory, S. R., 1997. *Science*. 275, 1102–06.
- Overman, S. A., Bondr, P., Maiti, N. C., Thomas, G. J. Jr., 2005. *Biochemistry*. 44, 3091-3100.
- Petrenko, V. A., Smith, G. P., 2000. *Protein Eng.* 13(8), 101-04.
- Petrenko, V. A., Vodyanoy, V. J., 2003. *J Microbiol Meth.* 53(2), 243-52.
- Podstawka, E., Ozaki, Y., Proniewicz, L. M., 2004. *Appl. Spectr.* 58, 570-580.
- Qian, X. M., Nie, S. M., 2008. *Chem. Soc. Rev.* 37, 912–20.
- Qian, X., Peng, X. H., Ansari, D. O., Yin-Goen, Q., Chen, G. Z., Shin, D. M., Yang, L., Young, A. N., Wang, M. D., Nie, S., 2008. *Nat Biotechnol.* 26, 83-90.
- Ranc, V., Srovnal, J., Kvítek, L., Hajduch, M., 2013. *Analyst*. 138(20), 5983-8.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L., 2001. *Nature*. 415(6859), 105–11.
- Rehman, I. ur, Movasaghi, Z., Rehman, S., 2012. *Series in Medical Physics and Biomedical Engineering*, CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Rosarin, F. S., Arulmozhi, V., Nagarajan, S., Mirunalini, S., 2012. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* 6(1), 1-10.
- Schmid, F.X., 2001. *Encyclopedia Life Sci*, Introductory articles, 1–4. Bridgewater R.
- Smith, G. P., Petrenko, V. A., 1997. *Chem. Rev.* 97(2), 391-410.
- Souza, G. R., Christianson, D. R., Staquicini, F. I., Ozawa, M. G., Snyder, E. Y., Sidman, R. L., Miller, J. H., Arap, W., Pasqualini, R., 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(5), 1215-20.
- Stewart, S., Fredericks, P. M., 1999. *Spectrochim. Acta, Part A* 55, 1641–1660.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. *Nucleic Acids Res.* 22(22), 4673-80.
- Wang, Y. A., Yu, X., Overman, S., Tsuboi, M., Thomas, G. J. Jr, Egelman, E. H., 2006. *J. Mol Biol.* 361(2), 209-15.
- Xie, W., Wang, L., Zhang, Y., Su, L., Shen, A., Tan, J., Hu, J., 2009. *Bioconjugate Chem.* 20(4), 768–73.
- Zhang, Y., Hong, H., Myklejord, D. V., Cai, W., 2011. *Small* 7, 3261–69.

Didascalie delle Figure

Figura 1. Allineamento dei peptidi espressi dai fagi. Le sequenze amminoacidiche dedotte sono state allineate utilizzando CLUSTALX 2.1 con la sequenza consenso ottenuta tramite GENEDOC. I trattini indicano lacune utilizzate per massimizzare l'allineamento. Questo allineamento mostra residui conservati di amminoacidi carichi positivamente nella regione N-terminale (K e R), affiancato da amminoacidi non polari come valina (V), Isoleucina (I), leucina (L) e alanina (A).

Figura 2. Convalida dei cloni fagici mediante microscopia a fluorescenza. Le cellule U937 sono state incubate con fagi marcati con FITC: EIII1 (a, b) e fagemide privo di inserto pC89 (c).

Figura 3. Assorbimento ottico UV-vis (a), dati DLS e TEM (b) delle nanoparticelle di argento. Assorbimento ottico UV-Vis (c), immagini SEM (d,e) ed analisi XPS (f) del network AgNPs-EIII1.

Figura 4. Spettri Raman di cellule U937, fago EIII1 e complesso U937- EIII1.

Figura 5. Spettri Raman di Ag-cellule U937, AgNPs–EIII1 e complesso AgNPs–EIII1 + U937.