

**Bravissimi!!!!**  
**Ho fatto solo delle piccole osservazioni!**  
**Voto 30+ = 16 (mi segno i +)**

# Imaging del flusso di $\text{Ca}^{2+}$ mediante il fluoroforo FURA-2

RELAZIONE A CURA DI BRAGADIN DIANA, CANANÀ STEFANIA, DE NAPOLI ANNA VITTORIA, GIAMPIETRO CAMILLA, GIURIATO DANIELE, IARIA LAURA, LAGANÀ VINCENZA, MASOERO THOMAS, OBINO GABRIELE, PAGLIOTTO AMEDEO, PESCAROLO SIMONE, TASCA LAURA E ZOPPO ALICE

## INTRODUZIONE

**Attenzione a distinguere il ruolo del  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulare ed intracellulare**

Lo ione Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ricopre un ruolo fondamentale nella fisiologia umana, è infatti il catione più abbondante nel nostro organismo e può fungere da secondo messaggero in tutte le cellule. Componente essenziale del tessuto osseo, esso è implicato in numerosi processi, quali: corretto funzionamento di molti enzimi, coagulazione del sangue, proliferazione cellulare, neurotrasmissione e contrazione muscolare, trascrizione genica ed endocitosi; ricopre inoltre un ruolo chiave nel mantenimento della permeabilità al Sodio delle cellule nervose.

In condizioni fisiologiche lo ione  $\text{Ca}^{2+}$  si trova principalmente nello spazio extracellulare, dove la sua concentrazione è mediamente di 2,5 mM, mentre la concentrazione intracellulare corrisponde a circa 100 nM. In risposta a determinati stimoli si verifica l'ingresso dello ione calcio nella cellula in seguito all'apertura di canali specifici, oppure viene rilasciato nel citosol dai depositi intracellulari. L'aumento di calcio intracellulare induce o modifica le risposte fisiologiche e patologiche della cellula.

L'esperimento effettuato è volto ad analizzare la variazione di concentrazione di calcio intracellulare in diverse condizioni di stimolazione, in particolare tramite l'utilizzo della tecnica di  $\text{Ca}^{2+}$  imaging con la quale è possibile sondare otticamente il calcio intracellulare in live-cell imaging. La variazione di concentrazione del calcio intracellulare è stata investigata utilizzando Fura-2, un indicatore fluorescente specifico per lo ione  $\text{Ca}^{2+}$ , le cui proprietà sono direttamente correlate alla concentrazione dello ione; lo stimolo è stato ottenuto introducendo l'agonista per i canali TRP, WS12, nell'ambiente extracellulare.

Per tali esperimenti sono state impiegate le linee cellulari PC3 e PC3-TRPM8, derivanti da carcinoma prostatico da metastasi ossea.

Le cellule PC3 (*wild-type*) sono ampiamente utilizzate per lo studio del carcinoma prostatico e non esprimono né i recettori per gli androgeni (AR) né per gli antigeni specifici prostatici (PSA); nel complesso sono caratterizzate da un comportamento carcinogeno molto aggressivo.

Le PC3-TRPM8 sono cellule analoghe a quelle appena descritte, ma ingegnerizzate al fine di over-esprimere il canale TRPM8, appartenente alla famiglia dei canali TRP (*Transient Receptor Potential*), canali cationici non-voltaggio dipendenti. È stato rilevato che l'espressione di TRPM8 è up-regolata nei tumori prostatici precoci e rappresenta un marker specifico per questo tipo di tumore. Anche queste cellule, testate, non hanno risposto alla presenza di androgeni. TRPM8 è un canale cationico di tipo tetramero **altamente selettivo per il  $\text{Ca}^{2+}$**  e fisiologicamente risponde alla riduzione di temperatura ed alla presenza di mentolo. L'apertura del canale determina l'ingresso del calcio e la successiva depolarizzazione delle fibre nervose afferenti somato-sensoriali, determinando la sensazione di freddo; tale canale, inoltre, si può anche aprire in risposta a specifici induttori quali ad esempio l'agonista selettivo WS12. In questo esperimento entrambi i tipi cellulari sono stati esposti allo stimolo dell'induttore WS12, in un ambiente extracellulare ricco di calcio e, successivamente, in un ambiente privo di calcio.

Fornite queste premesse, il risultato atteso dall'imaging del calcio in seguito ad aggiunta di calcio extracellulare per queste linee cellulari è l'assenza di segnale nelle cellule PC3, e un incremento del segnale da parte delle cellule PC3-TRPM8, poiché queste ultime possiedono i recettori TRPM8 che permettono l'ingresso del calcio.

NO sbagliato

## MATERIALI E METODI

### Piastratura cellule PC3 e PC3-TRPM8

Per questo esperimento sono state utilizzate come modello cellulare le cellule PC3-wild type, come controllo negativo e le PC3-TRPM8. Le cellule, precedentemente preparate in due piastre diverse per garantirne la crescita in quantità adeguata, sono state piastrate **in piastre da 2,5 ml** e utilizzate in seguito durante l'imaging del calcio.

**cosa vuol dire???**

Protocollo per piastratura cellulare, da applicare separatamente alle cellule PC3-wild type e PC3-TRPM8:

1. Rimozione del terreno di coltura
2. Lavaggio in PBS W/O  $\text{Ca}^{2+}$   $\text{Mg}^{2+}$
3. Aggiunta di 1 mL di Trypsina 1X
4. Incubazione delle piastre a  $37^{\circ}\text{C}$  per 5 minuti per consentire il distacco cellulare
5. Aggiunta di 2 ml di terreno RPMI 10% in una Falcon da 15 mL
6. Prelievo delle cellule staccate con 1mL di terreno RPMI 10% ed aggiunta nella Falcon da 15 ml

Per l'esperimento è richiesta una concentrazione finale di cellule pari a  $5 \times 10^4$  cellule/mL, pertanto è stata usata la camera di Burker per calcolare la concentrazione di cellule presenti nelle due Falcon da 15 ml (una per le cellule PC3-wild type ( $27 \times 10^4$  cellule/mL) ed una per le PC3-TRPM8 ( $29 \times 10^4$  cellule/mL)).

Dopo aver calcolato la concentrazione cellulare, le Falcon sono state centrifugate per 5 minuti a 1000 RPM, in seguito è stato eliminato il surnatante ed i pellet sono stati risospesi in 1 mL di terreno RPMI 10%. Infine, sono state prelevate le quantità necessarie per ottenere la concentrazione finale voluta di  $5 \times 10^4$  cellule/mL, e sono state piastrate in quattro diverse piastre da 2,50 mL (due piastre per ciascun tipo cellulare, PC3 e PC3-TRPM8) con 1,5 mL di terreno ognuna.

A questo punto le piastre sono state incubate a  $37^{\circ}\text{C}$  per 48h in modo da permettere l'adesione e la proliferazione.

### Camera di Burker

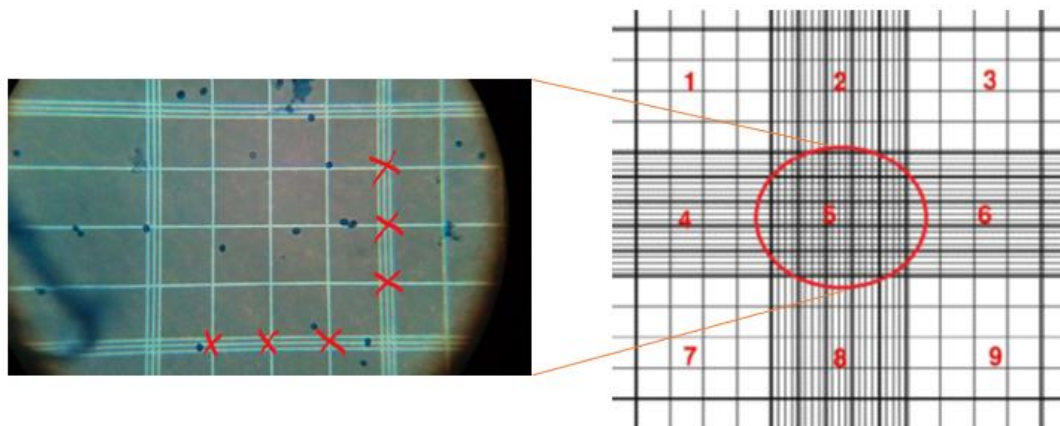


Figura 1. Particolare della camera di Burker.

Determinazione della concentrazione cellulare tramite la camera di Burker: sono stati inseriti in ogni cameretta 10 $\mu$ l di coltura in soluzione. La conta è stata effettuata in 5 riquadri delimitati dalle tre linee di margine (Fig. 1): sono stati scelti i quadrati 1,3,5,7,9 per ciascuna camera. Ogni volta sono state escluse dalla conta le cellule presenti lungo il lato destro e inferiore di ciascun quadrato.

Effettuata la media delle cellule contate di PC3 e PC3-TRPM8, è stata ricavata la concentrazione totale delle colture in soluzione.

Determinata la concentrazione di cellule/mL in soluzione, è stata quindi calcolata l'aliquota da prelevare per avere una concentrazione pari a  $5 \times 10^4$  cellule/mL attraverso la seguente proporzione:

**concentrazione calcolata (cells/mL):  $1\text{mL} = 5 \times 10^4$  (cells/mL): volume da prelevare**

## Ca<sup>2+</sup> IMAGING

Il giorno dell'esperimento, sia le cellule PC3-wild type sia le PC3-TRPM8 sono state incubate a 37°C per circa 40 minuti ognuna con 2  $\mu$ L di soluzione di FURA-2AM 2 $\mu$ M in DMSO (*DiMetilSolfOssido*).

FURA-2AM è un fluoroforo, che si trova sotto forma di aceto metilestere, a carattere abbastanza idrofobico da poter entrare facilmente all'interno della cellula. Una volta attraversata la membrana, viene attaccato dalle esterasi che lo renderanno idrofilico impedendone l'uscita dalle membrane. Lo spettro di assorbimento del FURA-2AM è caratterizzato da due picchi strettamente legati alla concentrazione intracellulare di calcio: l'eccitazione a 380 nm è massima in assenza di calcio e diminuisce al suo aumento, mentre l'assorbimento a 340 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di calcio; in entrambi i casi l'emissione viene registrata sempre a 510 nm.

Successivamente sono state lavate con soluzione fisiologica *Tyrode standard* (tab. 1) e montate su un vetrino nella cameretta per effettuare la misurazione.

Manca il soggetto

L'imaging è stato effettuato mediante il microscopio invertito *Nikon Eclipse Ti* con sorgente a Xenon e analizzato col software MetaFluor. Il rilevamento dei fotogrammi avviene ciclicamente, prima a 340 nm poi a 380 nm, ogni esposizione dura 500 millisecondi e viene ripetuta dopo una pausa di 2 secondi. Da queste rilevazioni viene anche calcolato il rapporto (*ratio*) 340nm/380nm, che aumenta all'aumentare della concentrazione di calcio intracellulare.

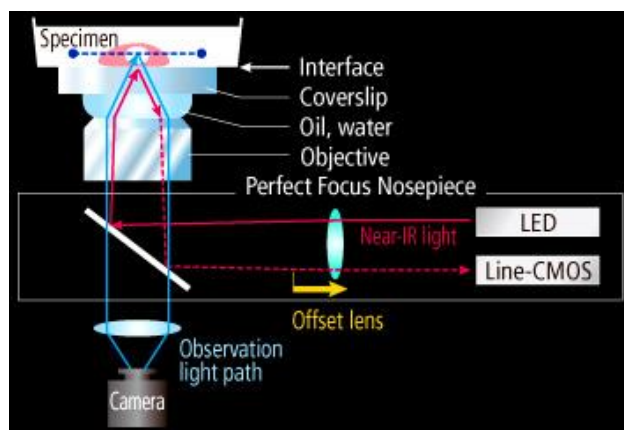


Figura 2. Nikon Eclipse Ti

## ANALISI PC3

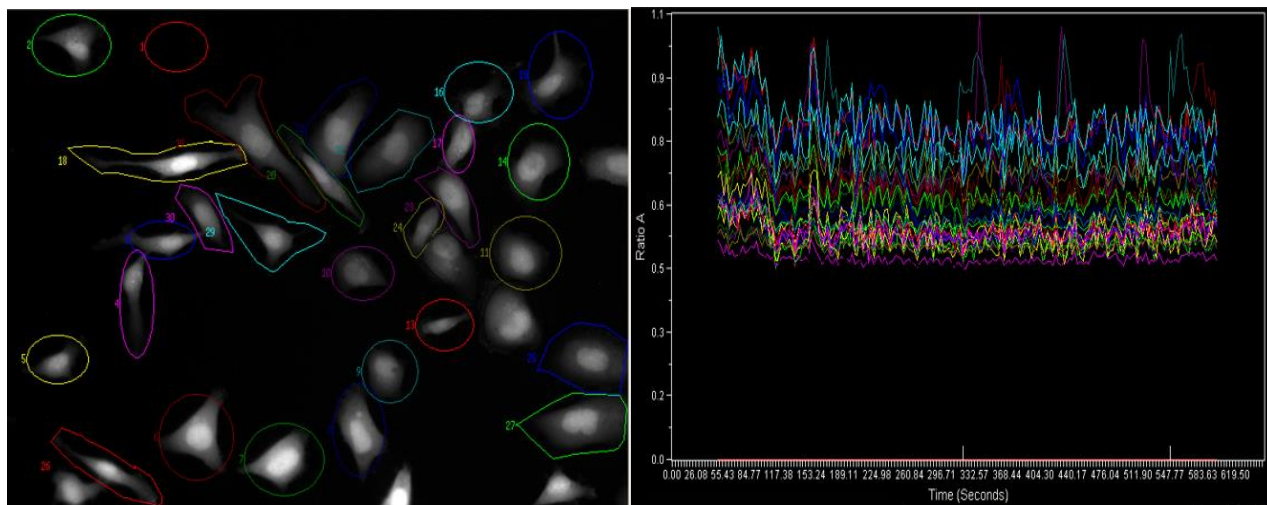


Figura 3. (a) Regioni di interesse (ROI) PC3; (b) Segnale della ratio 340/380 nm corrispondente ad ognuna delle cellule selezionate.

Una volta inserito nell'apposito alloggiamento riscaldato a 37°C, è stata acquisita un'immagine del campione per la messa a fuoco e per la scelta dei campi di interesse. Mediante il software sono state selezionate le cellule nell'inquadratura, disegnandone il contorno, oltre ad una prima regione selezionata nello spazio vuoto che viene utilizzata come background per azzerare il rumore di fondo. Inizia, quindi, la rilevazione con l'eccitazione alle due lunghezze d'onda di FURA-2AM per circa 30 cicli. Dopo questi cicli in condizioni fisiologiche, è stata aggiunta la soluzione con WS12, agonista dei canali  $\text{Ca}^{2+}$ , per 100 cicli circa fino ad esaurimento del segnale. Infine, quando il segnale risulta stabilizzato, si lava il campione con la soluzione fisiologica *Tyrode standard* (tab. 1).

Il software utilizzato fornisce i grafici che esprimono le intensità di emissione relative all'eccitazione a 340 nm, a 380 nm e la ratio tra le due. A ciascuna regione di interesse (ROI), e pertanto a ciascuna cellula, è associato un colore di una scala che va dal blu al rosso, come si vede dal grafico che mostra l'andamento della concentrazione di calcio.

## ANALISI PC3-TRPM8

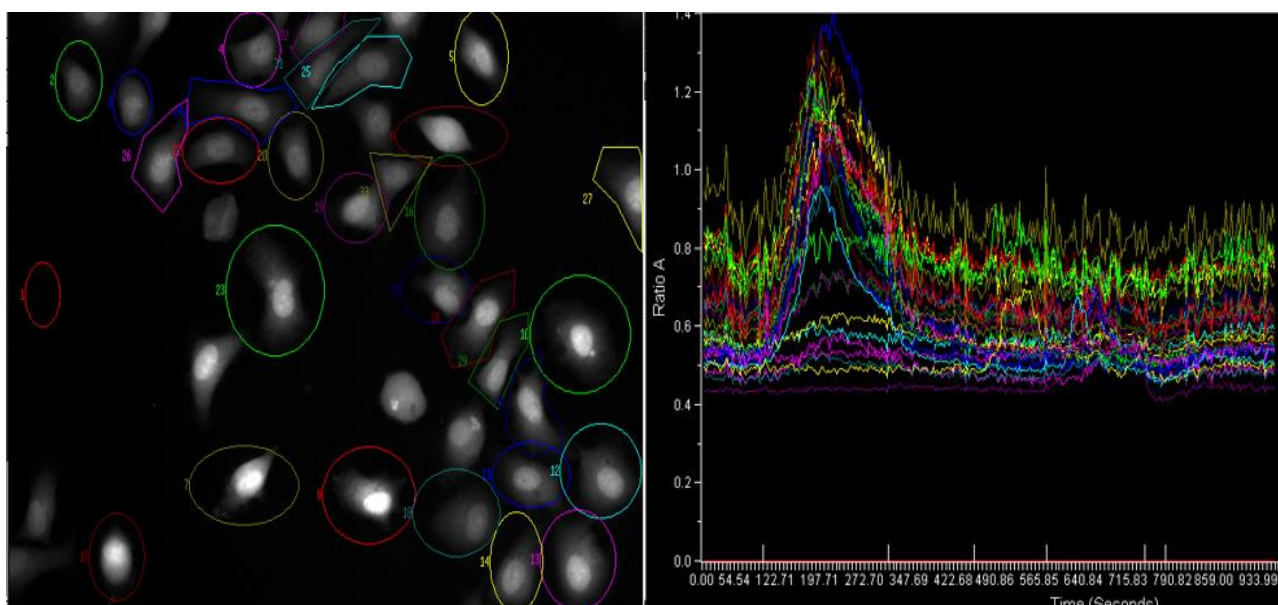


Figura 4. (a) ROI (regioni di interesse); (b) Segnale della ratio 340/380 nm per ognuna delle cellule selezionate.

È stata ripetuta l'analisi con soluzione fisiologica (*Tyrode standard* (tab.1)) per 30 cicli, e con soluzione fisiologica (*Tyrode standard* (tab.1)) con WS12 500nM per 100 cicli (fino all'esaurimento della risposta); il campione è stato poi lavato con *Tyrode standard* (tab.1).

In seguito, sono state aggiunte una soluzione fisiologica  $\text{Ca}^{2+}$  free (tab.2) e successivamente una soluzione fisiologica  $\text{Ca}^{2+}$  free (tab. 2) con WS12 500 nM (per circa 100 cicli fino a esaurimento risposta) e sono stati registrati entrambi i segnali. Infine, il campione è stato rilavato con soluzione fisiologica  $\text{Ca}^{2+}$  free (tab. 2).

	mM
NaCl	154
CaCl <sub>2</sub>	2
KCl	4
MgCl <sub>2</sub>	1
HEPES	5
Glucosio	5,5
pH	7,4

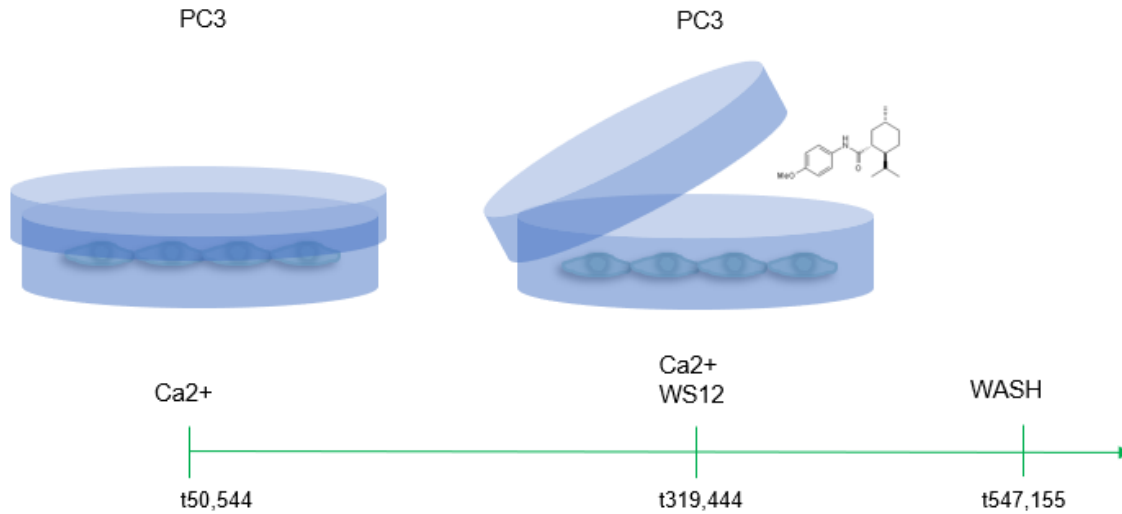
Tabella 1. Soluzione fisiologica *Tyrode standard*

	mM
NaCl	154
CaCl <sub>2</sub>	0
KCl	4
MgCl <sub>2</sub>	1
HEPES	5
Glucosio	5,5
pH	7,4

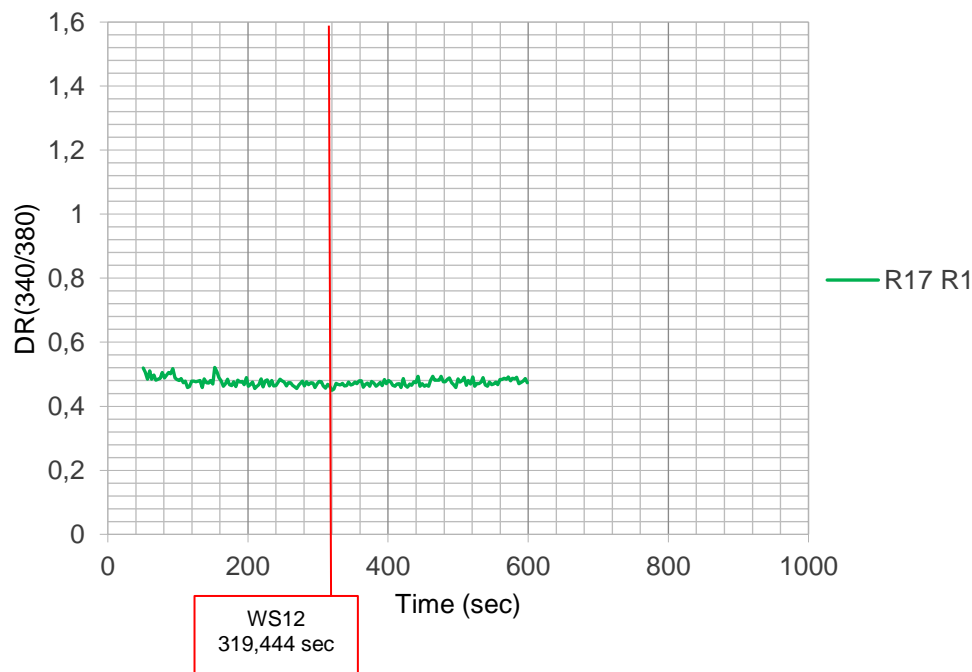
Tabella 2. Soluzione fisiologica *Calcium-free*

## RISULTATI E DISCUSSIONE

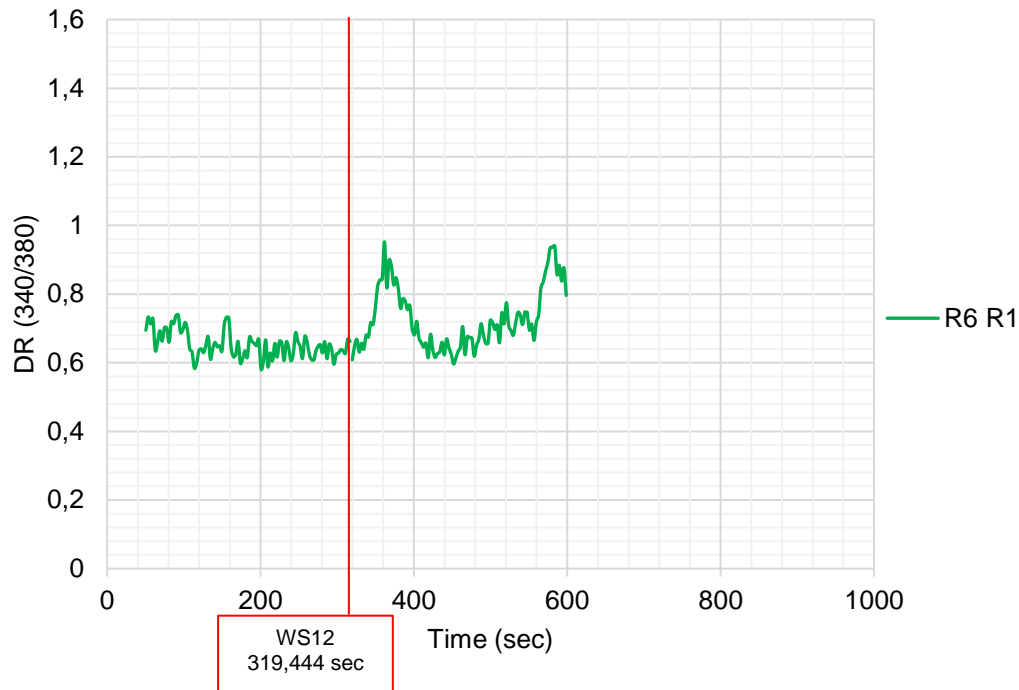
### Risultati PC3-WT



Nell' 96,55% dei casi (28 cellule sulle 29 totali analizzate) non è stata registrata alcuna risposta in seguito alla somministrazione dell'agonista WS12. Esempio della cellula 16 (R17-R1), in seguito all'inoculo di WS12 non si è verificato alcun incremento significativo della concentrazione intracellulare di calcio per tutta la durata dell'esperimento. Questo risultato è consistente con l'espressione ad un livello basale del canale TRPM8 nelle cellule PC3-WT, che pertanto non porta ad una significativa entrata di calcio nelle cellule.



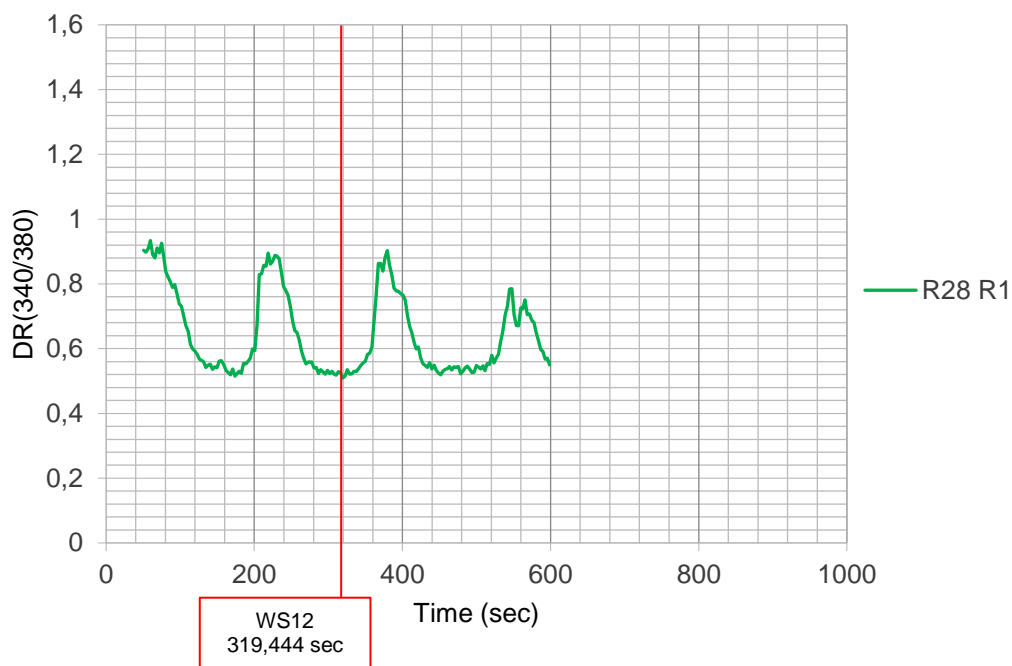
È interessante notare come invece, nel 3,45% dei casi (1 cellula sulle 29 totali), è stato registrato un significativo incremento della concentrazione intracellulare di calcio in seguito alla somministrazione dell'agonista WS12 (t 313,444 sec), come si può evincere dal grafico.



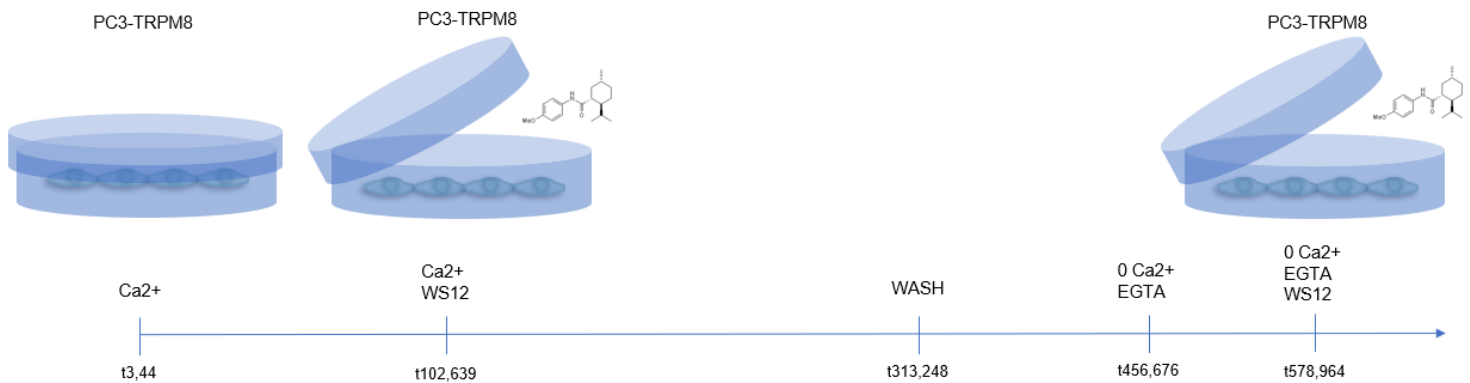
Questo risultato potrebbe essere spiegato da:

- un'attivazione costitutivamente maggiore del gene del canale TRPM8, dovuta ad una mutazione
- un'attivazione di altri canali del calcio
- una contaminazione avvenuta con cellule PC3-TRPM8

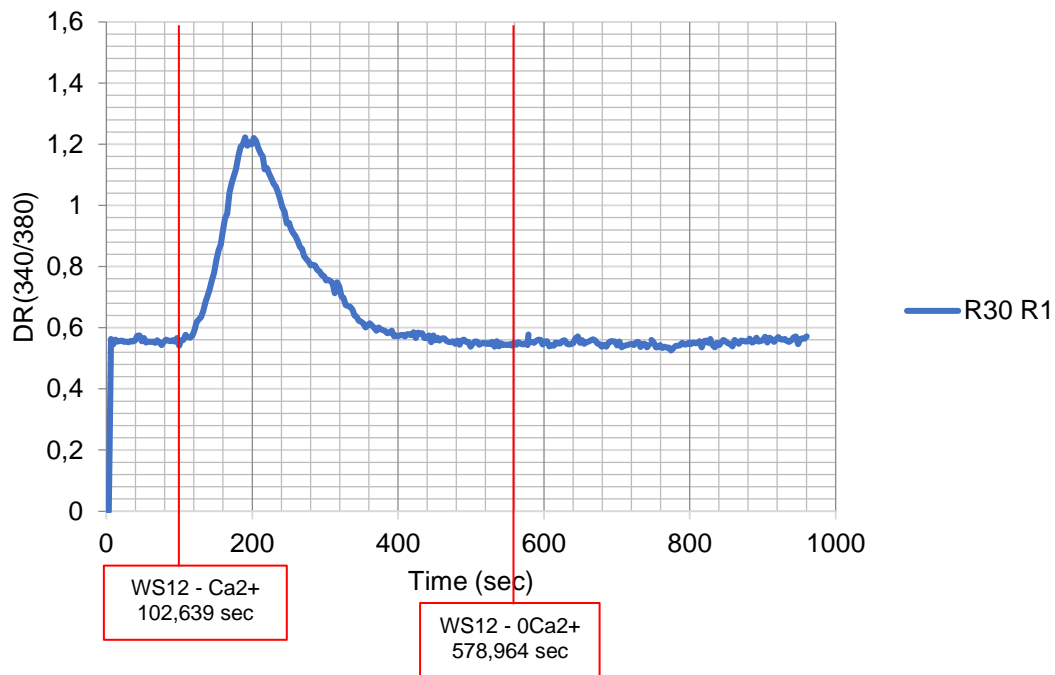
Infine, il 10,34% delle cellule (3 su 29) ha mostrato un andamento oscillante della concentrazione di calcio intracellulare in presenza dell'agonista WS12, apparentemente non correlato alla somministrazione dell'agonista WS12. Esempio della cellula 27 (R28-R1). Questa peculiare risposta era già stata evidenziata negli esperimenti precedenti, e sembra essere legata ad una particolare fase del ciclo cellulare in cui si trovano alcune cellule durante l'esperimento, in quanto il calcio è coinvolto nel controllo e nella regolazione del ciclo cellulare.



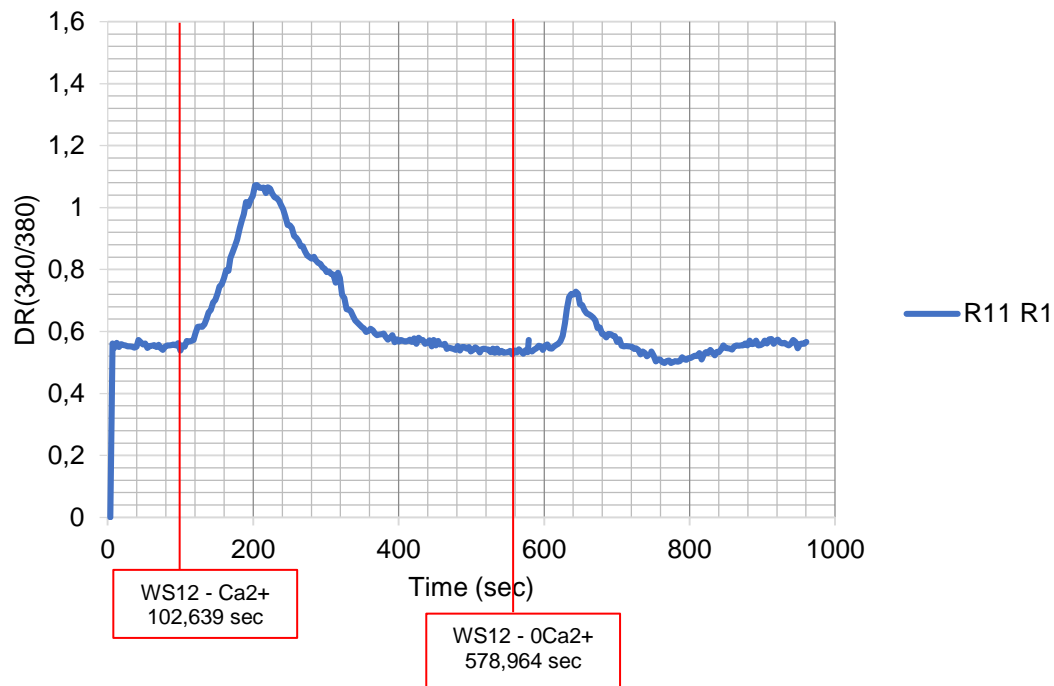
## Risultati PC3-TRPM8



Delle 32 cellule analizzate, il 18,75% (6 cellule) non ha mai risposto in modo significativo all'inoculo dell'agonista. A partire dalle 26 cellule considerate su 32 (81,25%) che hanno risposto significativamente all'inoculo di WS12, sono state individuate due diverse popolazioni. Nella prima popolazione, che rappresenta il 53,13% delle cellule analizzate (17 su 32), è stato registrato un innalzamento della concentrazione di calcio intracellulare in seguito all'inoculo dell'agonista WS12 in un ambiente extracellulare ricco di calcio e un'assenza di variazioni della concentrazione intracellulare di calcio in seguito all'inoculo di WS12 in un ambiente privo di calcio extracellulare. Esempio della cellula 29 (R30-R1).



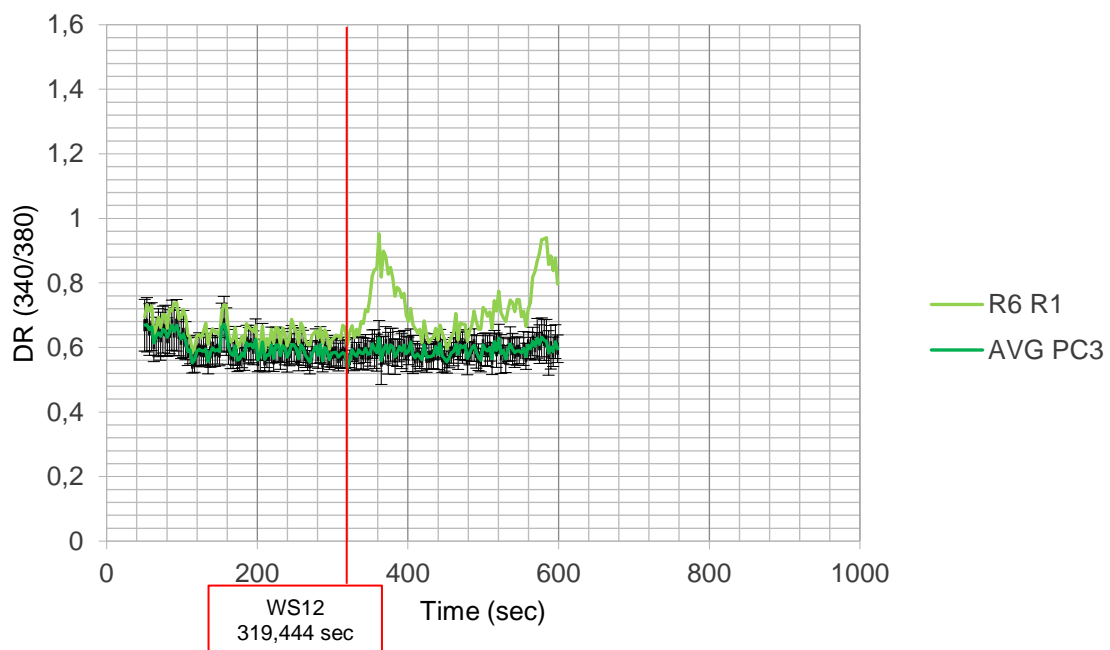
La seconda popolazione, che rappresenta il 28,13% delle cellule analizzate (9 cellule su 32), ha registrato un incremento del segnale di calcio intracellulare anche in seguito all'inoculo di WS12 in assenza di calcio extracellulare. Esempio cellula 10 (R11-R1). Questo risultato potrebbe indicare un rilascio di calcio nel citosol dai depositi intracellulari, e quindi spiegare il secondo picco di incremento di calcio, in condizioni Ca<sup>2+</sup> free.



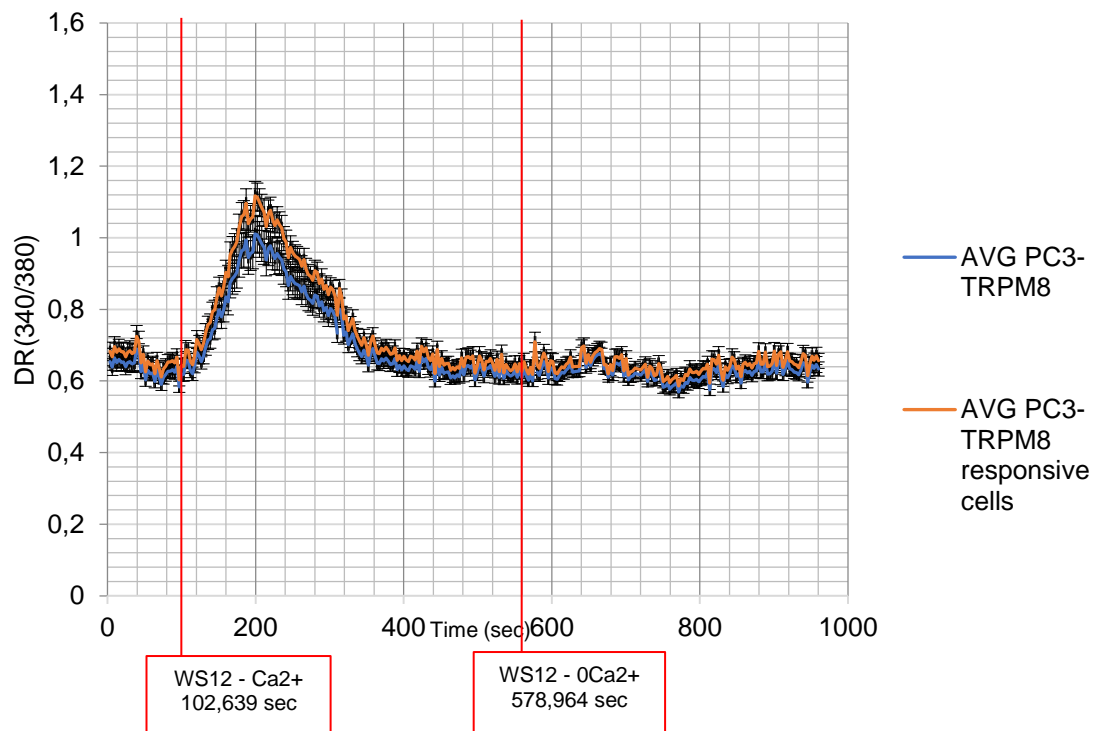
## ANALISI PC3-WT e PC3-TRPM8

Nei seguenti grafici viene mostrata la media delle risposte delle cellule totali analizzate nell'esperimento e la media delle cellule che hanno risposto positivamente (con un incremento significativo della concentrazione di calcio intracellulare) all'inoculo dell'agonista. Su entrambe le medie è stata fatta l'analisi statistica SEM (Errore Standard della Media).

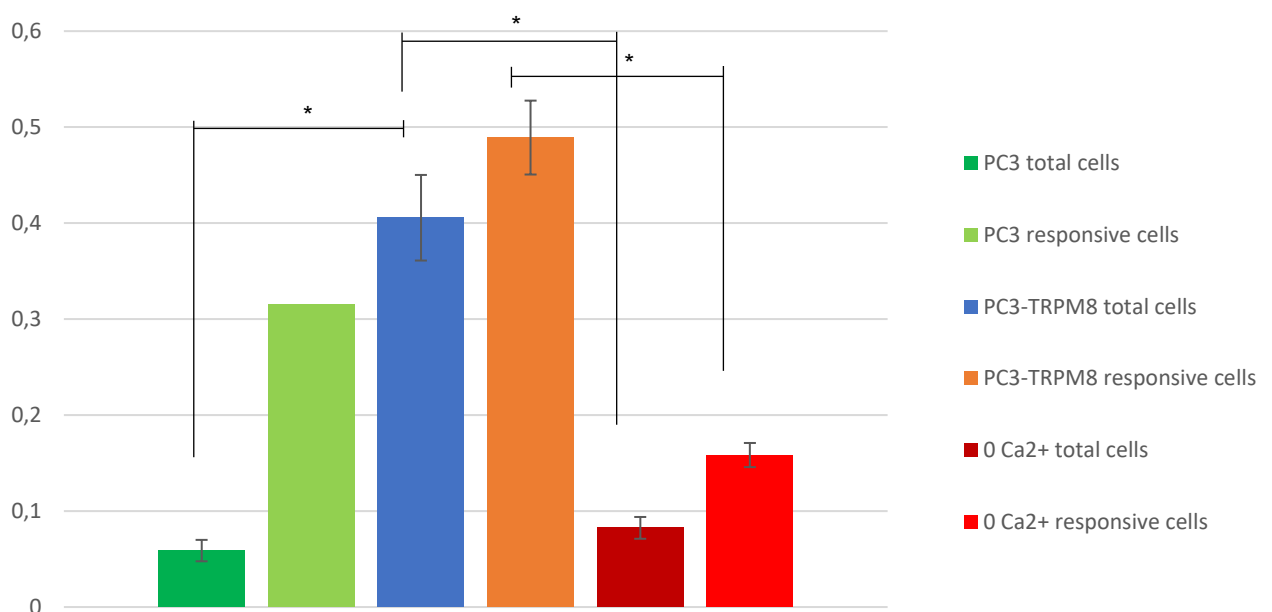
Per quanto riguarda le cellule PC3-WT, non è stato possibile applicare l'analisi statistica SEM sulla media delle cellule che avevano risposto positivamente, perché una sola cellula sul totale di quelle analizzate ha dato questo tipo di risposta. Come si può notare dal grafico, le cellule PC3-WT non hanno risposto alla somministrazione dell'agonista, congruentemente con l'ipotesi formulata all'inizio dell'esperimento, data l'assenza di over-espressione del canale TRPM8.



Per quanto riguarda le cellule PC3-TRPM8, dal grafico si evidenzia come la media delle cellule totali abbia risposto positivamente all'inoculo di WS12. Si può inoltre apprezzare un ulteriore incremento della risposta positiva se si prende in considerazione solamente la media delle cellule che hanno risposto positivamente alla somministrazione dell'agonista WS12.



Infine, il *barplot* in figura mostra il confronto delle medie dei picchi di ogni cellula osservati per i due gruppi di cellule, ponendo l'attenzione sul confronto tra le medie dei picchi della totalità delle cellule e di quelle che hanno risposto all'inoculo dell'agonista WS12 (positive all'aumento della concentrazione di calcio intracellulare).





I dati sono stati analizzati con l'utilizzo del linguaggio di programmazione "R". Il test di normalità di Shapiro-Wilk ha dimostrato che solo le medie dei picchi per un gruppo di cellule (PC3-TRPM8 totali in presenza di soluzione  $\text{Ca}^{2+}$  free) si distribuiscono normalmente ( $P=0,05848$ ), mentre per gli altri gruppi si deve rifiutare l'ipotesi nulla di normalità ( $P<0,05$ ). Inoltre, bisogna tenere conto del fatto che delle cellule PC3, solo una risponde. Dato l'esito dei test di normalità, è stato opportuno procedere con il test non parametrico di Wilcoxon. Questo ha evidenziato che le medie sono statisticamente significative (\*) tra:

- PC3 totali e PC3-TRPM8 totali entrambe in soluzione di  $\text{Ca}^{2+}$
- PC3-TRPM8 totali in  $\text{Ca}^{2+}$  e PC3-TRPM8 totali in soluzione  $\text{Ca}^{2+}$  free
- PC3-TRPM8 responsive in  $\text{Ca}^{2+}$  e PC3-TRPM8 responsive in  $\text{Ca}^{2+}$  free

I risultati di questi test sostengono quindi l'ipotesi dalla quale si è partiti per strutturare l'esperimento: l'over-espressione dei canali del calcio nelle PC3-TRPM8 induce una risposta significativamente maggiore in presenza di calcio extracellulare.