

**Ewa Baranowska-Wójcik**

**Dominik Sz wajgier**

Wydz. Nauk o Żywności i Biotechnologii,

Kat. Biotech., Mikrobiol. i Żyw. Człow.

Skromna 8, 20-704 Lublin

**Dorota Gajowniczek-Ałasa**

doktorantka roku IV Szkoły doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

### **Relacja z wyjazdu**

#### **W CELACH SZKOLENIOWYCH**

W RAMACH PROGRAMU ERASMUS+ SZKOLNICTWO WYŻSZE

- AKCJA 1 „MOBILNOŚĆ” W ROKU AKADEMICKIM 2023/2024 ( STT)

ORAZ MOBILNOŚĆ DOKTORANCKA NA PRAKTYKI W RAMACH ERASMUS+ (SMT)

#### **Instytucja przyjmująca:**

University of Trieste, I TRIESTE01,

Department of Life Sciences, Research Group: Molecular Nutrition Research Group

**Termin wizyty** 04/09/2024 - 10/09/2024

Podczas pięciu roboczych dni spędzonych na Uniwersytecie w Trieście opiekę naukową sprawowała Pani dr Sabina Passamonti.

W środę 4 września (pierwszy dzień szkolenia) o godz. 10.00 odbyło się 2 godzinne spotkanie wstępne z Panią dr Sabiną Passamonti, dr Federicą Tramer i dr Paolą Sist, podczas którego obie strony szczegółowo omówiły swoje doświadczenie naukowe, plany naukowe i doprecyzowano plan pracy podczas szkolenia. Prof. Dominik Sz wajgier przedstawił prezentację pptx omawiającą ogólną wiedzę na temat całego UP w Lublinie, następnie na temat aktywności naukowej i dydaktycznej WNoŻiB UP w Lublinie, wreszcie na temat aktywności naukowej i wdrożeniowej zespołu badawczego który odwiedził włoską uczelnię.

Następnie, wraz z dr Federicą Tramer, współpracownicą i współautorką autorskiej metody oznaczania bilirubiny w krwi pełnej, Pani dr Sabina Passamonti zaprezentowała nam procedurę spektrofotometryczną w skali nano, stosowaną przy oznaczaniu bilirubiny. Korzystaliśmy z próbek oznaczanych aktualnie w laboratorium przez obie panie dr, nie analizowaliśmy własnych próbek przywiezionych z Polski. Metodyka przygotowania próbek i samego oznaczania bilirubiny to stworzona przez Panią dr. Sabinę Passamonti autorska metodyka, opublikowana w czasopiśmie naukowym jako nowa metodyka, pozbawiona wad charakterystycznych dla oznaczania zawartości bilirubiny metodą z użyciem związków diazowych. Metodykę przedstawiają poniższy plakat (Zdjęcia):

# COMBINED DETERMINATION OF BILIVERDIN AND BILIRUBIN BY THE HUG ASSAY

Paola Sist<sup>1\*</sup>, Federica Tramer<sup>1</sup>, Rocio Cardenas Perez<sup>1§</sup>, Ranieri Urbani<sup>2</sup>, Sabina Passamonti<sup>1</sup>

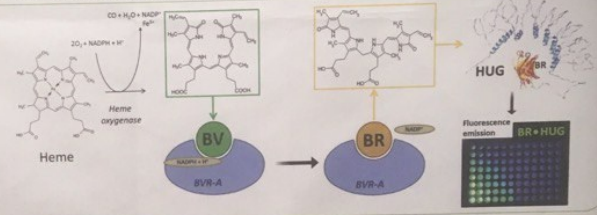
<sup>1</sup>Department of Life Sciences, University of Trieste, via Giorgieri, 1 – 34127 Trieste.  
<sup>§</sup>Visiting ERASMUS+ student from Faculty of Experimental Sciences, University Pablo de Olavide, Ctra de Utrera, km 1, 41013 Sevilla, Spain  
<sup>2</sup>Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, via Giorgieri, 1 – 34127 Trieste.  
 \*psist@units.it

## INTRODUCTION

Biliverdin (BV) is a secondary metabolite of heme catabolism that is rarely analyzed for lack of user-friendly methods

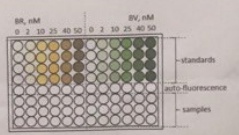
We present a simple method for the analysis of BV:

- BV is converted to BR by biliverdin reductase (BVR-A) in the presence of HUG [1,2], a high-affinity bilirubin-binding polypeptide (Kd = 1.1 nM), which drives the reaction to completion.
- HUG-BR complex is quantified fluorometrically in 96-well plate [3].
- Given the highly selective interaction of BR with HUG, background interferences are minimal, if any.



## METHOD

- Prepare a series of BV and BR standard solutions in HUG (0.05 mg/mL, PBS pH 8.5)
- Distribute 200 µL of BV and BR standard solutions to pre-defined sectors of a 96-well black plate
- Add 10 µL of concentrated enzyme mixture in the BV sector and 10 µL of PBS pH 8.5 in the BR sector.
- Incubate the 96-well black plate(s) at 25°C for 3 h.
- Read fluorescence intensity ( $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 528 nm; T = 25 °C) in a benchtop multiplate reader.



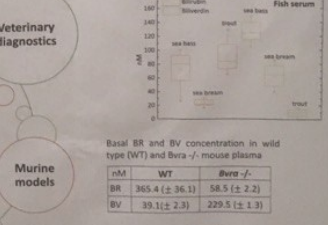
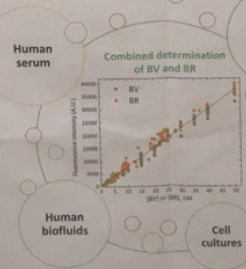
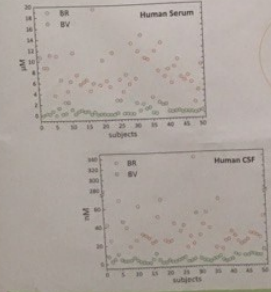
## BV assay optimal conditions

PBS pH 8.5,  
 [NADPH] = 0.05 mM,  
 [BVR] = 0.185 IU/mL  
 T = 25°C  
 Reaction time = 3 h  
 (or overnight for biological samples)

## RESULTS

The fluorescence emitted from BV and BR standard solutions was fitted by the linear regression equation. The angular coefficients were  $766 \pm 37.7$ ,  $n = 19$  for BR and  $746 \pm 37.7$ ;  $n = 18$  for BV, with no significant difference (unpaired t-test,  $p = 0.116$ )

- BV is converted to BR in a 1:1 stoichiometry
- A single angular coefficient for both pigments ( $748 \pm 9$ ;  $R^2 = 0.97$ ) can be used
- Several applications explored

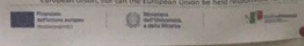


## CONCLUSIONS

The HUG assay can detect both BV and BR in human and animal biofluids (bile, seminal plasma, cerebrospinal fluid, urine and saliva). This method expands the applicability of the HUG bilirubin assay in translational medical research and supports research efforts on new biomarkers in health and disease.

**References**  
 [1] Baranera, S. et al. Heme oxygenase-1: a versatile platform for application of ultrasensitive bilirubin detection by HUG. *Biochemistry and Biophysics*, 2020, 31(1), 94-98. <https://doi.org/10.3390/bi10010094>  
 [2] Sist, P. et al. Biliverdin and Bilirubin Properties of the Recombinant Fusion Protein HUG. *Biomolecules*, 2021, 11(6) 3330-3348. <https://doi.org/10.3390/bi11063330>  
 [3] Sist, P., Tramer, F. et al. Recombinant Bilirubin Analysis in Translational Research and Precision Medicine by the Recombinant Protein HUG. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(22):14289. <https://doi.org/10.3390/ijms241214289>

**Acknowledgments**  
 This study was funded in part by the European Union - NextGenerationEU, in the framework of the INEST - Interconnected Next-Gen Innovation Ecosystem (INEST) EC/N0000004-CLIP J48C22002320000. The views and opinions expressed are solely those of the authors and do not necessarily reflect those of the European Union, nor can the European Union be held responsible for them.



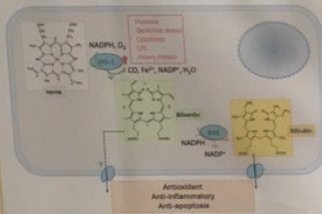
# FLUORESCENCE DETERMINATION OF CELLULAR BILIRUBIN AND BILIVERDIN AMOUNT BY HUG ASSAY

Federica Tramer <sup>1\*</sup>, Paola Sist <sup>1</sup>, Ranieri Urbani <sup>2</sup>, Valentina Tonelotto <sup>3,4</sup>, Breandán N. Kennedy <sup>3,4</sup> and Sabina Passamonti <sup>1</sup>

Department of Life Sciences, University of Trieste, Trieste I-34100, Italy. <sup>2</sup>Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Trieste, Trieste I-34100, Italy. <sup>3</sup>UCD Conway Institute, University College Dublin, D04 V1W8 Dublin, Ireland. <sup>4</sup>UCD School of Biomolecular and Biomedical Science, University College Dublin, D04 V1W8 Dublin, Ireland. University of Trieste, Trieste I-34100, Italy. \*framer@units.

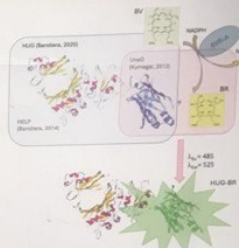
## INTRODUCTION

### CELLULAR HEME CATABOLISM AND BILE PIGMENTS SYNTHESIS



The breakdown of heme produces biliverdin, carbon monoxide and iron, each of which has different physiological effects. Biliverdin is converted into bilirubin, an antioxidant, while carbon monoxide has a signaling effect. Iron recycling from heme degradation is central to cell function, but excess free iron can lead to oxidative stress and ferroptosis. Understanding the multiple functions of heme provides insights into physiological and pathological processes and offers potential targets for therapeutic intervention. *In vitro* drug screening, the quantification of BR and/or BV in cell lysates and in the extracellular milieu may provide information on the activation or inhibition of specific signaling pathways leading to activation of heme catabolism [1].

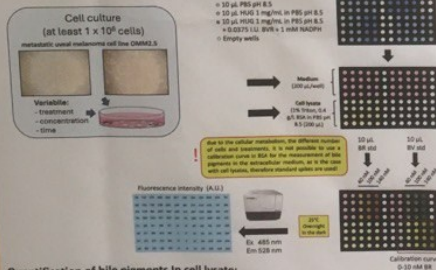
Here we describe a simple and sensitive method to measure both biliverdin and bilirubin in cell cultures based on the specific fluorescent signal of the HUG-BR complex [2][3][4].



PRINCIPLE OF THE ASSAY  
HUG is a two-domain recombinant protein that specifically bind bilirubin

## METHODS

### ASSAY CONFIGURATION



### Quantification of bile pigments in cell lysate:

$F_{\text{BR+BV}}$  = Fluorescence emitted by samples in the absence of HUG.

$F_{\text{BR}}$  = Fluorescence ascribed to bilirubin

$F_{\text{BV}}$  = Fluorescence ascribed to biliverdin

$F_{\text{BR+BV}} = F_{\text{BR}} + F_{\text{BV}}$  The net increase of fluorescence in cell media spiked with standard BR or BV

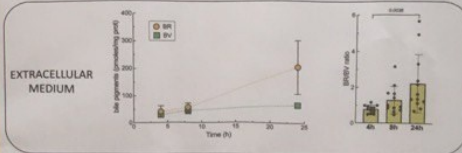
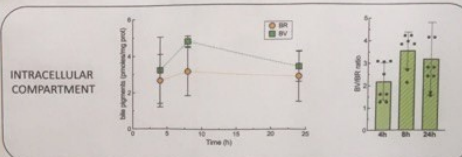
BR concentration in cell lysates was determined by interpolation in the standard bilirubin curve (0-10 nM BR)

### Quantification of bile pigments in medium:

$[Bile\ pigment]_{\text{ext}} = \frac{ab}{(1-ac)}$  where  $a$  is  $F_{\text{BR}}/F_{\text{BR+S}}$  or  $F_{\text{BV}}/F_{\text{BV+S}}$ ,  $b$  is the nominal concentration of standard in the well,  $c$  is the ratio between the volume before and after the addition of the spike

## RESULTS

### SYNTHESIS OF BILE PIGMENTS IN METASTATIC UVEAL MELANOMA CELL LINE OMM2.5



### CONCENTRATIONS OF BILE PIGMENTS IN CELL LYSATE UNDER SPIKING CONDITIONS

Spike Level	Expected	Observed	Recovery %	p-value
BR Low	2.34 (±0.3)	2.20 (±0.30)	94	0.769
BR Med	4.88 (±0.12)	4.73 (±0.12)	97	0.539
BR High	8.09 (±0.11)	7.80 (±0.10)	96	0.266
BV Low	1.87 (±0.12)	1.83 (±0.11)	103	0.594
BV Med	3.98 (±0.07)	4.26 (±0.06)	107	0.458
BV High	9.52 (±0.22)	10.66 (±0.40)	107	0.760

## CONCLUSION

The dosage of BR and BV both in the cells and in the culture medium enables a complete evaluation of the system under investigation, taking into account the equilibria involved. As BR is constantly released from the cells over time, this test can also be used to assess cell growth and viability. Limitations in the application of this method arise from the amount of sample available and the presence of interfering factors in the medium. As BR is pH sensitive, the «single spike» method applied to the medium at any condition allows a correct assessment of the pigment concentration.

1) Tonelotto V et al. Cell Death Discovery. 2024; 10(15): 1-15. DOI: 10.1038/s41420-023-01773-8

2) Passamonti S et al. Biochemical Biophysics Research Communications. 2022; 617: 346-351. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.11.008

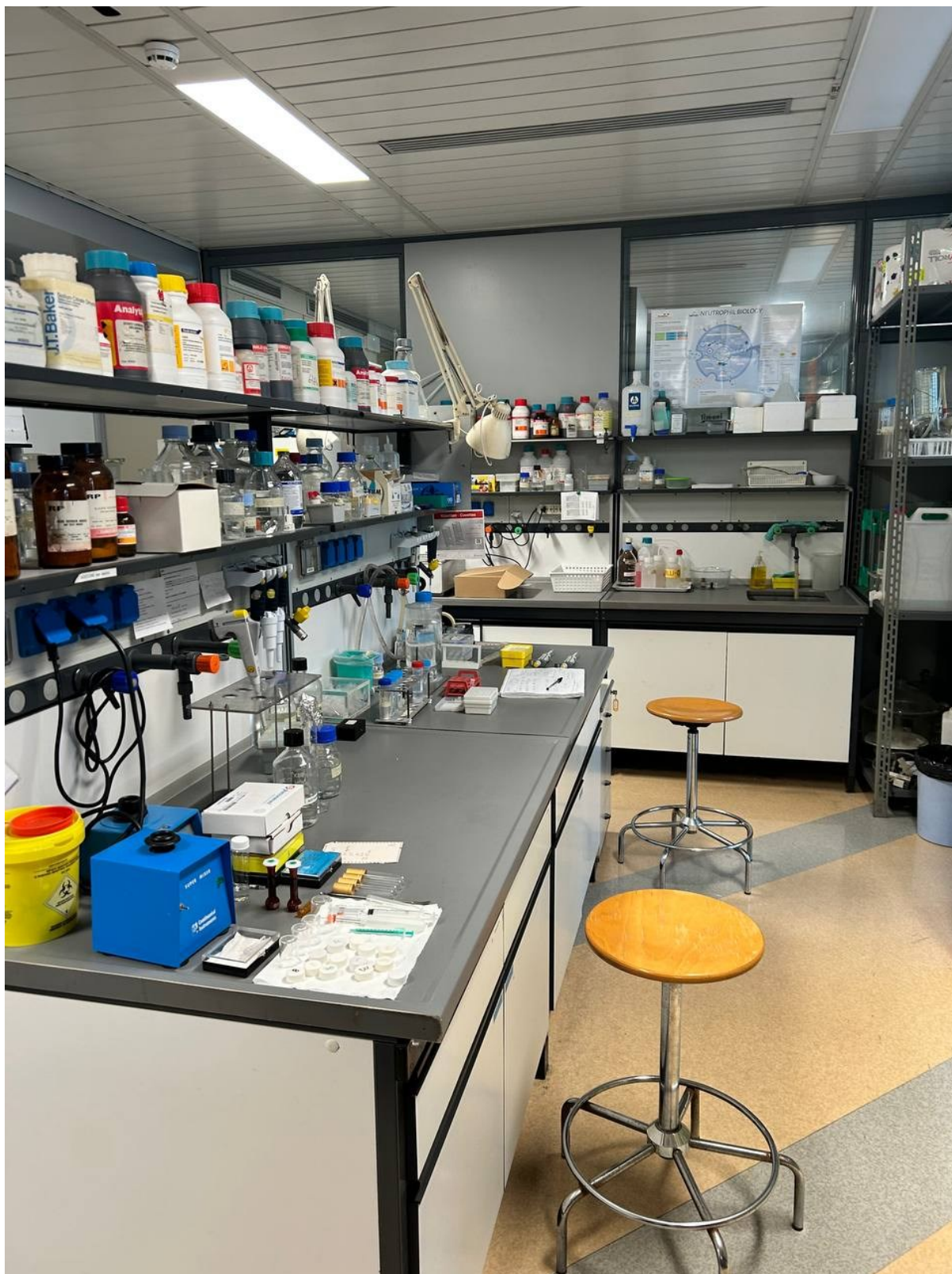
3) Sist P et al. Biochemical Biophysics Research Communications. 2022; 617: 352-358. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.11.009

4) Sist P et al. Cell Death Discovery. 2022; 8(1): 1-10. DOI: 10.1038/s41420-021-00587-4



This study was funded in part by the European Union - NextGenerationEU, in the framework of the INEST - Interconnected Next-Ext Innovation Ecosystem (INEST EC/0000004-CLP J4/22/00032006). The views and opinions expressed are solely those of the authors and do not necessarily reflect those of the European Union, nor can the European Union be held responsible for them.





W trzecim dniu analiz dołączyła dr Paola Sist która prezentowała analizy spektrofluorymetryczne służące do jednoczesnego oznaczania zawartości bilirubiny i biliwerdyny w obecności związków interferujących (wzorce antocyjanowe, Patrz zdjęcia 1 i 2).

We wtorek 10 września (ostatni dzień szkolenia), poza krótkimi analizami, zostaliśmy zaproszeni do krótkiego zwiedzenia budynku w którym mieści się Wydział Technologii Żywności w Trieście.

Obejrzelismy pomieszczenia laboratoriów wykorzystywanych do hodowli komórek zwierzęcych *in vitro*, pomieszczenia ze sprzętem analitycznym, chłodnie do prowadzenia rozdzielów chromatograficznych w warunkach z obniżoną temperaturą i do przechowywania próbek wrażliwych oraz prowadzenia hodowli.

Przekazanie nabytej wiedzy na temat nowych metod analitycznych oraz ogólnej wiedzy o sposobie funkcjonowania wydziału w Trieście i możliwości prowadzenia badań w tej jednostce może być przeprowadzone na seminariach naukowych z pracownikami UP w Lublinie, ze studentami na zajęciach dydaktycznych.



