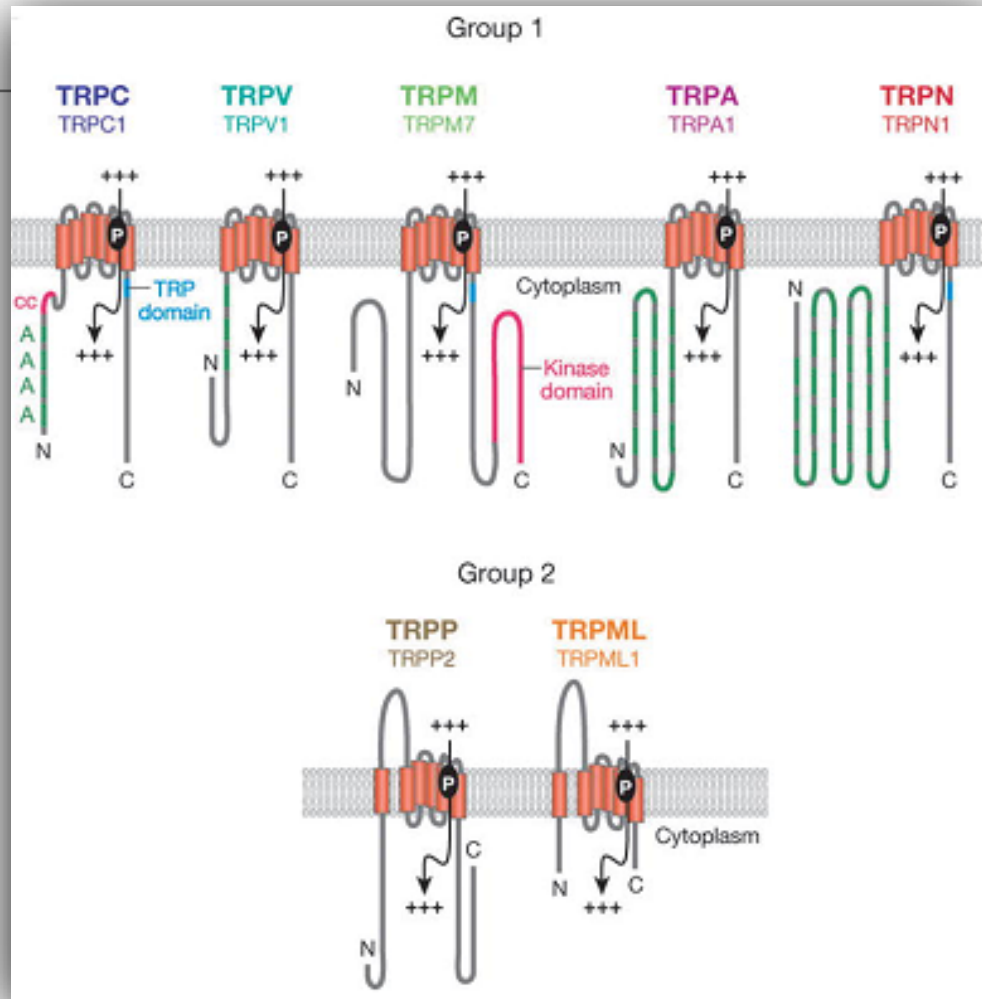


Practical experience: Intracellular Ca^{2+} measurements to study TRPM8 properties

Cellular and Molecular Biophysics
a.a 2018/19

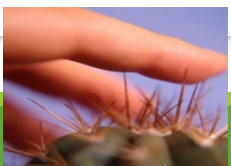
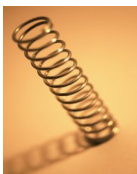
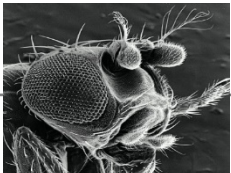
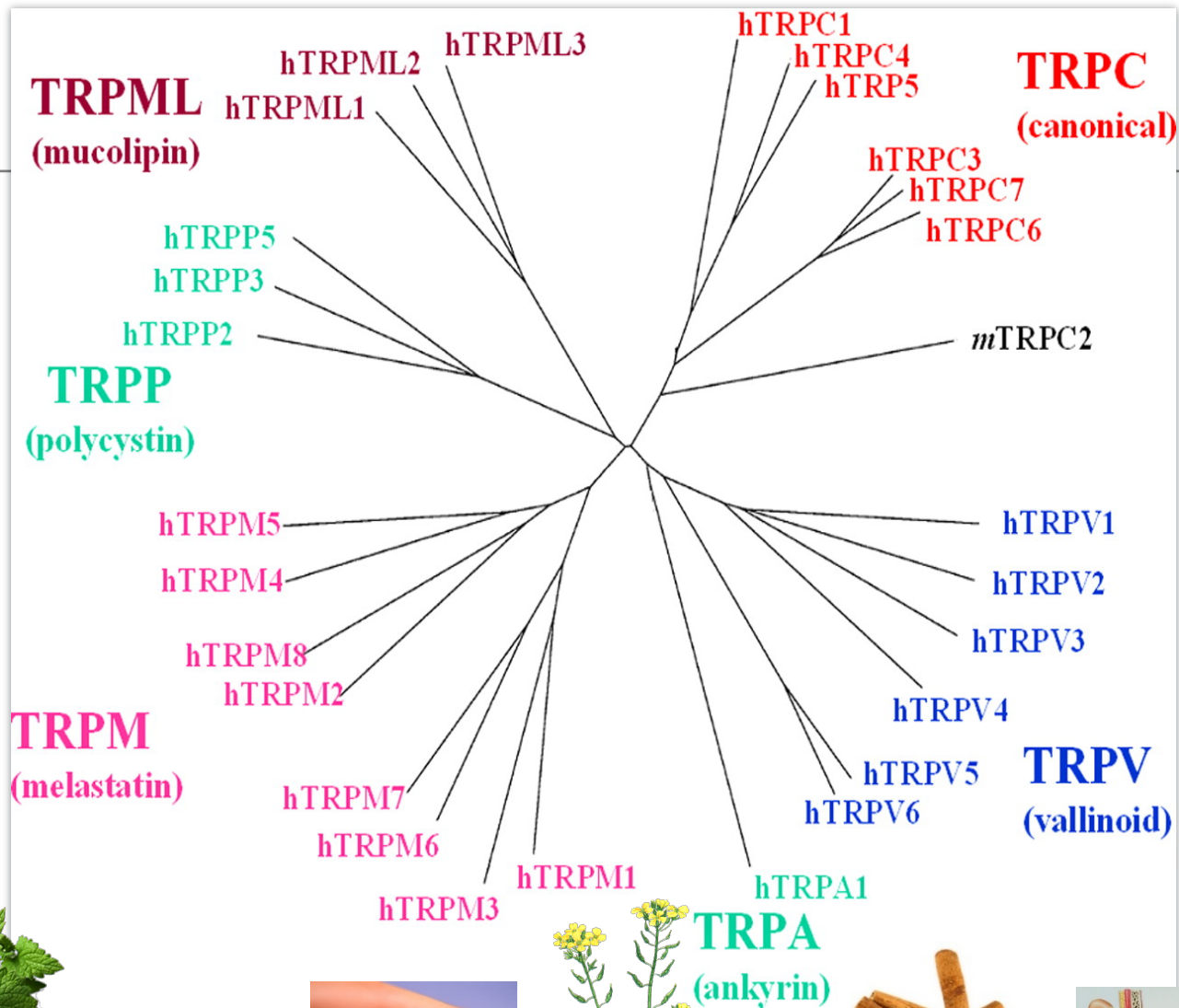
Transient Receptor Potential (TRP) channels



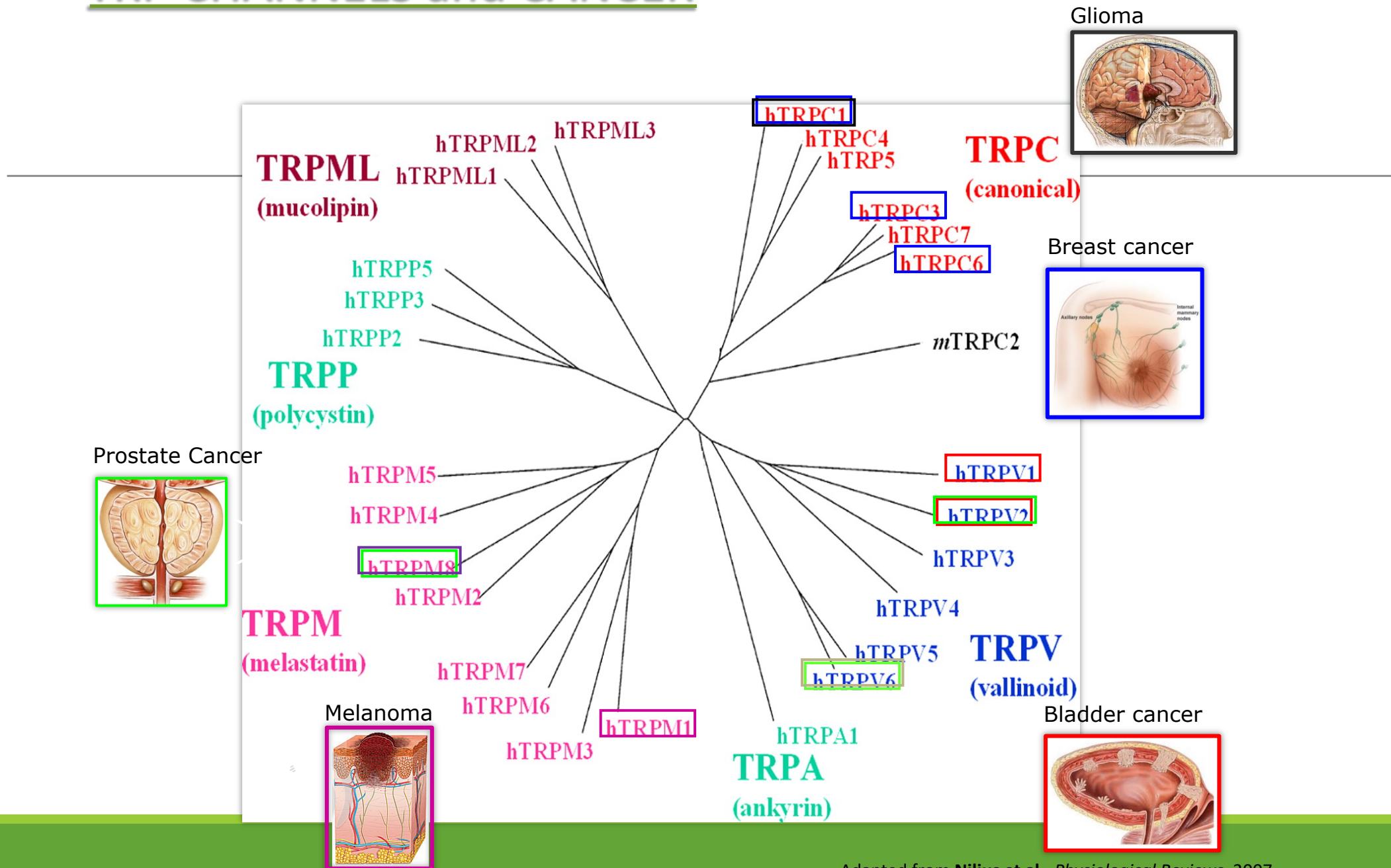
TRP superfamily:

- 28 genes
- **Integral membrane** proteins
- **Ion channels** mostly non-selective for monovalent and divalent cations
- Subdivided into 7 major groups
- **6 TM Tetrameric**

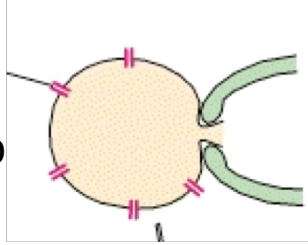
Transient Receptor Potential (TRP) channels



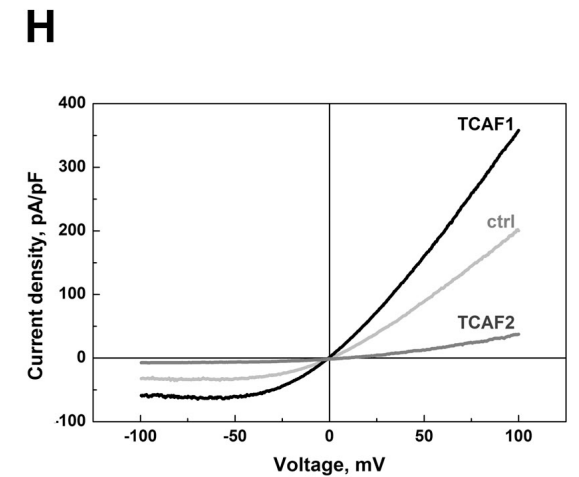
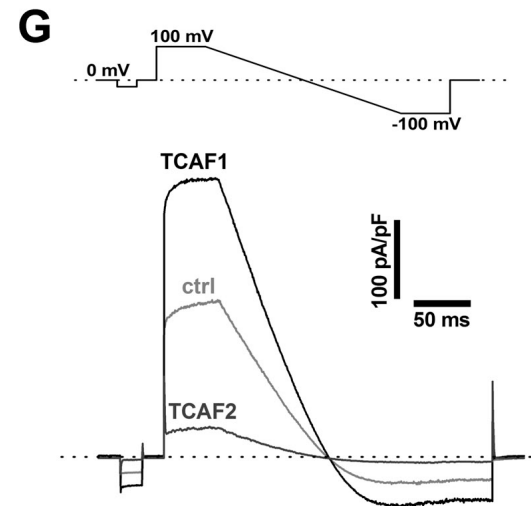
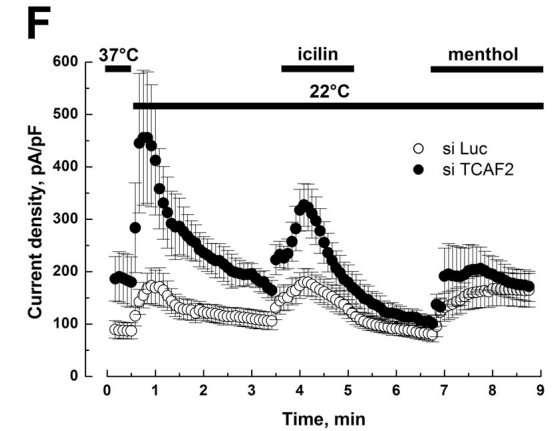
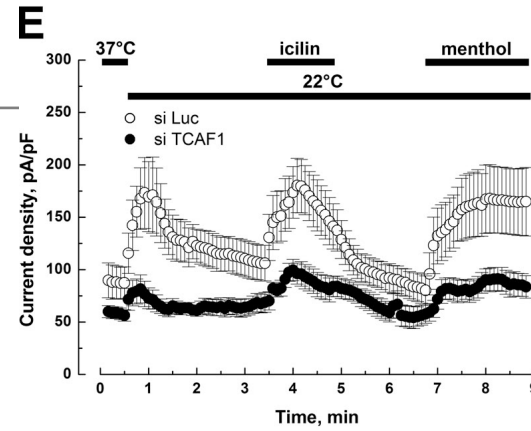
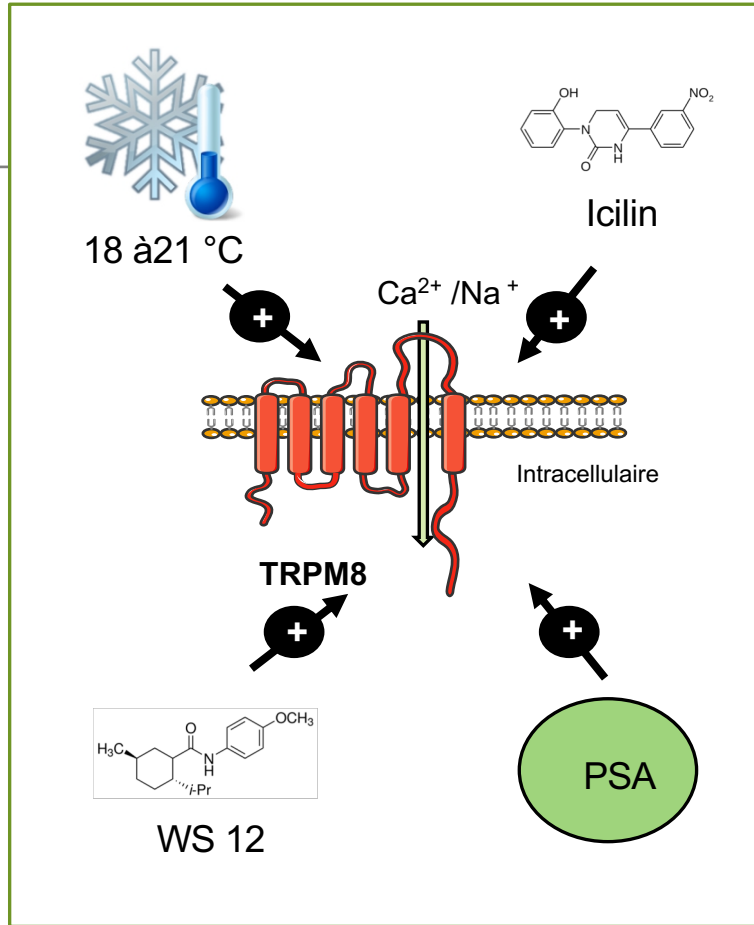
TRP CHANNELS and CANCER



TRPM8 Channels

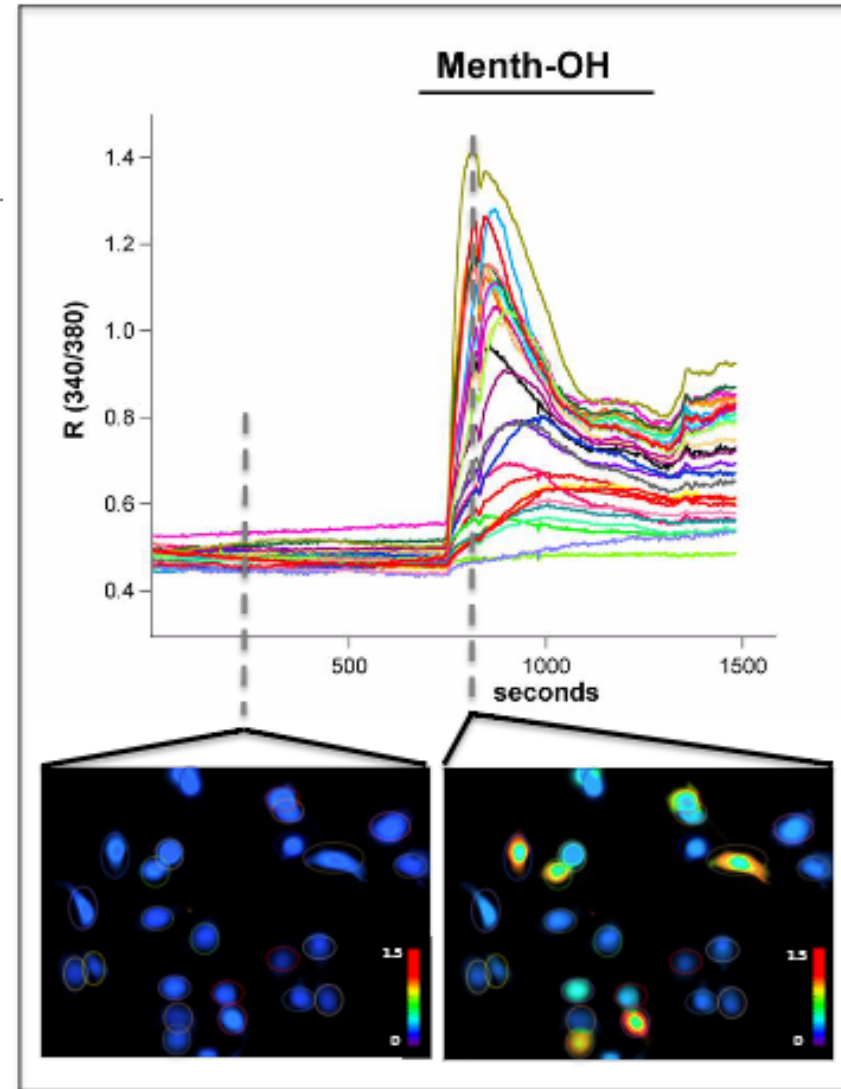
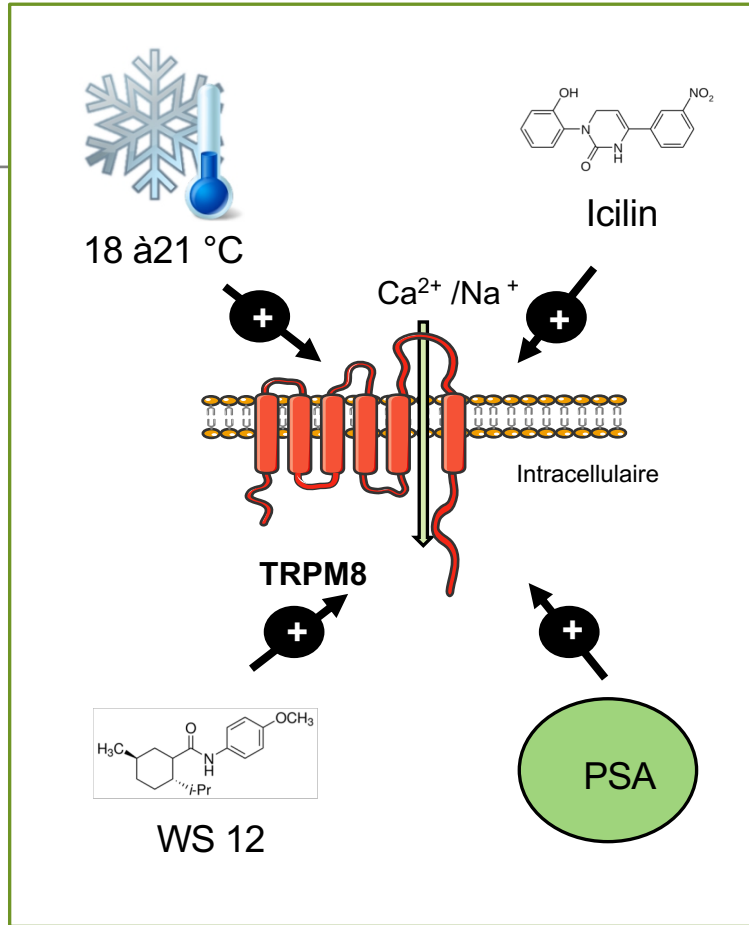
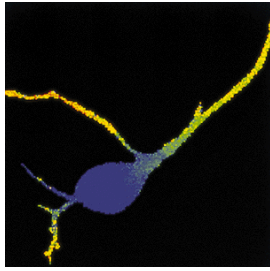


Patch clamp

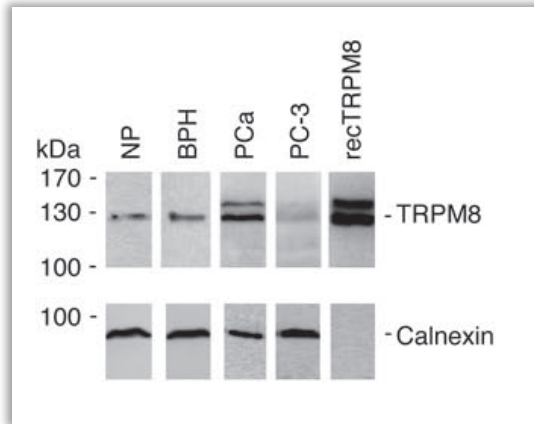


TRPM8 Channels

Ca²⁺ imaging

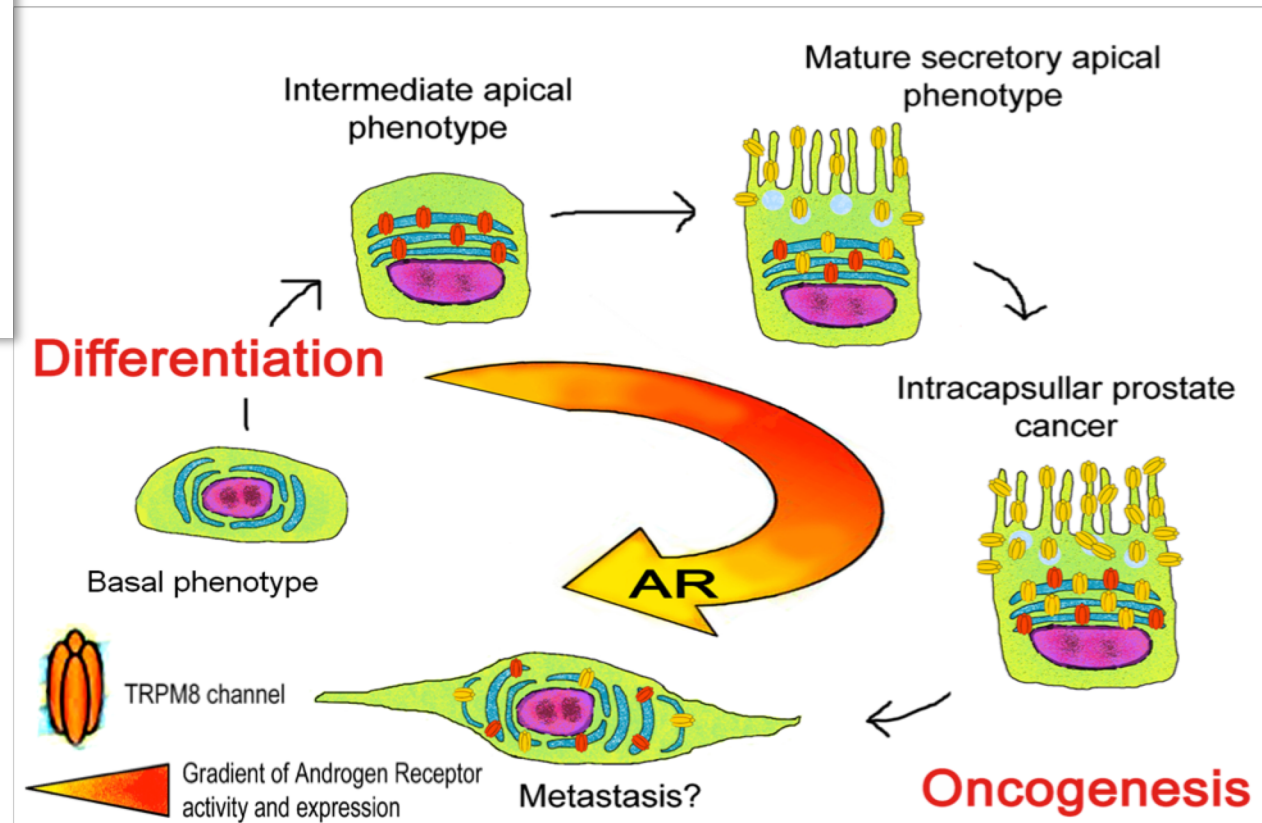


TRPM8 expression is modulated during prostate cancer progression



Bidaux et al, JCI 2007

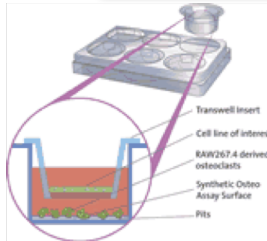
Bidaux et al, JCI 2007;
Gkika et al., Oncogene 2010;
Gkika et al., JCB 2015



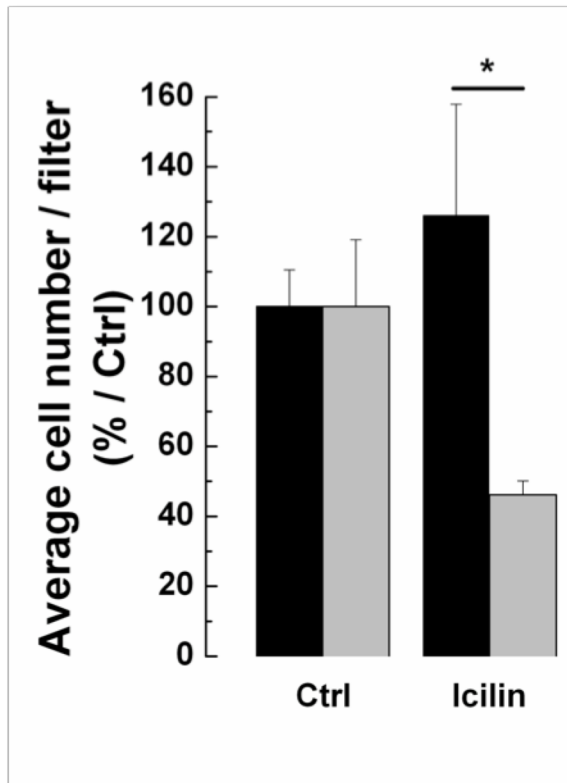
Protective role of TRPM8 during metastatic process?

TRPM8 activation inhibits CANCER CELL migration

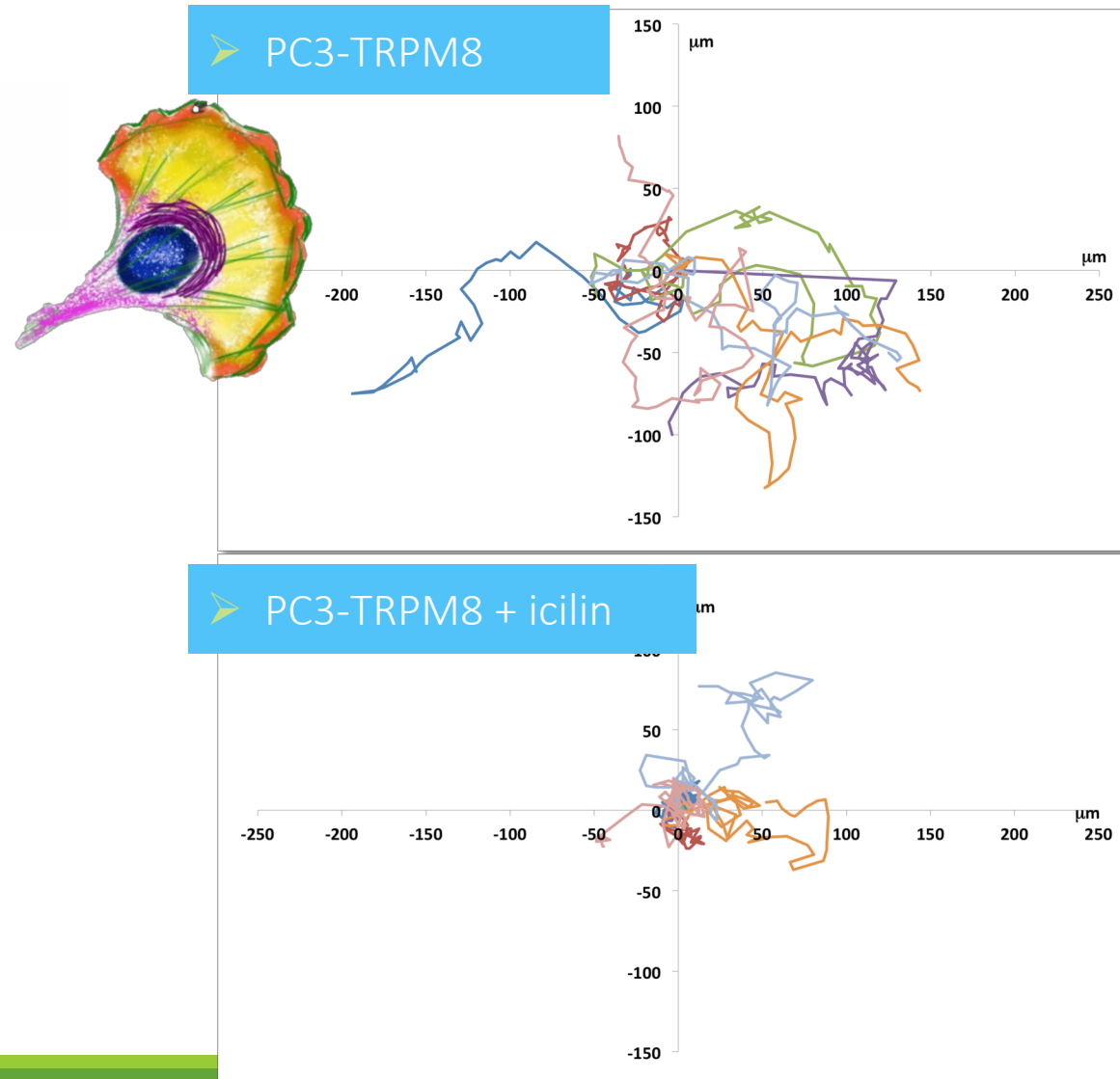
Transwell



■ Ctrl
■ TRPM8



Migration



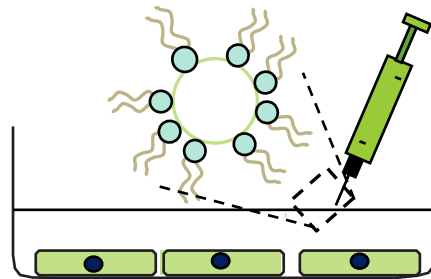
Experimental procedure

Cellular model used during practical: PC3 cell line

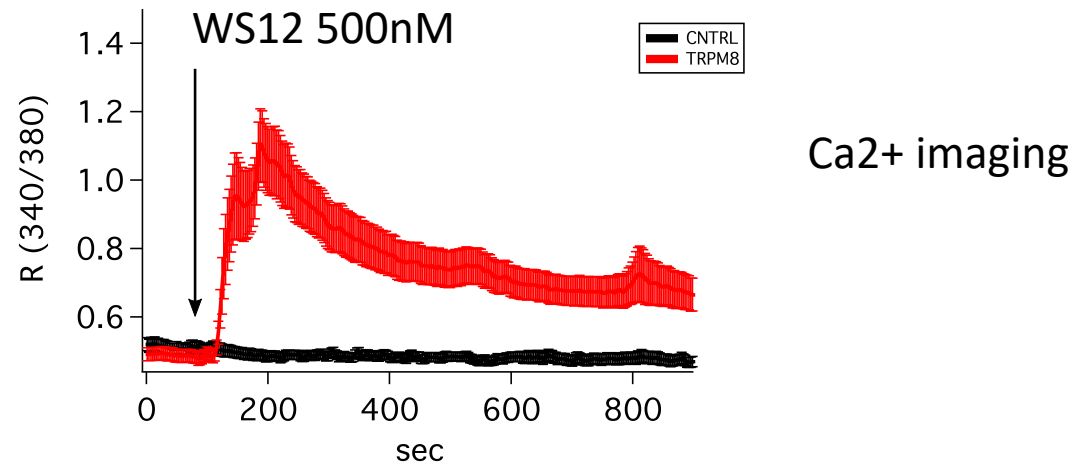
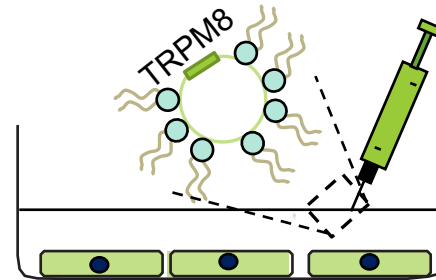
PC3: Cell line derived from prostate cancer (adenocarcinoma grade IV) metastatic in bone (62 years old adult male)

PC3 WT

PC3 TRPM8 stably overexpressing TRPM8



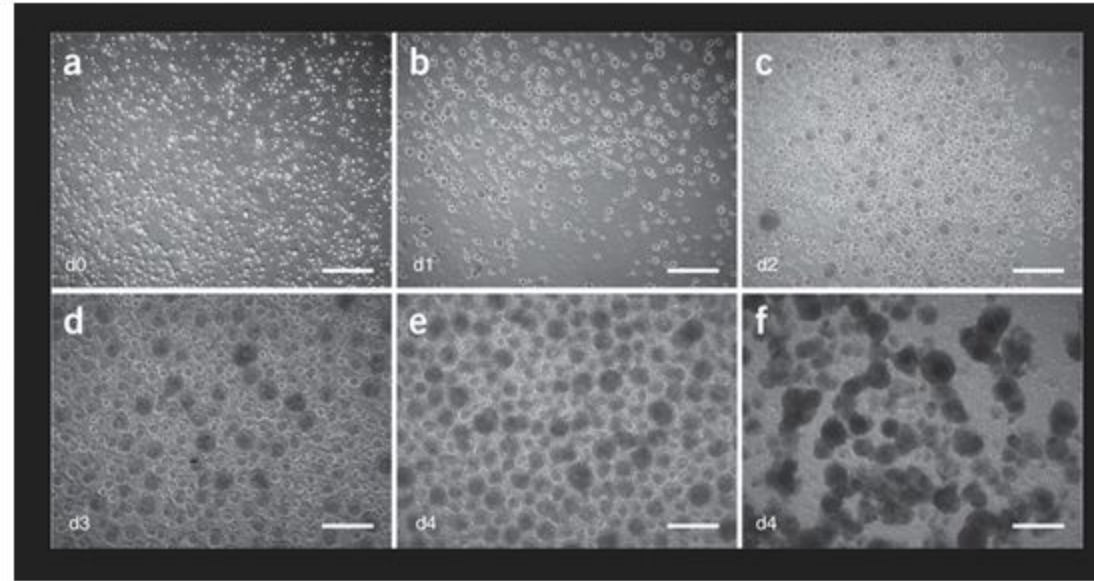
VS



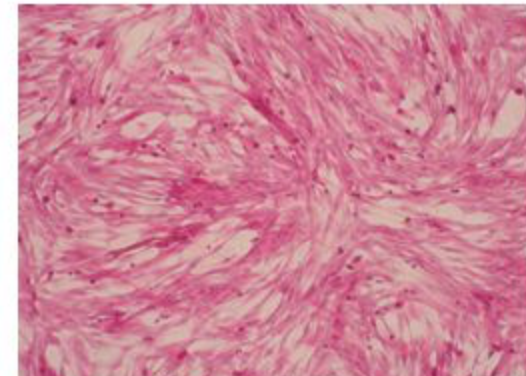
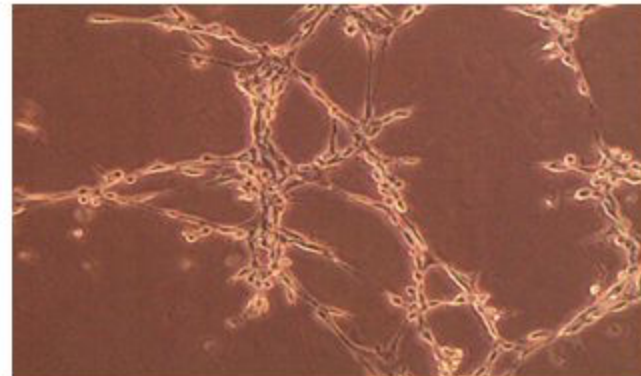
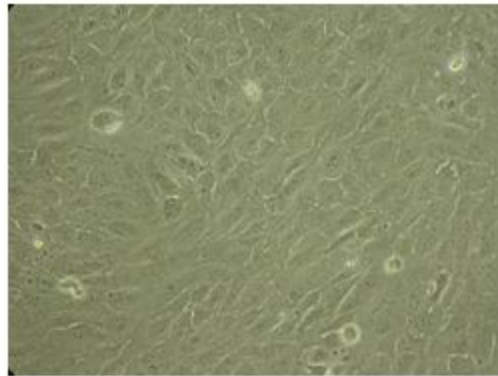
Coltura Cellulare

Vantaggi	Svantaggi
<ul style="list-style-type: none">✓ Sistemi semplificati ed altamente riproducibili;✓ Consentono l'analisi dei meccanismi cellulari e molecolari del fenomeno in esame;✓ Controllo ambientale;✓ Economicità e rapidità di risposta;✓ Disponibilità;	<ul style="list-style-type: none">✗ Sistemi semplificati rispetto ad un organismo integrato;✗ Condizioni di esposizione alle sostanze diverse da quelle in vivo;✗ Difficoltà di correlare le concentrazioni in vitro con quelle in vivo;✗ Le sostanze inoculate possono interagire con il terreno di coltura;

Suspension cultures



Adherent cultures



CARATTERISTICHE FISICHE DEI TERRENI e INFLUENZE DELL'AMBIENTE

- pH
- Tampone
- Osmolarità
- Temperatura
- **Natura del substrato**

37°C in incubatore

FASE GASSOSA:
95% O₂ 5% CO₂

- ✓ **Contenitori di plastica**
- ✓ **Contenitori o supporti di vetro**

Piastra Petri per colture cellulari

Medium

Cellule adese al substrato

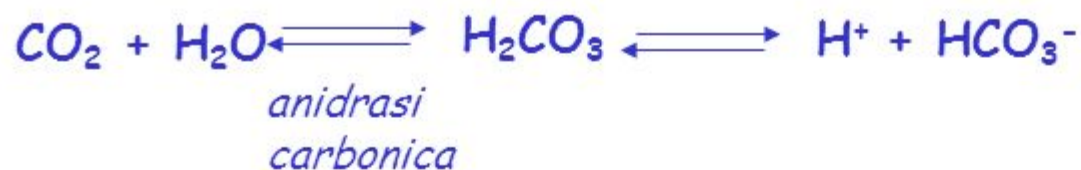


Terreni per colture

La crescita delle cellule in vitro viene assicurata dalla presenza di elementi nutritivi di base (**glucosio, aminoacidi, sali minerali**) e **fattori di crescita** (presenti nel siero)

I terreni usati per le colture cellulari (**IMEM; DMEM; RPMI**, ...) differiscono tra loro per il contenuto in amminoacidi e sali, e per la concentrazione di glucosio. La composizione esatta dei singoli terreni ed il tipo di terreno adatto per una data linea cellulare viene di solito specificato dalla ditta produttrice.

Per la crescita, le cellule richiedono un valore di pH del mezzo compreso tra 7.2 e 7.4. Per mantenere costante tale valore di pH, si ricorre per lo più ad incubatori con una fase gassosa contenente il **5% di CO₂** e terreni contenenti NaHCO₃.



Medium di Coltura

- Il terreno base viene conservato a 4°C e, prima di essere utilizzato, viene complementato con:
- **Glutammina** (aa essenziale molto labile)
- **Antibiotici** (penicillina/streptomycin)
- **Siero** (supplemento più comune delle colture cellulari)

RPMI medium formulation

Basal media	Ham's F12	RPMI 1640	MCDB120	LOBSFM
Vitamins	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Biotin	0.0073	0.02	0.00733	0.012
Folic Acid	1.3	1		0.767
Folinic acid (5-formyl tetrahydrofolate-5H ₂ O) (Ca salt)			0.602	0.201
Niacinamide	0.036	1	6.11	2.382
D-Pantotheique acid (Hemi-Ca salt)			23.82	7.94
D-Calcium pantothenate	0.5	0.25		0.25
Pyridoxine hydrochloride	0.06	1	2.056	1.039
Riboflavin	0.037	0.2	0.003764	0.08
Thiamine hydrochloride	0.3	1	3.373	1.558
Cobalamine	1.4	0.005	0.01355	0.473
Choline chloride	14	3	13.96	10.32
i-Inositol	18	35	18.016	23.672
Para-Aminobenzoic Acid		1		0.333
Salts	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
CaCl ₂ -2H ₂ O	44		235.23	93.08
Ca(NO ₃) ₂ -4H ₂ O		100		33.33
MgCl ₂ -6H ₂ O	122			40.67
MgSO ₄ -7H ₂ O			246.38	82.13
MgSO ₄ (anhyd)		48.8		16.28
KCl	223.6	400	298.2	307.27
NaHCO ₃	1176	2000	1176	1450.67
NaCl	7599	6000	6430	6676.33
Na ₂ HPO ₄ (anhyd)	142	800		314
Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O			134.04	44.68
Traces elements	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ -4H ₂ O			0.0037	0.0012
HNH ₄ VO ₃			0.0006	0.0002
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.003		0.0025	0.0017
FeSO ₄ -7H ₂ O	0.834		0.834	0.556
MnSO ₄ -5H ₂ O			0.00024	0.00008
NiCl ₂ -6H ₂ O			0.00007	0.00002
H ₂ SeO ₃			0.00387	0.00129
Na ₂ SiO ₃ -9H ₂ O			2.842	0.947
ZnSO ₄ -7H ₂ O			0.086	0.029
Lipids	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)
Linoleic acid	0.1			0.028
Lipoic acid	0.2			0.067
Others	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)

Colture di cellule aderenti

Le cellule aderenti crescono fino ad occupare l'intera superficie disponibile: a questo stadio si dicono **confluenti**: la crescita si arresta e le cellule devono essere staccate e trasferite in nuove piastre.

1. Per il trasferimento si ricorre all'uso di EDTA (chela Ca^{2+} e Mg^{2+} , indispensabili per l'adesione) e/o di tripsina (degrada le proteine della matrice);
2. Avvenuto il distacco l'azione dell'EDTA e della tripsina viene neutralizzata dall'aggiunta di nuovo mezzo di coltura che contiene cationi bivalenti in eccesso ed inibitori della tripsina.
3. Le cellule vengono quindi contate e seminate in nuove piastre, oppure si procede per diluizione.

Il tempo necessario alle cellule per duplicarsi è di circa 20-24 ore a seconda del tipo cellulare.

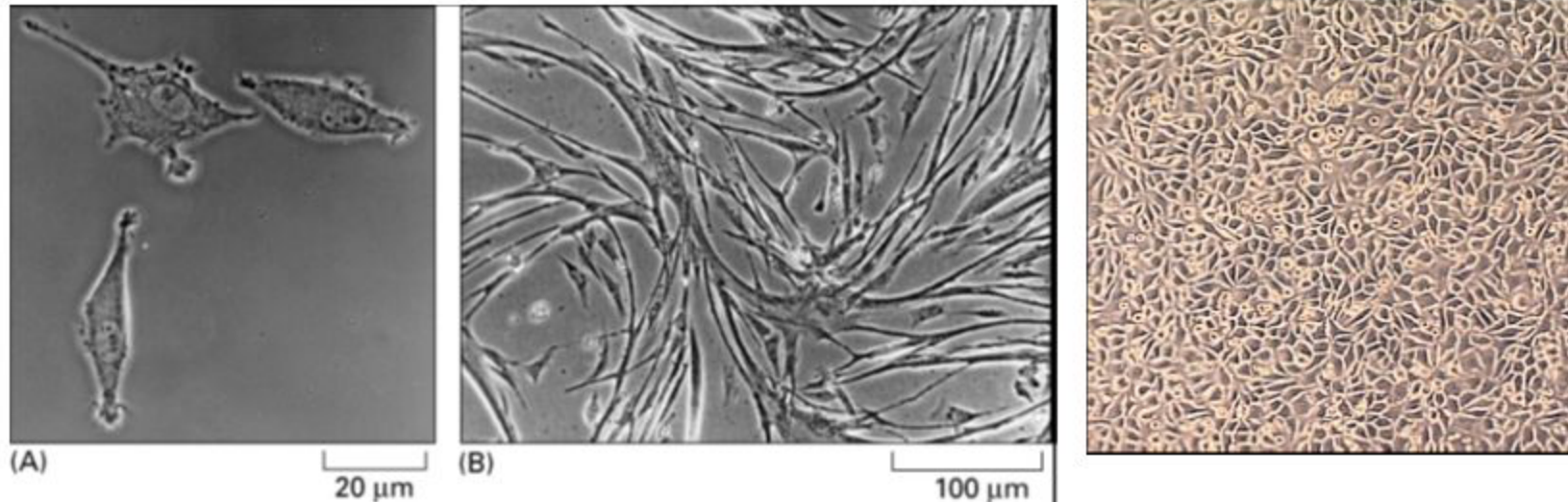
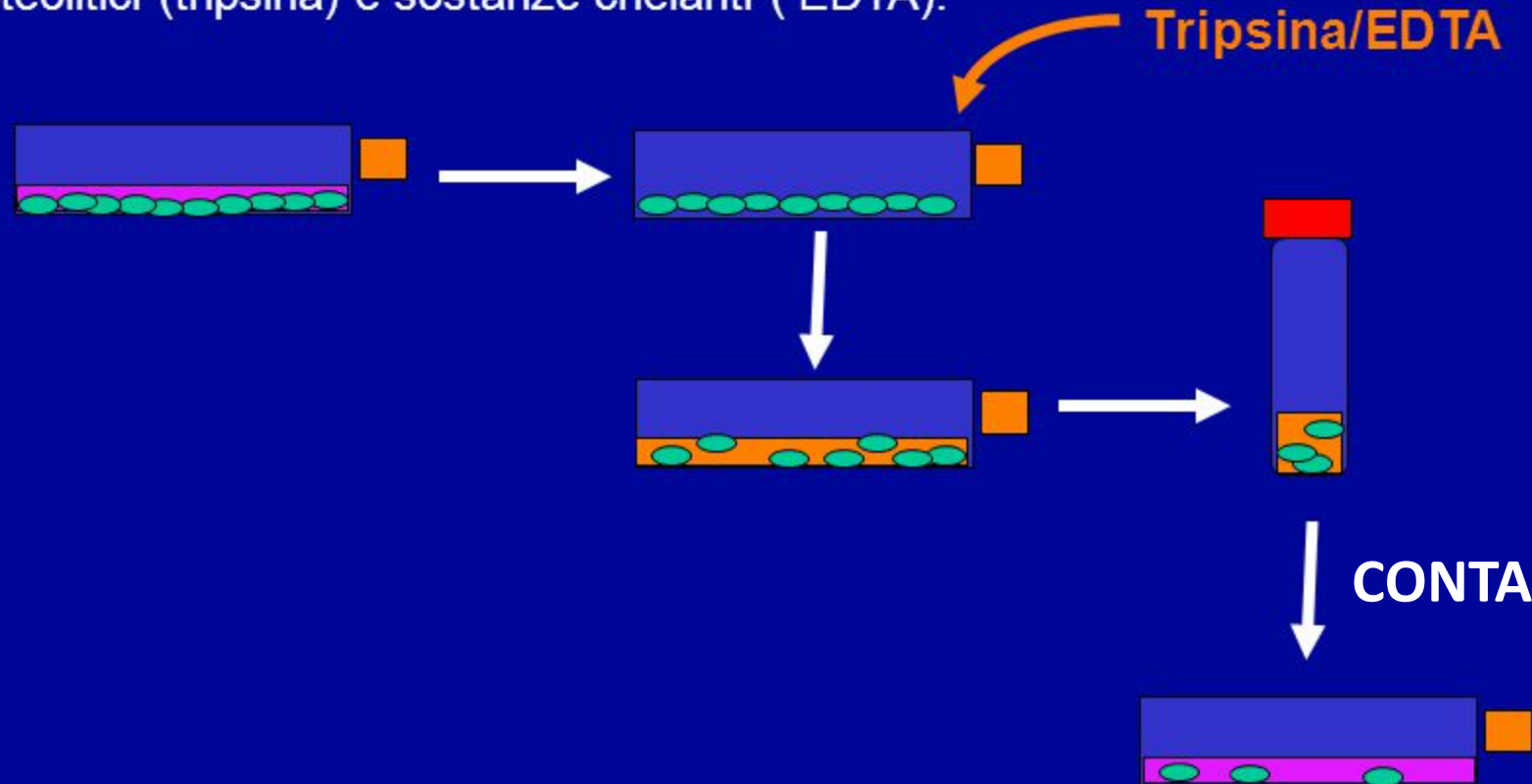


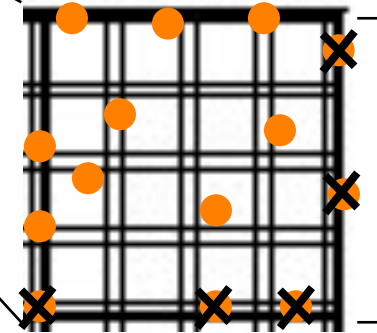
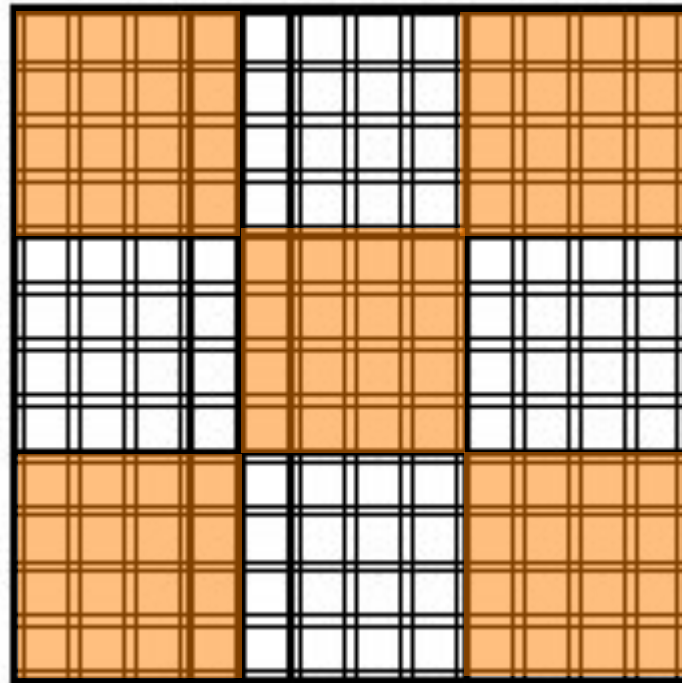
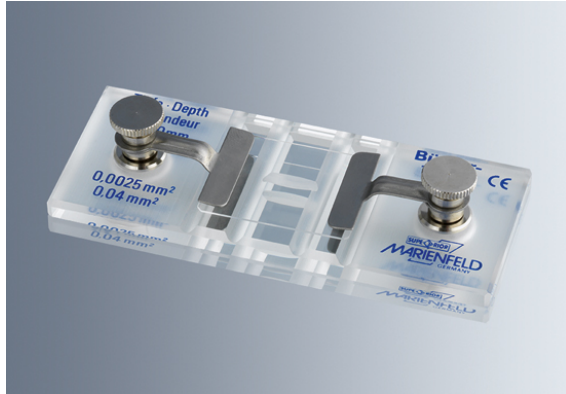
Figure 8-4 part 1 of 2. Molecular Biology of the Cell, 4th Edition.

Colture cellulari

- La maggior parte delle cellule in coltura replica ogni 24-48 ore e deve essere sub-coltivata ogni 3-4 giorni.
- Le cellule in sospensione sono diluite in nuovo terreno di coltura
- Le cellule in monostrato devono essere rimosse dalle superfici di crescita con enzimi proteolitici (tripsina) e sostanze chelanti (EDTA).



CONTA MEDIANTE CAMERA DI BURKER



$l = 1\text{mm}$
Spessore = $0,1\text{mm}$



Volume = $0,1\text{mm}^3 = 10^{-4}\text{ml}$

- Contare i 5 quadrati all'interno di ciascuna delle 2 camere
- Calcolare la media per ciascun quadrato (n)
- Calcolare il numero di cells/ml :
 $\text{Cells/ml} = n/10^{-4}\text{ml} = n * 10^4/\text{ml}$

UV Ca²⁺ Indicators: Fura-2 is a fixed emission ratiometric dye

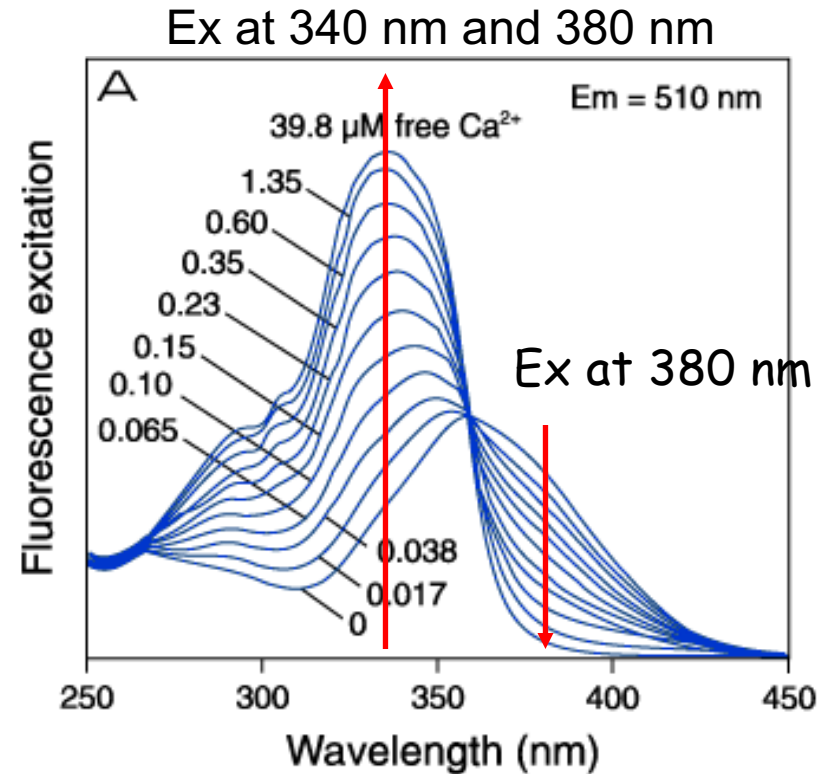


Table 1. Spectroscopic properties and Ca²⁺ dissociation constants for fura-2, indo-1, and their derivatives.

Indicator	Catalog Number		Zero Calcium			High Calcium			K _d (Ca ²⁺) (μM)
	Salt	AM Ester	λ_A † (nm)	ϵ_{\max} ‡ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	λ_F § (nm)	λ_A † (nm)	ϵ_{\max} ‡ (cm ⁻¹ M ⁻¹)	λ_F § (nm)	
fura-2	F1200, F6799	F1201, F1221, F1225, F14185 *	363	28,000	512 **	335	34,000	505 ††	0.14

Day 1: preparation physiological extracellular solutions

Tyrode Standard								
	mM	MW	g/l	ml/l	10x g/l	10x ml/l	10X g/250mL	10X μ L/250mL
NaCl	154	58.44						
CaCl ₂	2	147.02						
KCl	4	74.56						
MgCl ₂	1	STOCK 4.9M	/		/		/	
HEPES	5	238						
Glucose	5.5	180.2						
pH (aggiustato con NaOH)	7.4							

Day 1: preparation physiological extracellular solutions

Ca²⁺ free

	mM	MW	g/l	ml/l	10x g/l	10x ml/l	10X g/250mL	10X μ L/250mL
NaCl	154	58.44						
KCl	4	74.56						
MgCl ₂	1	STOCK 4.9M	/		/		/	
HEPES	5	238						
Glucose	5.5	180.2						
pH (aggiustato con NaOH)	7.4							

Day 2: cell culture plating for Ca²⁺ imaging

1. Rimuovere il terreno
2. Effettuare 1 lavaggio in PBS W/O Ca²⁺ Mg²⁺
3. Aggiungere 1 ml di tripsina 1X alla piastra e mettere in incubatore per 5 minuti; verificare al microscopio che le cellule si siano staccate dalla piastra. Staccarle meccanicamente con una pipetta se ancora adese alla piastra
4. Nel frattempo in una provetta da 14 ml aggiungere 2 ml terreno (RPMI 10%)
5. Recuperare la sospensione cellulare dalla piastra e trasferirla in un tubo da 14 ml risospesendo più volte.
6. Caricare la camera di Burker prelevando dal tubo in cui sono risospese le cellule (10 ul per ogni cameretta) e contare le cellule di 5 campi.
7. Centrifugare le cellule nel tubo per 5 minuti a 1000 RPM
8. Aspirare il surnatante e risospesere il pellet in 1 ml di terreno (RPMI 10%).
9. Calcolare quanti ul di sospensione cellulare prelevare per avere una sospensione di $5 \cdot 10^4$ cells/1ml RPMI 10%. TOT 2 piastrellini per cappa.
10. Preparare due piastrellini mettendo in ognuno 1.5 ml di terreno, quindi aggiungere la sospensione cellulare calcolata al punto precedente.

Day 3: Ca²⁺ imaging. 2 experiments: PC3 wt/PC3TRPM8

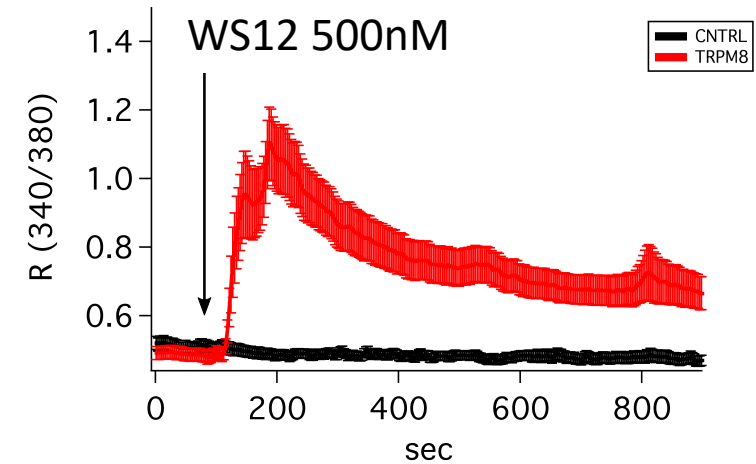
1. Caricare il piastrellino con FURA2-AM 2 μ M (soluzione stock 1 mM) per 40'-45'.
2. Lavare il piastrellino in soluzione fisiologica (Tyrode standard)
3. Montare il vetrino nella cameretta supporto ed effettuare l'esperimento

Il protocollo che verrà utilizzato per le PC3 è:

1. Soluzione fisiologica (circa 30 cicli)
2. Soluzione fisiologica + WS12 500 nM (soluzione stock 100 mM circa 100 cicli o meno finché la risposta non si esaurisce)
3. Soluzione fisiologica

Il protocollo che verrà utilizzato per le PC3M8 è:

1. Soluzione fisiologica (circa 30 cicli)
2. Soluzione fisiologica + WS12 500 nM (circa 100 cicli o meno finché la risposta non si esaurisce)
3. Soluzione fisiologica

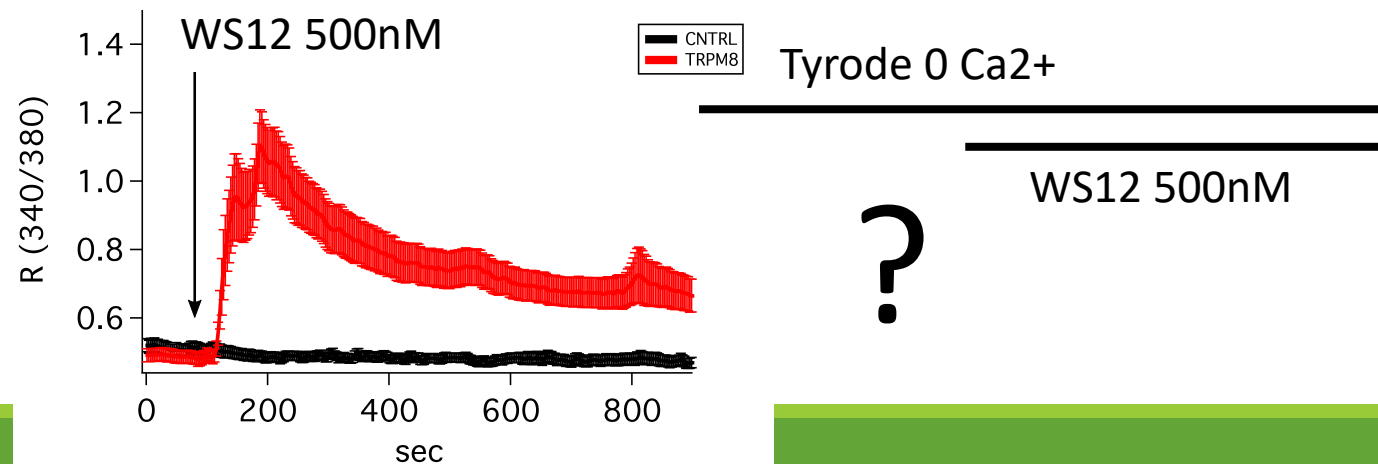


Day 3: Ca²⁺ imaging. 2 experiments: PC3 wt/PC3TRPM8

Il protocollo che verrà utilizzato per le PC3M8 è:

1. Soluzione fisiologica (circa 30 cicli)
2. Soluzione fisiologica + WS12 500 nM (circa 100 cicli o meno finché la risposta non si esaurisce)
3. Soluzione fisiologica
4. **Soluzione fisiologica 0 Calcio**
5. **Soluzione fisiologica 0 Calcio + WS12 500 nM (circa 100 cicli o meno finché la risposta non si esaurisce)**

Soluzione fisiologica 0 Calcio



Day 4: data analyses

Tramite l'utilizzo del software excel:

- Analisi % risposte in seguito a stimolazione con WS12 500nM:

PC3 WT

PC3-TRPM8 in soluzione extracellulare contenente Ca²⁺

PC3-TRPM8 in soluzione extracellulare priva di Ca²⁺

- Analisi ampiezza del picco della risposta risposte in seguito a stimolazione con WS12 500nM considerando tutte le cellule:

PC3 WT

PC3-TRPM8 in soluzione extracellulare contenente Ca²⁺

PC3-TRPM8 in soluzione extracellulare priva di Ca²⁺

- Analisi ampiezza del picco della risposta risposte in seguito a stimolazione con WS12 500nM considerando solo le cellule responsive:

PC3 WT

PC3-TRPM8 in soluzione extracellulare contenente Ca²⁺

PC3-TRPM8 in soluzione extracellulare priva di Ca²⁺