

Molto bravi. Un po' lunga e ridondante ma avete inserito tutte le informazioni. Ho fatto solo qualche piccolo appunto.
Complimenti per le referenze!
Voto = 30/30 = 14



UNIVERSITÀ DI TORINO
SCUOLA DI SCIENZE DELLA NATURA

Laboratorio di Biofisica

MISURE DI Ca^{2+} INTRACELLULARE PER LO STUDIO DELLE PROPRIETÀ DI TRPM8

Gruppo D

Acquaviva Laura, Albrile Lorenzo, Balestra Chiara, Cagno Nicolò,
Dufour Mathieu, Marsala Michelangelo, Mensi Marta, Pedini Davide,
Peroni Giulia, Perrone Sarah, Stura Giulia

Prof. A. Fiorio Pla

a.a. 2018/2019

Indice

1	Introduzione	2
2	Preparazione delle soluzioni	4
3	Piastratura cellule PC3 e PC3-TRPM8	9
4	Ca^{2+} imaging	14
5	Analisi dati	20
5.0.1	Analisi di PC3 WT	20
5.0.2	Analisi di PC3-TRPM8	28
6	Conclusioni	38

Capitolo 1

Introduzione

Il cancro alla prostata è tra i tumori più frequentemente diagnosticati ed è una delle più comuni cause di morte tumorale negli uomini. La trasformazione in cellule maligne è accompagnata da aumentata proliferazione, differenziazione aberrante e un'abilità alterata nella morte cellulare.

Questi fenomeni, in un tessuto con una crescita anomala, possono condurre a un'espansione incontrollata ed invasiva, tipica del tumore. Tali trasformazioni sono spesso accoppiate a cambiamenti nell'espressione dei canali ionici e, conseguentemente, alla progressiva variazione delle risposte cellulari coinvolte. Molti membri della famiglia dei canali ionici TRP (Transient Receptor Potential) sono implicati in tutte le caratteristiche sopracitate ed il loro livello di espressione è collegato all'insorgenza e alla progressione del cancro¹. La super famiglia di TRP consiste in più di 30 canali cationici, di cui la maggior parte permeabili allo ione Ca^{2+} .

Questa superfamiglia può essere divisa, sulla base di sequenze di omologia, in sette famiglie principali che risultano implicate nei cinque sensi e molto conservate. La famiglia di interesse per questo lavoro è TRPM (il suffisso identifica la famiglia, M indica melastatina) e nello specifico sullo studio di TRPM8.

Il canale TRPM8 è un omotetramero, composto da quattro subunità identiche con un dominio transmembrana a sei eliche: le prime quattro (S1-S4) agiscono come sensore del voltaggio e permettono il legame con il mentolo, icilina ed altri agonisti del canale; mentre S5, S6 ed il loop che le connette costituiscono il poro, che è un canale cationico scarsamente selettivo (si veda

¹Referenza: Grolez GP., Gkika D. "TRPM8 Puts the Chill on Prostate Cancer", *Pharmaceuticals* (2016)

Figura 1.1).

L'attivazione del canale può avvenire in seguito ad un abbassamento della temperatura, alla presenza di sostanze che mimano il freddo (ad esempio, mentolo ed eucalipto) ma è anche dovuto a sostanze endogene, come l'antigene prostatico specifico (PSA), un enzima che viene prodotto dalla prostata. In seguito all'attivazione vi è l'ingresso nella cellula di Ca^{2+} , il quale origina una depolarizzazione².

TRPM8 è studiato nella progressione del tumore prostatico a causa del suo comportamento peculiare: quando il tumore è in sito si evidenzia un'aumentata espressione di TRPM8, viceversa si ha una sua diminuzione nel passaggio allo stato metastatico. Si pone perciò di rilevante importanza lo studio di questi canali, allo scopo di individuare un meccanismo protettivo verso la migrazione tumorale mediante opportuna attivazione di TRPM8³.

Lo studio qui presentato si concentra sull'analisi, mediante imaging di Ca^{2+} con *Fura-2*, dell'espressione dei TRPM8 in una linea cellulare (PC3) di cancro prostatico metastatizzato in osso. L'obiettivo è innanzitutto quello di valutare la differenza di segnale di Ca^{2+} tra cellule PC3 wild type e cellule PC3 con overespressione di TRPM8 e successivamente, di verificare la presenza del canale di interesse nel reticolo endoplasmatico, tramite esperimenti in soluzione zero calcio extracellulare.

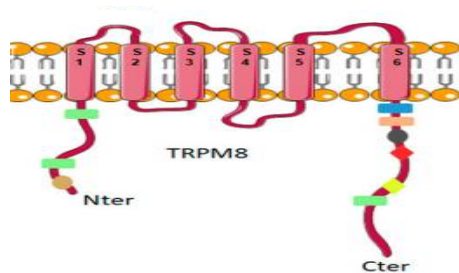


Figura 1.1: Diagramma schematico per illustrare le caratteristiche strutturali di TRPM8; in rosa sono mostrate le sei eliche transmembrana, tra S5 ed S6 si ha la localizzazione del poro. N e C terminale sono nel dominio intracellulare. L'immagine è riprodotta da TRPM Family Channels in Cancer, *Pharmaceuticals* (2018)

²Referenza: Hantute Ghesquier A. et al. "TRPM Family Channels in Cancer", *Pharmaceuticals* (2018)

³Referenza: Gkika D. et al. "PSA reduces prostate cancer cell motility by stimulating TRPM8 activity and plasma membrane expression", *Oncogene* (2010)

Capitolo 2

Preparazione delle soluzioni

Per raggiungere l'obiettivo dell'esperienza, sono state preparate in primo luogo due soluzioni extracellulari: *tyrode standard* e Ca^{2+} *free*. Si tratta rispettivamente di una soluzione fisiologica in cui saranno depositate le cellule da utilizzare nel corso dell'esperimento e di una soluzione tyrode in cui non verrà introdotto calcio, in quanto l'obiettivo è osservare come reagiscono i corrispondenti canali delle cellule in ambienti extracellulari con o senza calcio.

Viene in seguito riportato un elenco della strumentazione:

- Bilancia analitica;
- Beaker;
- PH-metro;
- Agitatore magnetico;
- Ancoretta magnetica;
- Micropipetta P1000;
- Pipetta Pasteur;
- Cilindro graduato;
- Provetta Falcon.

Noti la molarità della soluzione finale desiderata e il peso molecolare dei vari componenti necessari per la preparazione delle soluzioni, sono state calcolate le quantità di ciascun costituente per soluzioni da 100 *ml*. È stato notato che $mM = 10^{-3} \frac{mol}{l}$, dove *M* è l'unità di misura della molarità di una soluzione, e $MW = \frac{g}{mol}$, che rappresenta l'unità di misura della massa molecolare.

Sono state compilate le *Tabelle 2.1 e 2.2* seguendo il ragionamento in seguito riportato.

Per quanto riguarda la terza riga delle tabelle sono stati effettuati i seguenti conti:

- $154mM \cdot 58.44MW = 154 \cdot 58.44 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \frac{g}{mol} = 8.99976 \frac{g}{l}$
- $2mM \cdot 147.02MW = 2 \cdot 147.02 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \frac{g}{mol} = 0.29404 \frac{g}{l}$
- $4mM \cdot 74.56MW = 4 \cdot 74.56 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \frac{g}{mol} = 0.29824 \frac{g}{l}$
- $5mM \cdot 238MW = 5 \cdot 238 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \frac{g}{mol} = 1.190 \frac{g}{l}$
- $5.5mM \cdot 180.2MW = 5.5 \cdot 180.2 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{l} \frac{g}{mol} = 0.9911 \frac{g}{l}$

Nella quinta riga sono richiesti i grammi in un litro di una soluzione 10 volte più concentrata. È stato sufficiente moltiplicare ciascun elemento della riga precedente per 10.

La settima riga, invece, è stata risolta con la seguente equazione

$$2.9824 \text{ g} : 1 \text{ l} = x : 250 \cdot 10^{-3} \text{ l}$$

da cui

$$x = \frac{2.9824 \text{ g} \cdot 250 \cdot 10^{-3} \text{ l}}{1 \text{ l}} = 0.7456 \text{ g}$$

e quindi $0.7456 \frac{g}{250ml}$.

Identicamente per le altre caselle sono stati ricavati i seguenti valori:

- $89.9976 \text{ g} : 1 \text{ l} = x : 250 \cdot 10^{-3} \text{ l} \iff x = 22.499325 \text{ g}$
- $11.90 \text{ g} : 1 \text{ l} = x : 250 \cdot 10^{-3} \text{ l} \iff x = 2.975 \text{ g}$
- $9.911 \text{ g} : 1 \text{ l} = x : 250 \cdot 10^{-3} \text{ l} \iff x = 2.47775 \text{ g}$
- $2.9404 \text{ g} : 1 \text{ l} = x : 250 \cdot 10^{-3} \text{ l} \iff x = 0.7351 \text{ g}$

I calcoli appena riportati, ossia i grammi necessari in una soluzione di 250 *ml* della settima riga, sono stati richiesti durante il laboratorio come esercizio teorico ma non serviranno nei procedimenti successivi, poiché le soluzioni richieste per l'esperienza sono di 100 *ml*.

Per completare l'ultima riga è stato seguito lo stesso ragionamento:

- $2.9824 \text{ g} : 1 \text{ l} = x : 100 \cdot 10^{-3} \text{ l} \iff x = 0.29824 \text{ g}$
- $89.9976 \text{ g} : 1 \text{ l} = x : 100 \cdot 10^{-3} \text{ l} \iff x = 8.99976 \text{ g}$
- $11.90 \text{ g} : 1 \text{ l} = x : 100 \cdot 10^{-3} \text{ l} \iff x = 1.190 \text{ g}$
- $9.911 \text{ g} : 1 \text{ l} = x : 100 \cdot 10^{-3} \text{ l} \iff x = 0.9911 \text{ g}$
- $2.9404 \text{ g} : 1 \text{ l} = x : 100 \cdot 10^{-3} \text{ l} \iff x = 0.29404 \text{ g}$

La colonna relativa a $MgCl_2$ richiede un ragionamento diverso.

Lo stock a disposizione in laboratorio era $4.9 \text{ M} = 4.9 \frac{\text{mol}}{\text{l}}$. Impostando la seguente proporzione:

$$4.9 \text{ mol} : 1 \text{ l} = 10^{-3} \text{ mol} : x$$

si è ottenuto $x = 204 \mu\text{l}$.

Per trovare quanti microlitri si devono prelevare dallo stock e diluire in un litro di acqua per avere una soluzione 10 volte più concentrata è bastato moltiplicare per 10 e si è quindi ottenuto $2040 \mu\text{l}$.

Infine, per ottenere quanti μl dovevano essere diluiti in 250 *ml*, è stata risolta la seguente equazione:

$$2040 \text{ mol} : 1 \text{ l} = x : 250 \text{ ml}$$

e quindi $x = 510 \mu\text{l}$.

In 100 *ml* invece, risolvendo:

$$2040 \text{ mol} : 1 \text{ l} = x : 100 \text{ ml}$$

devono essere diluiti $x = 204 \mu\text{l}$.

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle (*Tabella 2.1* e *Tabella 2.2*): la prima è relativa alla soluzione senza calcio ($Ca^{2+} \text{ free}$), mentre la seconda a quella *tyrode standard*.

Tabella 2.1: Tabella riassuntiva per soluzione Ca^{2+} free. Nella prima riga vengono riportati i componenti di interesse per la riproduzione di una soluzione fisiologica (Tyrode standard) privata del calcio: cloruro di sodio, cloruro di potassio, cloruro di magnesio, HEPES (sostanza organica introdotta per mantenere stabile il pH fisiologico) e glucosio.

	<i>NaCl</i>	<i>KCl</i>	<i>MgCl₂</i>	<i>HEPES</i>	<i>Glucose</i>
<i>mM</i>	154	4	1	5	5.5
<i>MW</i>	58.44	74.56	Stock 4.9 M	238	180.2
$\frac{g}{l}$	8.99976	0.29824		1.19	0.9911
$\frac{\mu l}{l}$			204		
$10X \frac{g}{l}$	89.9976	2.9824		11.9	9.911
$10X \frac{\mu l}{l}$			2040		
$10X \frac{g}{250ml}$	22.499	0.7456		2.975	2.47775
$10X \frac{\mu l}{250ml}$			510		
$10X \frac{g}{100ml}$	8.9976	0.29824		1.19	0.9911
$10X \frac{\mu l}{100ml}$			204		

Tabella 2.2: Tabella riassuntiva per la soluzione Tyrode standard. Gli elementi di interesse, illustrati nella prima riga, coincidono con quelli della tabella precedente con l'aggiunta dei cloruro di calcio.

	<i>NaCl</i>	<i>CaCl₂</i>	<i>KCl</i>	<i>MgCl₂</i>	<i>HEPES</i>	<i>Glucose</i>
<i>mM</i>	154	2	4	1	5	5.5
<i>MW</i>	58.44	147.02	74.56	Stock 4.9 M	238	180.2
$\frac{g}{l}$	8.99976	0.29404	0.29824		1.19	0.9911
$\frac{\mu l}{l}$				204		
$10X \frac{g}{l}$	89.9976	2.9404	2.9824		11.9	9.911
$10X \frac{\mu l}{l}$				2040		
$10X \frac{g}{250ml}$	22.499	0.7351	0.7456		2.975	2.47775
$10X \frac{\mu l}{250ml}$				510		
$10X \frac{g}{100ml}$	8.9976	0.29404	0.29824		1.19	0.9911
$10X \frac{\mu l}{100ml}$				204		

Per la preparazione di ciascuna delle due soluzioni è stato svolto il seguente procedimento.

Gli elementi sono stati pesati mediante una bilancia analitica, avente precisione al decimo di milligrammo. Dopo ogni misurazione l'elemento è stato messo in un beaker. È stato poi aggiunto nel beaker, mediante una micropipetta P1000, un quantitativo di $204\mu\text{l}$ di MgCl_2 .

Successivamente, sono stati aggiunti poco meno di 75 ml di acqua distillata, in modo da avere un po' di margine per non superare i 100 ml di soluzione finale, considerata la necessaria aggiunta di N_2OH . La miscela è stata portata ad un PH basico pari a 7.4, mediante un PH-metro a sonda continua, un agitatore magnetico, un'ancoretta magnetica (messa in rotazione dal campo magnetico generato dall'agitatore magnetico) e una pipetta Pasteur. È stato necessario attendere prima la stabilizzazione del valore di PH per poi aggiungere N_2OH una goccia alla volta con una pipetta Pasteur.

Si è proceduto poi nel portare a volume: la soluzione è stata travasata in un cilindro graduato, dove è stata aggiunta dell'acqua distillata fino al raggiungimento di un volume di 100 ml, con una precisione dello 0.5 ml.

Il cilindro è stato poi sigillato all'estremità, permettendo così di poter miscelare la soluzione. Quest'ultima è stata infine prelevata dal cilindro mediante pipetta Pasteur e suddivisa in due provette Falcon da 50 ml ciascuna.

Capitolo 3

Piastratura cellule PC3 e PC3-TRPM8

La piastratura è stata effettuata separatamente per le cellule PC3 e PC3-TRPM8, utilizzando due diverse postazioni di lavoro.

Viene in seguito riportato un elenco della strumentazione utilizzata:

- Cappa Faster BH-EN-2004;
- Pipettatore automatico;
- Micropipetta P1000;
- Piastra di Petri;
- Provetta Falcon;
- Microscopio ottico;
- Camera di Burkert;
- Incubatore cellulare a CO_2 (5 vol.-%);
- Centrifuga.

Il procedimento descritto successivamente è quello relativo alle cellule PC3 (wild type), considerando analogo quello relativo alle cellule PC3-TRPM8. Sono state prese due piastre contenenti le cellule (due per linea cellulare) e portate sotto cappa, per lavorare in condizioni di sterilità.

Per prima cosa, dopo aver aperto la piastra, è stato utilizzato il pipettatore automatico per rimuovere il terreno di coltura cellulare, prestando attenzione a non toccare le cellule sul fondo.

È stato poi effettuato un lavaggio con 3 ml di PBS (tampone fosfato salino) senza Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Successivamente, per staccare le cellule dalla piastra, è stato aggiunto 1 ml di enzima Trypsina con micropipetta P1000.

La piastra è stata chiusa e messa dentro l'incubatore a 37°C per 5 minuti, per far agire meglio l'enzima.

Una volta rimossa dall'incubatore, è stato effettuato un ulteriore lavaggio all'interno della piastra con meno di 1 ml di Trypsina in micropipetta, al fine di staccare meccanicamente le cellule rimaste ancora attaccate sul fondo. Questo procedimento è stato ripetuto più volte.

Sono state infine osservate al microscopio le piastre per verificare che le cellule si fossero correttamente staccate.

Nel mentre è stata presa una provetta Falcon da 14 ml, in cui sono stati versati 2 ml di terreno RPMI 10%, costituito da terreno RPMI arricchito con siero, antibiotico (gentamicina) e glutammina.

La sospensione cellulare nella piastra (1 ml) è stata raccolta con la micropipetta ed è stata messa dentro la provetta, assieme al terreno.

È stato prelevato 1 ml ulteriore di terreno per fare un ultimo lavaggio alla piastra, al fine di raccogliere eventuali cellule rimaste e lo stesso è stato messo poi all'interno della provetta, ottenendo un volume totale di 4 ml di liquido con cellule sospese al suo interno.

Come procedura finale, il liquido all'interno della provetta è stato sospeso più volte con l'ausilio della micropipetta, al fine di mantenere una concentrazione omogenea, per rompere eventuali aggregati e per evitare il deposito delle cellule sul fondo.

In seguito sono state caricate con la soluzione delle provette due camere di Burker, prelevando con il puntale da 10 μ l la sospensione dalle due provette da 14 ml. È stato poi effettuato il conteggio delle cellule in determinati campi della camera. Per fare ciò si è scelto di contare le cellule nei cinque campi mostrati in *Figura 3.1*, includendo soltanto i lati in alto e a sinistra di ogni quadrato interessato, per evitare ripetizioni nel conteggio.

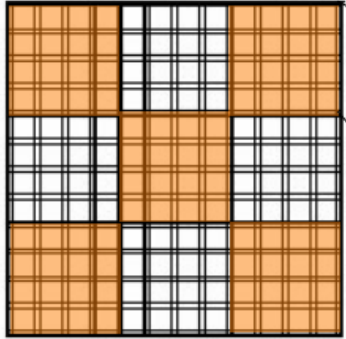


Figura 3.1: Protocollo per il conteggio delle cellule nella camera di Burkner. La **cellula** numero 1 è quella in alto a sinistra, la 2 in alto a destra, la 3 in centro, la 4 in basso a sinistra, la 5 in basso a destra.
Immagine riprodotta dagli appunti della Prof. Alessandra Fiorio Pla

Il conteggio è stato effettuato a turno da due membri di ogni gruppo, prima su una camera e poi sull'altra, per avere una misura più corretta.
I seguenti risultati sono stati ottenuti dalle osservazioni sulla linea wild type (la prima tabella si riferisce ai dati osservati sulla prima camera, la seconda tabella alle misurazioni effettuate sulla seconda):

Tabella 3.1: Numero di cellule della linea wild type contate nella prima camera.

Numero cella	Prima misura	Seconda misura	Media
1	58	61	60
2	74	66	70
3	51	47	49
4	50	54	52
5	34	39	36

Tabella 3.2: Numero di cellule della linea wild type contate nella seconda camera.

Numero cella	Prima misura	Seconda misura	Media
1	35	/	35
2	56	/	56
3	27	/	27
4	/	/	/
5	/	/	/

I dati mancanti sulla seconda camera non sono stati misurati per risparmio di tempo, potendosi ritenere quelli raccolti fino a quel momento sufficienti per proseguire con l'esperimento.

I seguenti risultati sono stati invece ottenuti per la linea PC3-TRPM8:

Tabella 3.3: Numero di cellule della linea PCR3-TRPM8 contate nella prima camera.

Numero cella	Prima misura	Seconda misura	Media
1	87	81	84
2	86	82	84
3	64	72	68
4	61	63	62
5	57	64	60

Tabella 3.4: Numero di cellule della linea PCR3-TRPM8 contate nella seconda camera.

Numero cella	Prima misura	Seconda misura	Media
1	62	64	63
2	70	67	68
3	62	63	63
4	51	67	59
5	55	56	56

Le misurazioni hanno portato ad un numero medio di 48 cellule per ml per la linea wild type e di 66,7 cellule per ml per la linea TRPM8.

Dopo aver effettuato il conteggio, le provette da 14 ml sono state centrifugate per cinque minuti ad una velocità di 1000 RPM, in modo da separare il terreno dalle cellule, che hanno formato per precipitazione un pellet al fondo della provetta.

Ritornando sotto cappa si è dunque proceduto all'aspirazione e rimozione del surnatante, utilizzando la pipetta e facendo attenzione a non prelevare le cellule dal pellet.

Una volta rimosso il surnatante, il pellet è stato poi nuovamente sospeso in 1 ml di RPMI 10%.

A questo punto sono stati calcolati, tramite una proporzione diretta, i μl di sospensione cellulare necessari per ottenere una sospensione di 5×10^4 cellule per ml di terreno, utilizzando come dato il numero medio di cellule calcolato in precedenza.

Per quanto riguarda le PC3-TRPM8, è risultato necessario prelevare 18,6 μl di sospensione cellulare, mentre per la linea wild type 26 μl .

Infine, sono state preparate due piastre, mettendo prima 1.5 ml di terreno (sempre RPMI 10%) e aggiungendo successivamente, con un puntale adeguatamente tarato, le quantità di sospensione cellulare calcolate al punto precedente.

Capitolo 4

Ca^{2+} imaging

Una volta preparate le piastre contenenti le due linee cellulari, l'obiettivo è ora lo studio delle variazioni dei segnali dello ione calcio stimolando il canale con l'agonista WS12, utilizzando un metodo raziometrico.

Viene in seguito riportato un elenco della strumentazione utilizzata:

- Lampada a Xenon;
- Software MetaFluor;
- Microscopio a fluorescenza.

La sonda fluorescente utilizzata per le misure di concentrazioni di ioni calcio all'interno della cellula è *Fura-2*. Si tratta di una sonda organica raziometrica caratterizzata da una bassa costante di dissociazione ($K_d = 0.14\mu M$, che la rende principalmente utile per il Ca^{2+} citosolico), da un'emissione a 510 nm e da una dinamica di associazione e dissociazione con il calcio piuttosto lenta. Ciò che rende *Fura-2* uno strumento di grande interesse sperimentale è la sua proprietà raziometrica; lo spettro di eccitazione (*Figura 4.1*) è dipendente dalla concentrazione di Ca^{2+} e presenta tre punti di interesse:

- punto a 340 nm, in cui l'intensità della fluorescenza cresce all'aumentare della concentrazione di Ca^{2+} ;
- punto a 380 nm, in cui l'intensità di fluorescenza diminuisce al crescere della concentrazione dello ione;
- punto (intorno ai 360 nm) invariante.

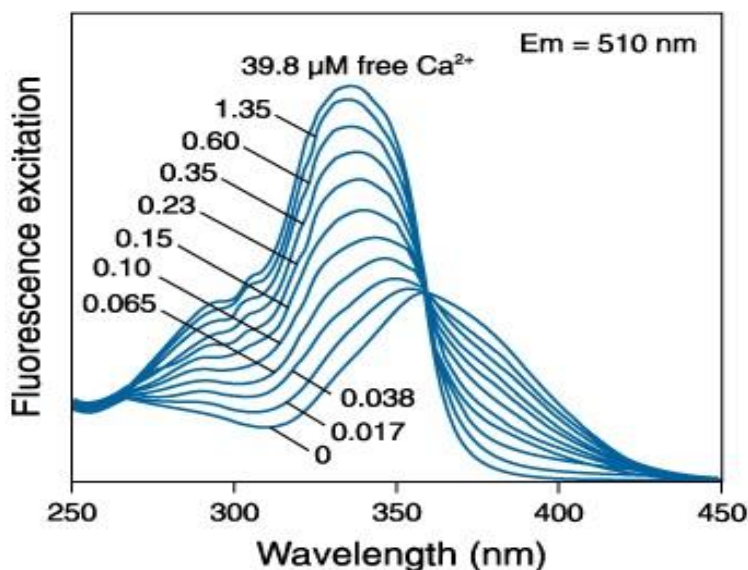


Figura 4.1: Spettro di eccitazione della sonda Fura-2 con emissione alla lunghezza d'onda di 510 nm. Ogni curva corrisponde a una diversa concentrazione di calcio libero presente nella soluzione, in grafico sono riportate le curve nel range di Ca^{2+} da $0\mu\text{M}$ a $39.8\mu\text{M}$. Sono visibili due picchi di eccitazione intorno ai 340 nm e 380 nm. Si nota come il picco a 340 nm cresce all'aumentare della concentrazione dello ione Ca^{2+} , mentre il picco a 380 nm decresce con l'aumento di concentrazione delle ione.

Immagine riprodotta da Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9th Edition.

Visto che i due punti a 340 e 380 nm variano in modo opposto, rispetto alla concentrazione di Ca^{2+} , si rende possibile un'analisi raziometrica: effettuando il rapporto tra l'emissione ottenuta eccitando alle due lunghezze d'onda, si ottiene una misura nella quale tutti gli aspetti aspecifici (non calcio-dipendenti) vengono minimizzati.

Le possibili problematiche legate all'uso di *Fura-2* sono essenzialmente due: il Ca^{2+} potrebbe modificare l'ambiente intracellulare, trattandosi di una sonda chelante, ma per l'esperimento si considera questo aspetto trascurabile; in secondo luogo, *Fura-2*, come molte sonde organiche, non è permeabile alla membrana plasmatica.

Al fine di introdurre la sonda all'interno delle cellule si aggiunge acetossimetilestere al mezzo di coltura (*Fura-2* AM).

Avendo a disposizione stock di *Fura-2* AM da 1mM, che devono essere sciolti in 1 ml di terreno di coltura, è necessario prelevare dallo stock 2 μ l in modo da ottenere la concentrazione ottimale (2 μ M *Fura-2* AM) per l'effettuazione dell'esperimento.

Contestualmente si prepara la soluzione per l'agonista; l'attivazione dei canali TRPM8 sarà indotta tramite WS12 (derivato dal mentolo), che mostra una robusta ed efficace attivazione dei canali di interesse. Avendo a disposizione stock di WS12 da 100 mM, da sciogliere in 1 ml di terreno di coltura, si prelevano dallo stock 25 μ l in modo che la concentrazione finale dell'agonsita sia di 500 nM.

Effettuata l'operazione di caricamento delle due piastre (PC3 e PC3M8) con *Fura-2* AM (2 μ M), è indispensabile un periodo di incubazione di 40-45 minuti; in questo tempo la sonda penetra nel citosol della cellula dove esterasi intracellulari liberano la specie *Fura-2*, che resta intrappolata all'interno essendo impermeabile. Questo processo rende disponibile, alla fine del periodo di incubazione, una quantità di sonda la cui fluorescenza è sensibile alla concentrazione di ioni calcio. Allo scadere del tempo si lava in soluzione fisiologica (tyrode standard) la piastra, in modo da eliminare nell'ambiente extracellulare la sonda che non è entrata nelle cellule.

Dopo aver montato il vetrino, riempito prima con PC3 e successivamente con PC3M8, sul supporto del microscopio si effettua l'esperimento per i due preparati.

Per misurare la concentrazione del Ca^{2+} intracellulare vengono utilizzate molecole fluorescenti (*Fura-2*) che, colpite da un raggio di luce di una certa lunghezza d'onda λ , riemettono con una λ maggiore. *Fura-2* viene eccitato sequenzialmente a 340 e 380 nm (raggi UV), ognuno per 500 ms, utilizzando una lampada a Xenon.

Per non produrre interferenza luminosa con la strumentazione è necessario che la stanza in cui viene svolta l'intera esperienza sia completamente buia. La luce bianca prodotta dalla lampada attraversa il monocromatore, che ha la funzione di selezionare le lunghezze d'onda di interesse. La luce, successivamente, entra nel microscopio mediante una fibra ottica ed incontra un filtro di eccitazione, non indispensabile dal momento che il fascio si presentava già monocromatico. Nel cammino del fascio è poi posizionato uno specchio di-

croico che ha lo scopo di impedire che la luce di eccitamento influenzi la luce di emissione. Questo, infatti, riflette la luce fino ad una certa λ e fa passare la luce con λ superiore (Figura 4.2).

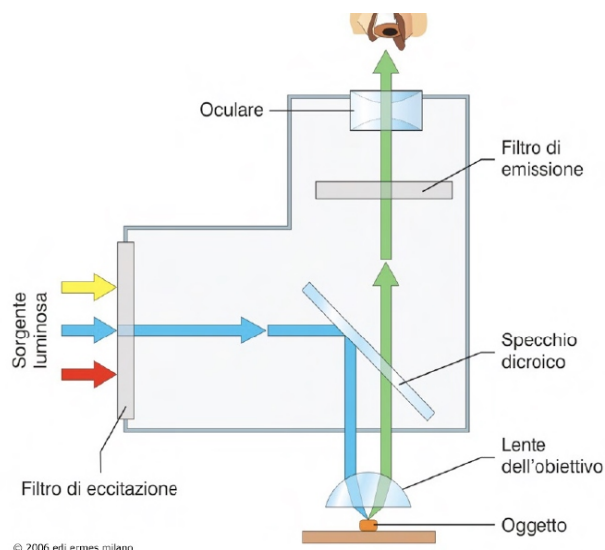


Figura 4.2: Schema del percorso ottico in un microscopio a fluorescenza. Il filtro di eccitazione lascia passare solo lunghezze d'onda comprese fra 450 e 490 nm; lo specchio dicroico riflette la luce sotto 510 nm ed è trasparente a quella superiore; il filtro di emissione esclude i segnali non di interesse. Immagine riprodotta da <https://digilander.libero.it/marcofranceschin/fluorescenza3.htm>

Legandosi al Ca^{2+} , *Fura-2* aumenta l'intensità della luce emessa quando viene eccitato a 340 nm, mentre ne diminuisce l'intensità quando viene eccitato a 380 nm. Il *Fura-2* emette intorno ai 500 nm e tutta la radiazione viene raccolta e condotta lungo il cammino ottico fino ad un filtro di emissione che ha la funzione passa banda, selezionando solo le lunghezze d'onda a 510 nm.

Il microscopio è direttamente collegato, tramite una telecamera, ad un computer sul quale è installato il programma *Metafluor*, che fornisce: un grafico con l'andamento del rapporto raziometrico dell'emissione in funzione del tempo, un file Excel con i valori di ratio tabulati e l'area del campo, selezionata tramite il microscopio.

Tramite il microscopio è possibile svolgere un'analisi qualitativa, quindi verificare che a tempi diversi si abbiano risposte differenti. Queste vengono visualizzate in una scala di colori che va dal blu al rosso, che indica un aumento drastico della concentrazione di ioni calcio. Dal punto di vista qualitativo, quindi, in presenza di un agonista le cellule si accendono e cambiano colore.

Il software permette, invece, un'analisi più quantitativa, mostrando le variazioni della fluorescenza, attraverso la misura del rapporto raziometrico. Dal momento che nel sistema di acquisizione ogni cellula nel campo è rappresentata da un colore differente è possibile seguirne la fluorescenza per ognuna.

Una volta montato il vetrino e illuminato il campione, con il metodo precedentemente descritto, si seleziona una parte del campo in cui si trovano un numero significativo di cellule. Tramite il software si seleziona l'area delle singole cellule e una superficie sul fondo che si utilizza come background e si svolge, quindi, una prima acquisizione. Successivamente si è aggiunto, per almeno 100 cicli (tempo minimo per avere una risposta), l'agonista WS12. Dopo la somministrazione, nelle cellule overesprimenti PC3M8 ci si aspetta una risposta, ovvero una variazione del rapporto raziometrico, che non si dovrebbe osservare nelle PC3.

Si raccolgono le emissioni a 340 e 380 nm ogni 3 secondi; si è impostato questo tempo di campionamento in quanto è proporzionale al tempo di raccolta del segnale. Dopo la somministrazione dell'agonista si studia il cambio di pendenza del grafico, sia per PC3 che per PC3M8, ponendo attenzione a eventuali "falsi picchi". Non sono da considerare quelle variazioni in cui tutte le cellule rispondono contemporaneamente, perchè dovute probabilmente a luce dell'ambiente che contamina la presa dati. Si sono escluse anche quelle variazioni che compaiono immediatamente dopo l'iniezione dell'agonista, perchè dovute a mecano-strech.

Le uniche differenze di pendenza rilevanti, dovute alle concentrazioni intracellulari di ioni calcio, sono quelle in cui risponde una sola cellula, il cui segnale è rappresentato da due curve con andamento opposto, dovuto alle due lunghezze d'onda d'eccitazione.

Tale cambiamento del valore di ratio avviene dopo un certo tempo dalla somministrazione, necessario affinché l'agonista reagisca con le cellule.

La seconda parte dell'esperienza viene svolta esclusivamente sulla piastra del-

le PC3-TRPM8, perchè si vuole studiare in una soluzione a zero calcio. Se viene tolto il calcio libero extracellulare non sarà più possibile l'ingresso dello ione dalla membrana cellulare; tuttavia potrebbe essere possibile rilevare il contributo di rilascio di questo dagli store intracellulari.

Diversi studi hanno dimostrato l'espressione di TRPM8 sia sulla membrana plasmatica che sul reticolo endoplasmatico in linee cellulari di cancro prostatico.

Quando il canale è localizzato sulla membrana plasmatica è maggiormente coinvolto nella proliferazione e migrazione del cancro a causa dell'attivazione di diversi pathways calcio dipendenti, mentre la localizzazione sul reticolo endoplasmatico si è mostrato essere implicata nel mantenimento dell'equilibrio tra apoptosi e proliferazione¹.

Risulta perciò di interesse indagare se TRPM8 si trovi anche sul reticolo endoplasmatico; ciò è facilmente verificabile osservando, in soluzione zero calcio, una risposta che indichi invece l'aumento della concentrazione intracellulare dello ione. Passati alla condizione in zero calcio la traccia scende. Quando il segnale si è stabilizzato viene introdotto l'agonista WS12. Da una prima analisi qualitativa dei segnali non è stata osservata alcuna risposta da nessuna delle cellule in esame. Tutto lo studio riguardante le variazioni di concentrazioni di Ca^{2+} nelle diverse cellule selezionate e le relative immagini ricavate dal software sono state esaminate in dettaglio nel capitolo successivo di analisi dati.

¹Referenza: Grolez GP., Gkika D. "TRPM8 Puts the Chill on Prostate Cancer" Pharmaceuticals 2016

Capitolo 5

Analisi dati

I dati raccolti rappresentano per ogni cellula il segnale relativo all'eccitazione a 340 nm e 380 nm e il rapporto raziometrico tra queste due quantità (ratio) in funzione del tempo.

5.0.1 Analisi di PC3 WT

Dopo aver individuato un'area del campione altamente popolata, sono state definite delle regioni intorno alle cellule e una regione su cui valutare il background. Nel campione di PC3 WT sotto esame sono state selezionate 14 cellule, come mostrato nella *Figura 5.1*.

Il valore di background, individuato nella regione rossa numero 1, è automaticamente sottratto dalle misure effettuate sulle cellule, in modo da eliminare le interferenze luminose derivanti dall'ambiente circostante. Di seguito si farà riferimento alle tracce da 2 a 15 mostrate in *Figura 5.1* come alle tracce delle cellule da 1 a 14. Ad esempio, la traccia 2 corrisponderà alla cellula 1.

In primo luogo per ogni cellula è stato rappresentato il rapporto tra le misure di fluorescenza relative all'eccitazione a 340 nm e a 380 nm , definito **ratio**, in funzione del tempo. Questo studio permette di effettuare un'analisi qualitativa sul comportamento della cellula prima e dopo l'inserimento dell'agonista. Durante la fase di acquisizione è stato possibile osservare in real-time, mediante il software *MetaFluor*, l'andamento del ratio in funzione del tempo per tutte le cellule selezionate. In *Figura 5.2* si riporta il grafico ottenuto in presa dati.

Date spesso dei
dettagli che sono
inutili

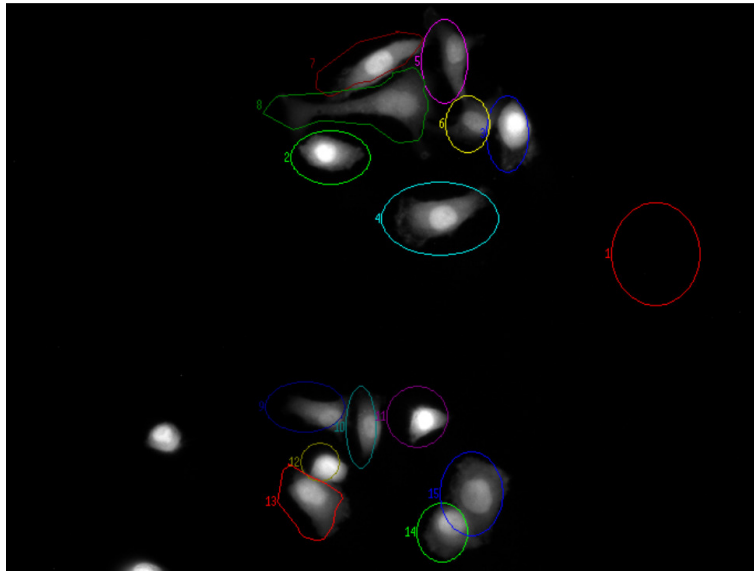


Figura 5.1: Individuazione delle cellule nel campione di PC3 WT con il software MetaFluor.

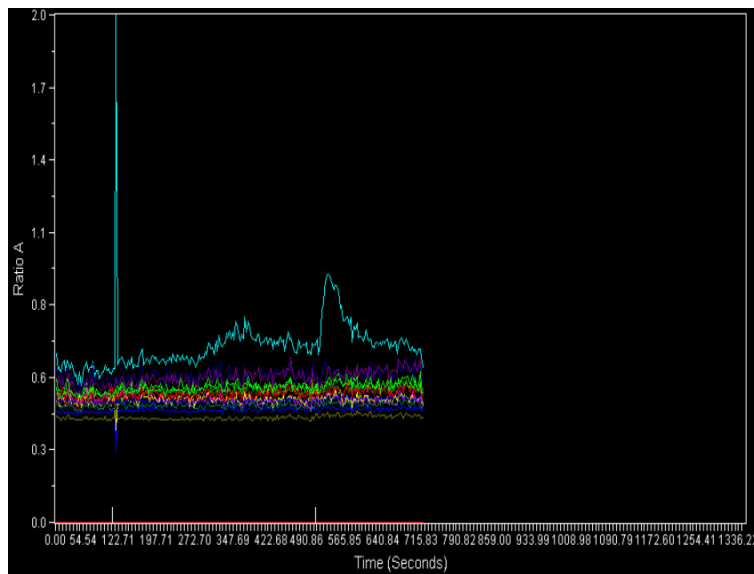


Figura 5.2: Ratio delle 14 cellule in funzione del tempo e ratio del fondo (in rosso). Immagine ricavata dal software MetaFluor.

D'ora in avanti si procederà utilizzando il programma Excel per l'elaborazione dei dati misurati in laboratorio. I grafici ottenuti durante l'analisi dei dati per le singole cellule sono in seguito riportati.

mancano le indicazioni sulla stimolazione

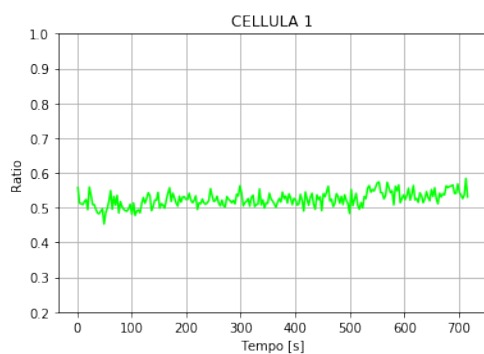


Figura 5.3

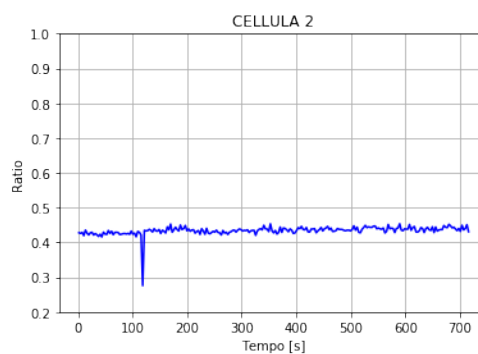


Figura 5.4

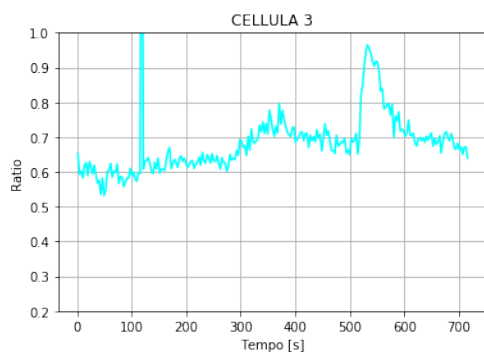


Figura 5.5

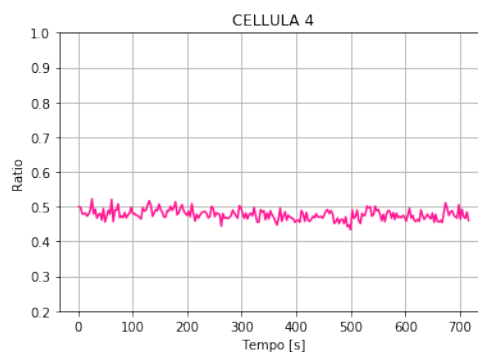


Figura 5.6

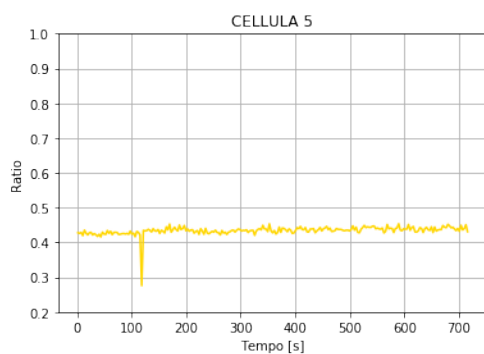


Figura 5.7

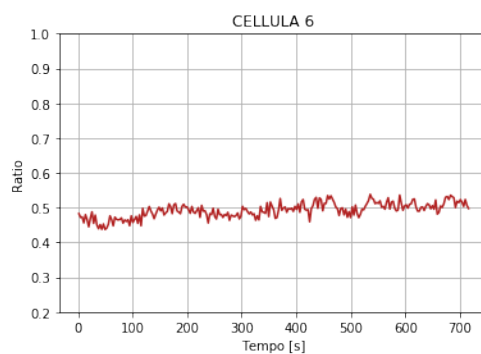


Figura 5.8

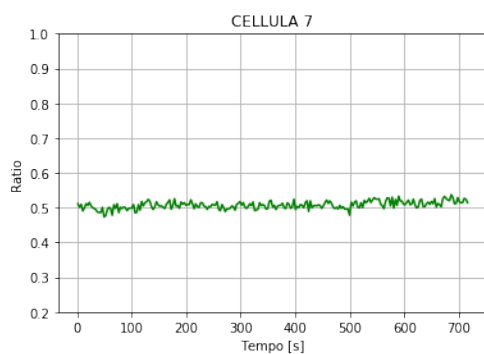


Figura 5.9

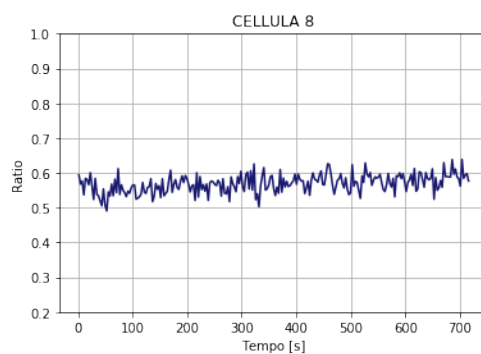


Figura 5.10

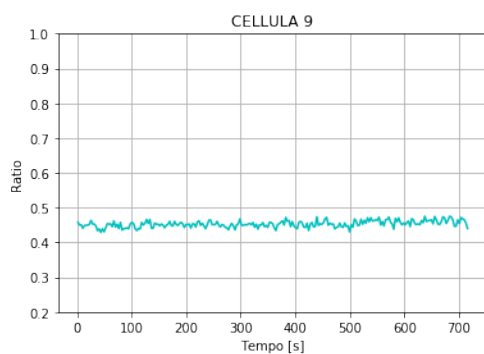


Figura 5.11

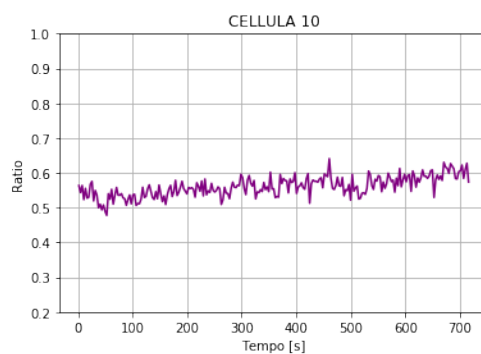


Figura 5.12

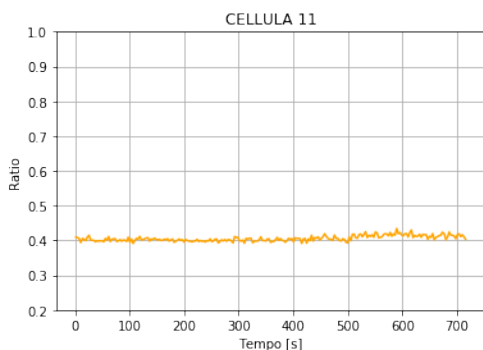


Figura 5.13

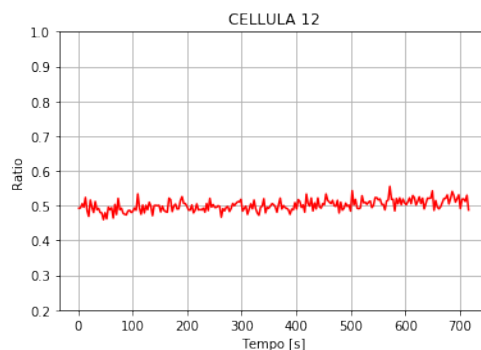


Figura 5.14

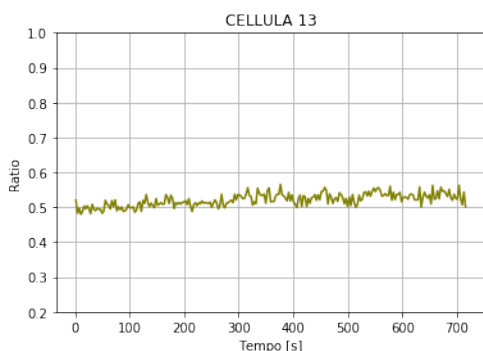


Figura 5.15

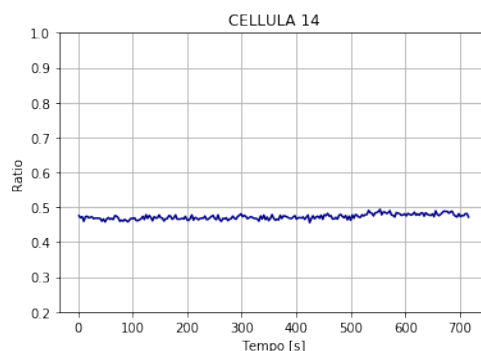


Figura 5.16

La cellula 10 (*Figura 5.12*) è stata esclusa dalle analisi successive poiché presenta un andamento anomalo. Il ratio di questa cellula, infatti, mostra un drift, ossia non rimane costante né suggerisce una risposta significativa.

Osservando le tracce delle singole cellule si possono notare dei forti scostamenti di durata temporale molto breve dalla traccia. Tali comportamenti sono il frutto di artefatti che si possono generare quando il campione viene perturbato, ad esempio nel momento in cui viene inserito l'agonista, come anticipato nel precedente capitolo.

La traccia della cellula 3 (*Figura 5.5*) presenta un importante artefatto. Per verificare che sia effettivamente un artefatto e non un segnale di calcio sono stati isolati i dati nell'intorno di questa regione e sono state visualizzate le tracce per le due lunghezze d'onda a 340 nm e 380 nm (*Figura 5.17*).

Come si evince da questa immagine, i due segnali crescono nell'intervallo temporale selezionato, confermando la presenza di un artefatto.

Veramente la traccia rossa non cresce...

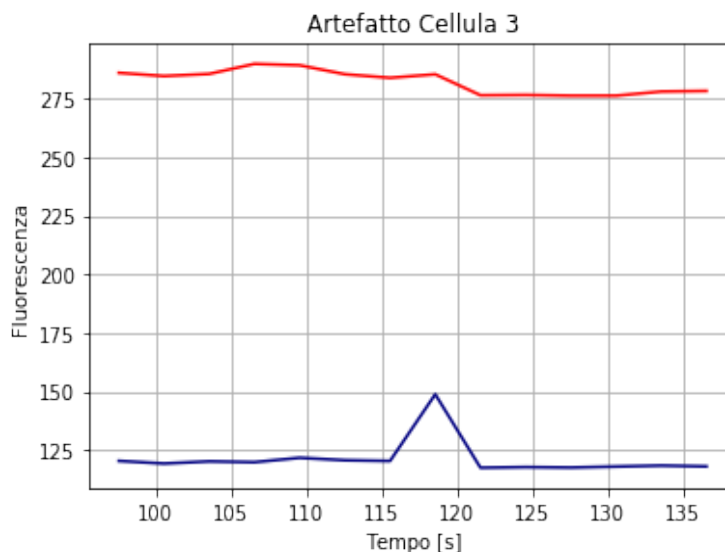


Figura 5.17: Studio dell'artefatto per le due lunghezze d'onda per la cellula 3; la traccia blu corrisponde ai dati relativi a 340 nm, mentre la traccia rossa corrisponde a quelli a 380 nm.

La prima analisi quantitativa riguarda l'individuazione della percentuale di cellule che in seguito a stimolazione con WS12 500nM rispondono. Tale analisi è stata effettuata studiando l'ampiezza del picco della risposta. Dal set di dati, per ogni cellula è stato calcolato il valore del **basale**, ovvero la media temporale dei valori del ratio prima dell'immissione dell'agonista. Sono stati eliminati i primi dati raccolti e i 10 immediatamente precedenti all'immissione dell'agonista al fine di evitare la formazione di artefatti. In questo studio sono stati utilizzati pertanto 22 valori. È stato poi calcolato il **massimo valore** assunto dal ratio tra i valori acquisiti in presenza di agonista. L'ampiezza del picco è stata successivamente valutata come:

$$Ampiezza = Max - Basale$$

I valori ottenuti sono riportati nella *Tabella 5.1*.

Tabella 5.1: Dati relativi alle cellule PC3WT. I valori della cellula 10 non sono stati riportati in quanto esclusa dalle analisi successive per il suo andamento anomalo, Figura 5.12.

#	<i>Massimo</i>	<i>Basale</i>	<i>Ampiezza picco</i>
1	0.563	0.507	0.055
2	0.454	0.425	0.028
3	0.797	0.591	0.207
4	0.514	0.483	0.031
5	0.515	0.466	0.049
6	0.535	0.459	0.076
7	0.526	0.496	0.030
8	0.626	0.549	0.077
9	0.474	0.447	0.026
10	/	/	/
11	0.419	0.402	0.017
12	0.543	0.487	0.055
13	0.566	0.500	0.066
14	0.482	0.468	0.015

Per valutare la risposta, l'ampiezza del picco delle cellule è stata comparata ad un valore arbitrario pari a 0.1. Osservando i dati di *Tabella 5.1* si può notare che soltanto la cellula 3 presenta un valore superiore alla soglia fissata. Pertanto, questa è l'unica cellula a rispondere sulle 13 cellule analizzate, fornendo una percentuale di risposta dell'8%.

Sui dati raccolti, successivamente, è stata eseguita un'analisi sull'ampiezza del picco della risposta mediata su tutte le cellule e sulle cellule che rispondono. Per ogni valore della traccia media è stato calcolato l'errore standard (SEM) come

$$SEM = \frac{Deviazione\ Standard}{\sqrt{N}} = \frac{\sqrt{\sum_{N=1}^{13} (R_N - \bar{R})^2}}{N} \quad (5.1)$$

dove R_N è il ratio della cellula N-esima, \bar{R} è il valor medio del ratio valutato in un preciso istante su tutte le cellule ed N il numero di cellule.

L'andamento della media in funzione del tempo è riportato in *Figura 5.18*.

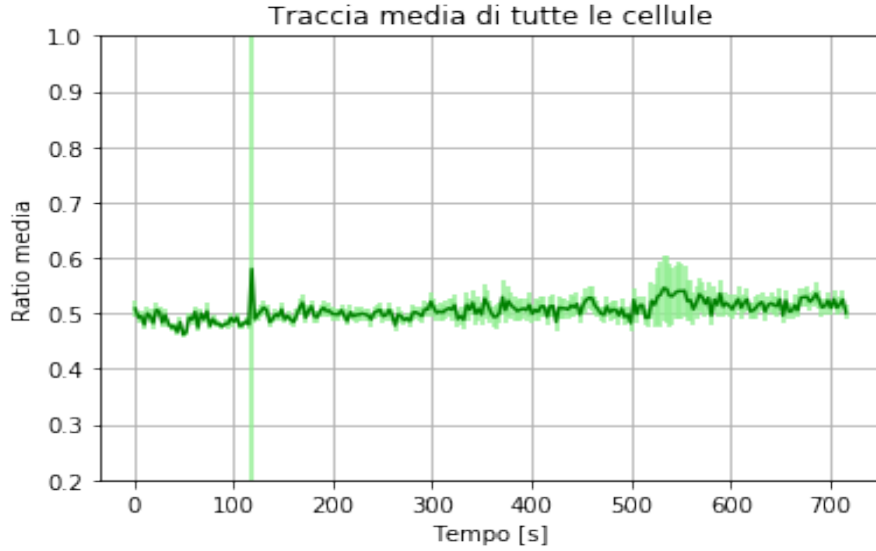


Figura 5.18: Andamento del ratio medio in funzione del tempo in verde scuro, in verde chiaro è riportato il SEM. Al tempo 112.6 s si nota un picco; questa anomalia è dovuta all'inserimento dell'agonista WS12 500 nM.

Anche per questa traccia è stata valutata l'ampiezza del picco con lo stesso metodo descritto precedentemente. Il valore ottenuto è:

$$Ampiezza = 0.043 \pm 0.111$$

dove l'errore è stato ottenuto tramite la propagazione degli errori.

Il medesimo studio della traccia media andrebbe eseguito anche sulle cellule che rispondono. In questo caso la cellula che presenta una risposta è solo la numero 3, pertanto il grafico sarà nuovamente la traccia riportata in *Figura 5.5*.

L'ultima analisi svolta sulle cellule PC3 WT riguarda lo studio dell'accordo tra la distribuzione delle ampiezze dei picchi, elencati in *Tabella 5.1*, delle 13

cellule con la distribuzione gaussiana. È stato utilizzato il test di *Shapiro-Wilk*¹ dal quale risulta che i dati non sono normalmente distribuiti con livello di significatività $p > 0.01$.

5.0.2 Analisi di PC3-TRPM8

Come effettuato in precedenza per le cellule PC3 WT, si è inizialmente individuata un'area del campione altamente popolata e, successivamente, si sono definite delle regioni intorno alle cellule ed una regione particolarmente buia su cui valutare il background. Nel campione di PC3-TRPM8 utilizzato sono state selezionate 16 cellule, come mostrato nella *Figura 5.19*.

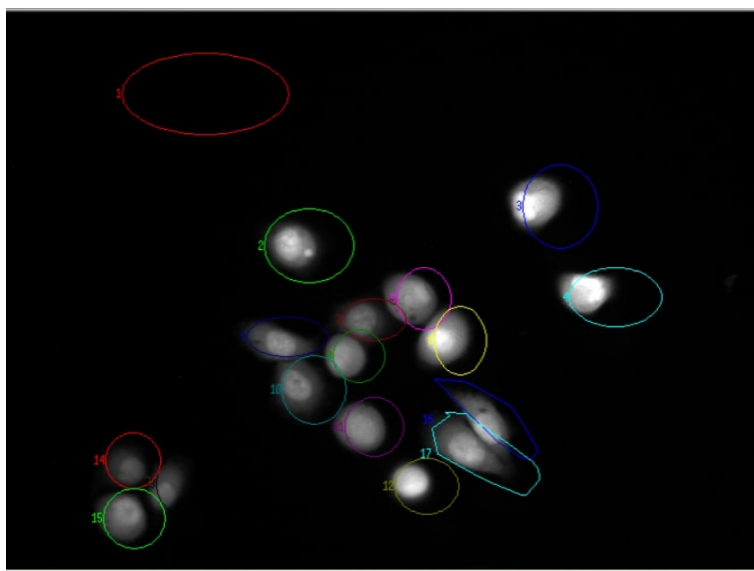


Figura 5.19: Individuazione delle cellule nel campione di PC3-TRPM8 con il software MetaFluor.

Il valore di background, individuato nella regione rossa numero 1, è automaticamente sottratto dalle misure effettuate sulle cellule esattamente come nel caso precedente, cosicché le interferenze luminose derivanti dall'ambiente circostante possano essere eliminate. Di seguito si farà riferimento alle tracce da 2 a 17 mostrate in *Figura 5.19* ed esse corrisponderanno alle rispettive regioni (da 2 a 17).

¹Web-version: <http://sdittami.altervista.org/shapirotest/ShapiroTest.html>

Nuovamente, per ogni cellula è stato rilevato il rapporto tra le misure di fluorescenza relative all'eccitazione a 340nm e a 380nm, definito **ratio**, in funzione del tempo. Durante lo studio di queste cellule è stata inserita, intorno a $t = 560s$, la soluzione 0Ca ed in seguito è stato inserito l'agonista come nel caso classico.

Durante la fase di acquisizione, con il software *MetaFluor*, è stato osservato anche in questo caso l'andamento in real-time del ratio per tutte le cellule selezionate. In *Figura 5.20* si riporta il grafico ottenuto durante la presa dati.

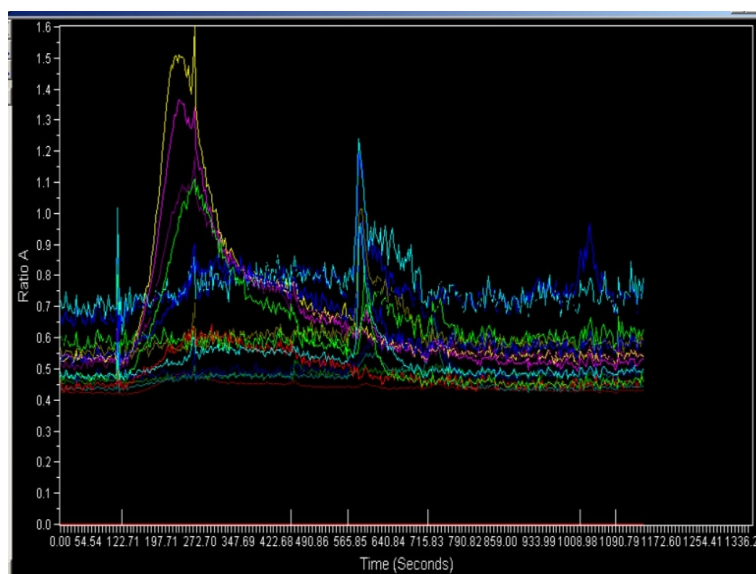


Figura 5.20: Ratio delle 16 cellule in funzione del tempo e ratio del fondo (in rosso) considerando le cellule PC3-TRPM8. Immagine ricavata dal software MetaFluor.

Si procede rappresentando per ogni singola cellula il ratio in funzione del tempo in secondi. Di seguito, si riportano i grafici ottenuti.

mancano le indicazioni sulla somministrazione dell'agonista

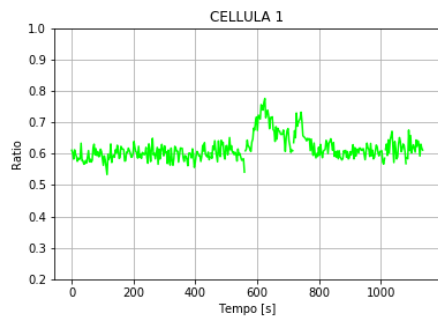


Figura 5.21

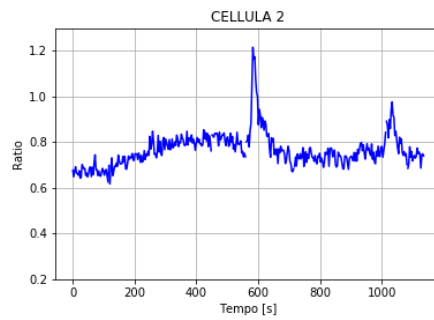


Figura 5.22

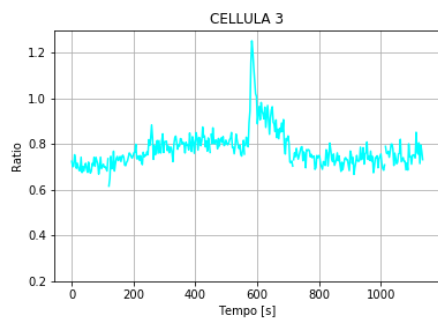


Figura 5.23

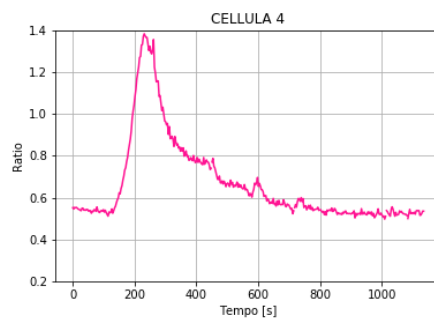


Figura 5.24

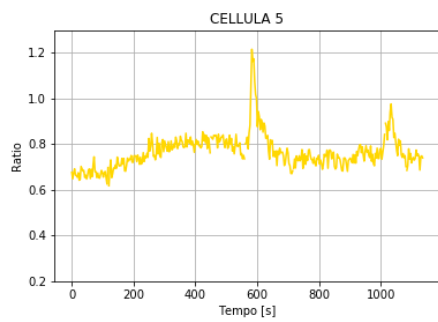


Figura 5.25

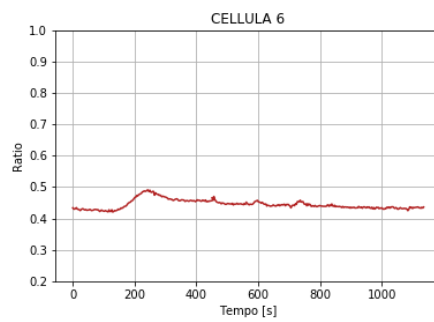


Figura 5.26

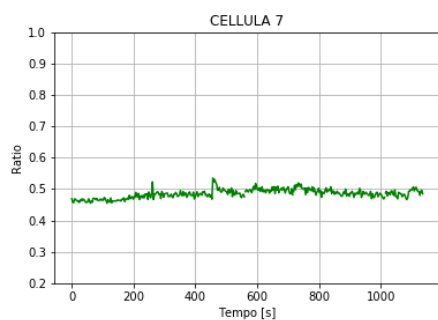


Figura 5.27

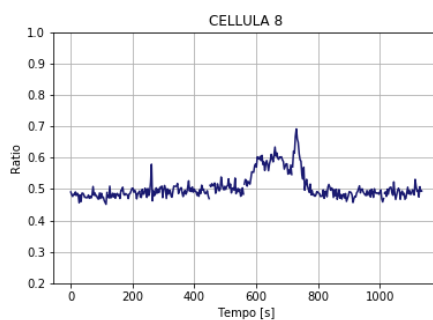


Figura 5.28

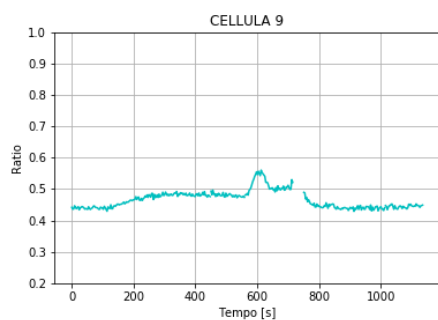


Figura 5.29

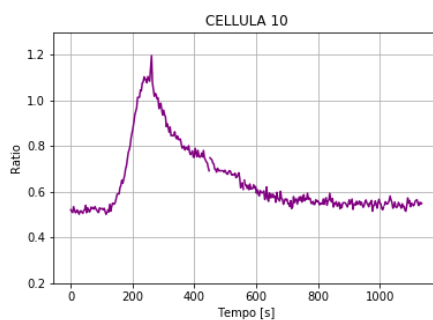


Figura 5.30

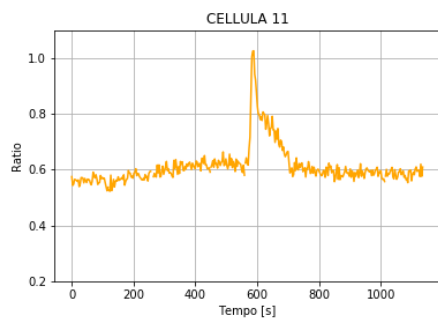


Figura 5.31

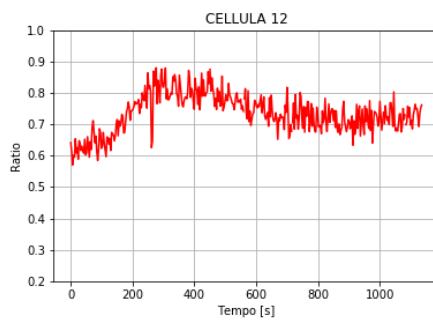


Figura 5.32

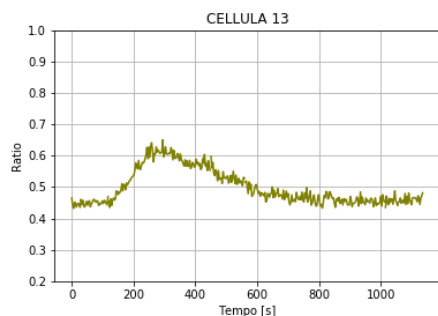


Figura 5.33

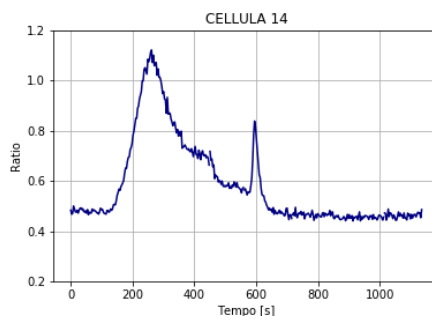


Figura 5.34

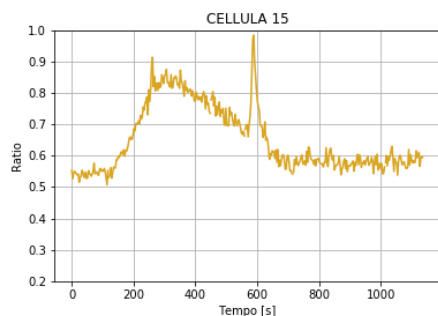


Figura 5.35

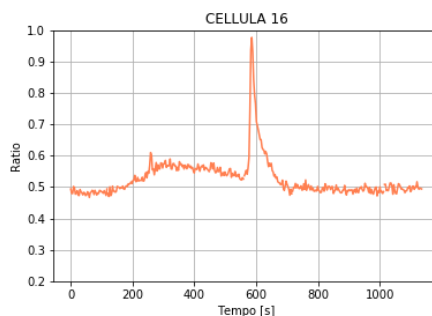


Figura 5.36

La prima fase di analisi quantitativa riguarda l'individuazione della percentuale di cellule che se stimolate con WS12 (500nM) rispondono. Tale analisi si è effettuata studiando l'ampiezza del picco della risposta, esattamente come nel caso precedente durante lo studio delle cellule PC3 WT.

Dal set di dati per ogni cellula si è quindi calcolato il valore del **basale** (in questo studio, in particolare, sono stati utilizzati i 10 valori incontrati prima dei 10 immediatamente precedenti all'inserimento dell'agonista) e, successivamente, il **massimo** valore assunto dal ratio in presenza dell'agonista.

$$Ampiezza = Max - Basale$$

I valori ottenuti sono riportati in *Tabella 5.2*.

Tabella 5.2: Dati relativi alle cellule PC3-TRPM8 in soluzione con calcio.

#	<i>Massimo</i>	<i>Basale</i>	<i>Ampiezza picco</i>
2	0.649	0.599	0.050
3	0.855	0.680	0.175
4	0.885	0.708	0.177
5	1.382	0.536	0.845
6	1.616	0.540	1.076
7	0.491	0.427	0.064
8	0.523	0.465	0.058
9	0.579	0.480	0.099
10	0.492	0.441	0.052
11	1.197	0.524	0.672
12	0.650	0.564	0.086
13	0.880	0.644	0.236
14	0.650	0.452	0.199
15	1.121	0.478	0.643
16	0.913	0.546	0.367
17	0.610	0.482	0.128

Inizialmente, si è condotta l'analisi assumendo come soglia di ampiezza del picco necessaria per considerare una risposta il valore di 0.05, ma si è notato come in realtà alcune delle risposte considerate tali fossero dovute ad artefatti.

Per escludere la presenza di un segnale di calcio e verificare la presenza di un artefatto, sono stati isolati i dati nell'intorno di questa regione e sono state visualizzate le tracce per le due lunghezze d'onda a 340 nm e 380 nm. Osservando contemporaneamente le tracce relative alle due lunghezze d'onda, è stato possibile constatare la presenza di artefatti. Questi ultimi, infatti, sono presenti se le due tracce hanno un andamento concorde.

Si è pertanto scelto di posizionare la soglia per l'ampiezza del picco ad un valore di 0.1, al fine di evitare di ricadere nella situazione descritta precedentemente. Si nota una risposta delle cellule PC3-TRPM8 maggiore rispetto a quella delle cellule PC3 WT, in quanto le prime presentano 10 cellule responsive su un totale di 16. Dunque, la percentuale di risposta è:

$$\text{Percentuale risposta} = 63\%$$

In seguito, dato che intorno al tempo $t = 560s$ è stata inserita la soluzione priva di calcio, è stata ripetuta l'analisi andando a scegliere il livello basale come media dei valori prima dell'inserimento dell'agonista. È stato nuovamente scelto di scartare i 10 valori immediatamente precedenti all'aggiunta di WS12 per evitare la presenza di possibili artefatti, andando così a selezionare i 10 valori antecedenti ad essi, come già effettuato con le cellule PC3-TRPM8 in presenza di calcio.

Di seguito si riporta la *Tabella 5.3* con i valori ottenuti.

Tabella 5.3: Dati relativi alle cellule PC3-TRPM8 in soluzione a zero-calcio.

#	<i>Massimo</i>	<i>Basale</i>	<i>Ampiezza picco</i>
2	0.732	0.666	0.066
3	0.843	0.757	0.086
4	0.810	0.866	-0.056
5	0.600	0.573	0.027
6	0.581	0.579	0.002
7	0.458	0.443	0.015
8	0.520	0.499	0.021
9	0.691	0.605	0.086
10	0.490	0.501	-0.012
11	0.594	0.575	0.019
12	0.642	0.702	-0.060
13	0.801	0.713	0.088
14	0.499	0.477	0.022
15	0.495	0.474	0.021
16	0.628	0.592	0.036
17	0.523	0.522	0.001

Per la seconda parte dell'analisi quantitativa, cioè quella relativa all'utilizzo delle cellule PC3-TRPM8 in 0Ca, si nota una brusca diminuzione del numero di risposte. In realtà, utilizzando come soglia nuovamente 0.1, si giunge alla conclusione che nessuna cellula è responsiva in seguito all'inserimento dell'agonista, in particolare 0 delle 16 cellule risponde, dunque:

$$Percentuale\ risposta\ 0Ca = 0\%$$

In questo caso, infatti, lo ione Ca^{2+} non è presente in soluzione e, pertanto, il segnale può essere dato soltanto da quello che si trova nel reticolo endoplasmatico (usato come store) nella misura in cui anche su di esso siano espressi canali TRPM8.

Come già fatto per le cellule PC3 WT, è stato scelto di eseguire un'analisi sull'ampiezza del picco della risposta sia mediata su tutte le cellule che sulle sole cellule responsive. Ovviamente, in questa seconda analisi sono state considerate le cellule responsive con calcio, in quanto nessuna delle cellule presenti nella soluzione 0 Ca ha risposto.

Inoltre, per ogni valore della traccia media è stato calcolato l'errore standard (SEM) utilizzando la relazione già vista precedentemente (*Equazione 5.1*).

L'andamento della media nel tempo con il relativo errore è riportato in *Figura 5.37*. Qui sono distinguibili i drift della traccia in corrispondenza degli istanti in cui è stato inserito l'agonista WS12 nella soluzione con calcio (120 secondi) o in quella a zero calcio (717 secondi).

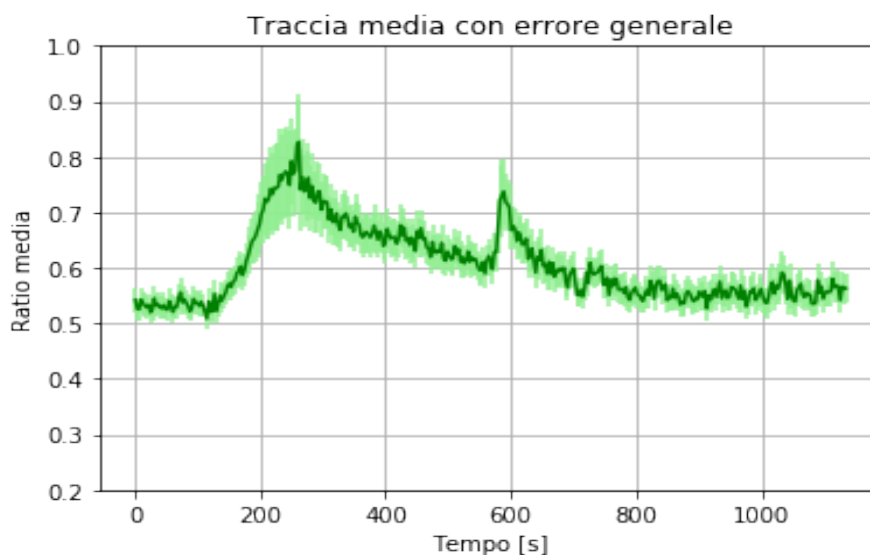


Figura 5.37: Andamento del ratio medio in funzione del tempo (traccia verde scuro) con le barre d'errore pari al SEM (verde chiaro). Le ampiezze indicate sono relative sia alle cellule in soluzione con Ca che a quelle in soluzione 0Ca.

Anche per questa traccia si è valutata l'ampiezza del picco utilizzando lo stesso metodo descritto precedentemente:

$$Ampiezza = 0.3 \pm 0.1$$

dove l'errore è stato ottenuto tramite la propagazione degli errori. Una medesima analisi della traccia media si è effettuata sulle cellule responsive PC3-TRPM8 in presenza dello ione Ca^{2+} . L'andamento della media nel tempo con il relativo errore si riporta di seguito in *Figura 5.38*.

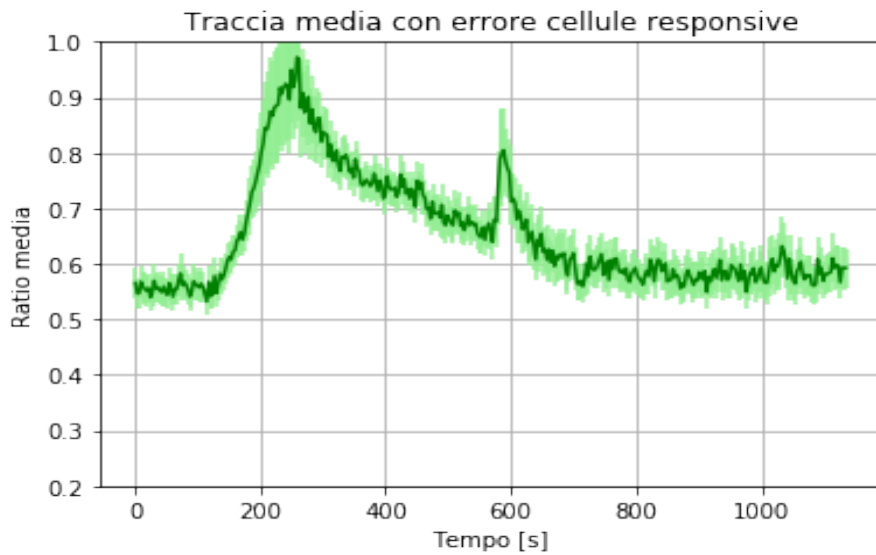


Figura 5.38: Andamento del ratio medio dell'ampiezza delle cellule responsive in funzione del tempo (traccia verde scuro) con le barre d'errore che indicano il SEM (verde chiaro).

Per questa traccia è stata valutata nuovamente l'ampiezza del picco, utilizzando lo stesso metodo descritto precedentemente:

$$Ampiezza = 0.4 \pm 0.1$$

dove, anche in questo caso, l'errore è stato ottenuto tramite la propagazione degli errori.

L'ultima analisi svolta sulle cellule di PC3-TRPM8 riguarda lo studio dell'accordo tra la distribuzione delle ampiezze dei picchi delle 16 cellule in soluzione con calcio, elencati in *Tabella 5.2*, con la distribuzione gaussiana.

È stato utilizzato il test di *Shapiro-Wilk*² dal quale risulta che i dati non sono normalmente distribuiti con livello di significatività $p > 0.01$, come nel caso delle cellule PC3 WT. Invece, per quanto riguarda le cellule PC3-TRPM8 in soluzione a zero-calcio, le cui ampiezze dei picchi sono elencate in *Tabella* 5.3, il test fornisce una compatibilità con la distribuzione gaussiana con livello di significatività $p < 0.10$.

²Web-version: <http://sdittami.altervista.org/shapirotest/ShapiroTest.html>

Capitolo 6

Conclusioni

È stato svolto uno studio di valutazione della differenza di segnale di Ca^{2+} tra cellule PC3 wild type e PC3 con overespressione di TRPM8 e di verifica della presenza del canale di interesse nel reticolo endoplasmatico, tramite esperimenti in soluzione zero calcio extracellulare.

Tramite l'analisi dati delle cellule PC3 wild type è stato osservato che su 13 cellule analizzate solamente una risponde in seguito a stimolazione con WS12 500nM (percentuale di risposta pari a 8%). Con lo studio della traccia media su tutte le cellule analizzate (*Figura 5.18*) è stato ottenuto un valore di ampiezza del picco pari a 0.043 ± 0.111 , dove l'errore è stato calcolato con la propagazione degli errori. La traccia media relativa alle cellule PC3 che rispondono in seguito a stimolazione, invece, è rappresentata dalla traccia della cellula 3 (*Figura 5.5*), poiché è l'unica a rispondere, e l'ampiezza del picco è pari a 0.207.

È stato infine notato con il test di *Shapiro-Wilk* che la distribuzione delle ampiezze dei picchi delle 13 cellule PC3 non segue un andamento normale (livello di significatività $p > 0.01$).

L'analisi delle cellule PC3-TRPM8 ha invece prodotto i seguenti risultati: per le cellule in soluzione con calcio, su 16 cellule analizzate 10 hanno risposto a stimolazione con WS12 500nM (percentuale di risposta pari a 63%), per le cellule in soluzione priva di calcio, 0 cellule su 16 hanno risposto alla stimolazione. Lo studio della traccia media su tutte le cellule analizzate in soluzione con calcio e a zero calcio insieme (*Figura 5.37*) ha consentito di ricavare un valore di ampiezza del picco pari a 0.3 ± 0.1 , mentre lo studio

della traccia media solo sulle cellule responsive in soluzione con calcio (*Figura 5.38*) ha come valore di ampiezza 0.4 ± 0.1 .

Come per le PC3, le ampiezze dei picchi delle cellule PC3-TRPM8 in soluzione con calcio non seguono una distribuzione gaussiana (livello di significatività $p > 0.01$), mentre le ampiezze dei picchi delle cellule in soluzione zero-calcio sono compatibili con la distribuzione gaussiana (livello di significatività $p < 0.1$).

In conclusione, sono stati ottenuti i valori di ampiezza media di risposta per le differenti tipologie cellulari prese in esame. Tali valori sono riportati in *Figura 6.1*.

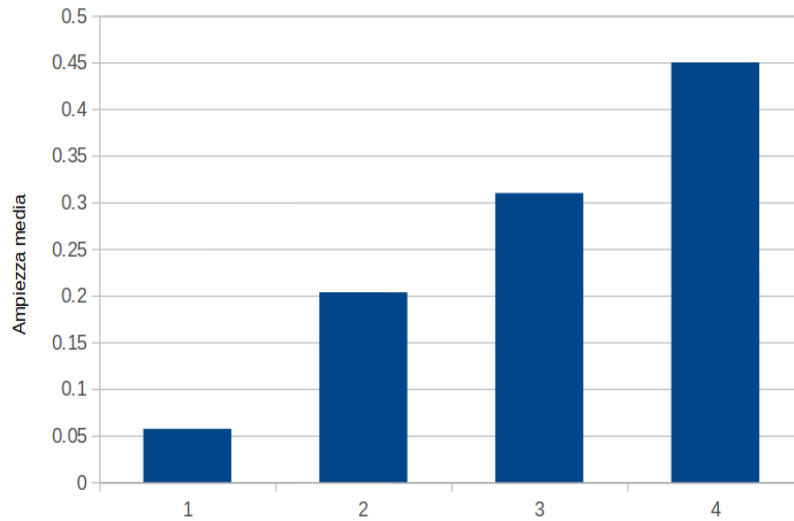


Figura 6.1: Grafico ampiezze medie in funzione delle tipologie cellulari. Colonna 1: media delle ampiezze di tutte le cellule PC3 WT analizzate (*Tabella 5.1*); colonna 2: media delle ampiezze delle cellule PC3 WT che hanno risposto; colonna 3: media delle ampiezze di tutte le cellule PC3-TRPM8 analizzate in soluzione con calcio (*Tabella 5.2*); colonna 4: media delle ampiezze delle cellule PC3-TRPM8 che hanno risposto in soluzione con calcio.

Poiché le popolazioni PC3 e PC3-TRPM8 in soluzione con calcio non sono distribuite normalmente, come dimostrato nel Capitolo 5 utilizzando il test di *Shapiro-Wilk*, è stato utilizzato un test non parametrico per confrontare

la popolazione di colonna 1 con la popolazione di colonna 3 e la popolazione di colonna 2 con la popolazione di colonna 4 della *Figura 6.1*.

Nello specifico è stato utilizzato il test di *Mann-Whitney*¹, dal quale risulta che, per quanto riguarda l'ampiezza della fluorescenza:

- le popolazioni 1-3 sono compatibili con un livello di significatività dell'1% ($U = 28 < 45$) e del 5% ($U = 28 < 59$);
- le popolazioni 2-4 non sono compatibili con un livello di significatività del 5% ($U = 20 > 8$).

È pertanto possibile affermare che le cellule responsive PC3-TRPM8 presentano in media un'ampiezza del picco di fluorescenza maggiore rispetto a quella delle cellule PC3WT.

Sulla base delle analisi condotte, risulta dimostrato che la presenza di canali transmembrana TRPM8 incrementi in modo significativo la concentrazione di Ca^{2+} nell'ambiente intracellulare.

¹Web-version: <https://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/Default2.aspx>