



Biofisica Molecolare E Cellulare - Relazione di Laboratorio

Università degli Studi di Torino - Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi
Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali anno 2018/2019

MISURE DEL Ca^{2+} INTRACELLULARE PER LO STUDIO DELLE PRORIETÀ DEL CANALE TRPM8

Gruppo B

Avalle A., Capone G., Cavagnero G., Concu A., Gallo C., Grilli F., Ornati E., Sibella L., Turella S., Zaino F.

Prof. Fiorio Alessandra Pla

SOMMARIO

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| Introduzione..... | 3 |
| Materiali e metodi | 4 |
| 1) Linea cellulare utilizzata..... | 4 |
| 2) Colture cellulari | 4 |
| 3) pH-metro | 5 |
| 4) Imaging del Ca^{2+} | 5 |
| 5) Set-up fluorescenza | 5 |
| Giorno 1 | 6 |
| Giorno 2 | 7 |
| Giorno 3 | 9 |
| Giorno 4 | 11 |
| Analisi statistica | 16 |
| Discussione | 18 |

Introduzione

Lo scopo della seguente esercitazione è misurare le concentrazioni di Ca^{2+} intracellulare in modo da poter studiare le proprietà del canale TRPM8 nella linea cellulare PC3.

I canali TRPM8 (Transient Receptor Potential Channel) sono proteine integrali di membrana, altamente conservate (dalla Drosophila all'Uomo), in particolare sono canali cationici scarsamente selettivi trascritti da 28 geni. La superfamiglia dei canali TRP si suddivide in sette sottofamiglie, alcune delle quali sono TRPML, TRPC, TRPV.

Tali canali sono generalmente implicati nei cinque sensi e attivati da differenti stimoli ad essi correlati (il primo canale TRP clonato è stato quello coinvolto nel sistema visivo). Alcuni, come TRP1 e TRPM8 sono termocettori sensibili alla temperatura o a molecole naturali che ne mimano l'effetto: il primo è sensibile alle alte temperature e attivato dal principio attivo capsicina presente nel peperoncino, mentre il secondo è sensibile a basse temperature e al mentolo. Inoltre, i canali TRP vengono spesso attivati da molecole naturali come la cannella oppure il mostard oil.

Oltre alla funzione primaria legata ai cinque sensi, tali canali sono stati messi in relazione con la progressione tumorale, infatti TRPM1 è stato clonato per la prima volta nei melanomi, mentre TRPM8 in cellule di cancro alla prostata.

utilizzati? Meglio investigati, studiati....

In questa esercitazione sono stati utilizzati i canali TRPM8.

Come accennato precedentemente, questi recettori per il freddo sono attivati da temperature tra 18°C e 21°C (freddo non pungente), da sostanze naturali che mimano il freddo come il mentolo e l'eucalipto o da sostanze sintetiche (WS12, icilina). A livello della prostata sono attivati da molecole endogene (PSA – prostat specific antigen).

Questi canali, che sono stati spesso studiati attraverso la tecnica del patch clamp in configurazione WHOLE CELL (in cui si misura la corrente da tutta la cellula), conducono meno in entrata che in uscita, hanno potenziale di inversione di circa 0 e questo fornisce una buona indicazione sul fatto che siano canali a corrente scarsamente selettiva.

Oltre allo studio tramite elettrofisiologia si può misurare l'attività del canale TRPM8 attraverso l'imaging del Ca^{2+} , così come è stato fatto in questa esercitazione: le cellule vengono monitorate tramite sonde fluorescenti e, applicando un agonista per attivare i canali TRPM8 (in questo caso WS12), si può osservare un aumento della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare ed un conseguente aumento della ratio delle lunghezze d'onda (λ) a 340nm a 380nm. A questo punto è possibile, mediante un'analisi qualitativa, seguire la fluorescenza delle singole cellule perché in tempi differenti si osservano differenti risposte:

→ situazione iniziale: cellule blu = minore concentrazione di Ca^{2+} ;

→ dopo l'aggiunta di un agonista: cellule rosse = maggiore fluorescenza delle cellule e quindi maggiore concentrazione di Ca^{2+} intracellulare.

Infine, tramite un'analisi quantitativa si misura nuovamente la variazione di fluorescenza attraverso un rapporto raziometrico, valutando l'eccitazione a due diverse λ (340nm e 380nm).

Lo studio dei canali TRPM8 è interessante in quanto coinvolti nella progressione del carcinoma prostatico (PC3). In particolare, in questo caso, si osserva una duplice azione del canale: nelle prime fasi, quando il tumore è in situ, si ha una maggiore espressione di TRPM8 nelle cellule del carcinoma prostatico. Nel momento in cui il tumore perde dipendenza dagli androgeni, diventando quindi metastatico, si osserva però una riduzione drastica nell'espressione del canale (inizio di un'attività migratoria elevata delle cellule + perdita degli androgen receptors = downregolazione del canale). Di conseguenza, un'over-espressione del canale comporta una minore migrazione cellulare e una ridotta metastatizzazione, attribuendo ad esso una funzione protettiva nei confronti dello sviluppo

di un processo metastatico.

Materiali e Metodi

- 1) Linea cellulare utilizzata: il preparato sperimentale utilizzato è la linea cellulare PC3 (linea cellulare commerciale derivante da adenocarcinoma prostatico metastatico in osso).

Sono stati utilizzati due modelli:

- Wild Type (WT) – in cui fisiologicamente non è presente l'espressione del canale TRPM8
- PCRM8 – linea cellulare stabilmente trasfettata con il canale, presenta dunque una over-espressione di TRPM8

A livello teorico nel momento in cui si andrà a stimolare le linee cellulari mediante un agonista esse risponderanno in maniera differente: le cellule WT non risponderanno alla stimolazione dell'agonista dato che non è presente il canale interessato, mentre le cellule trasfettate avranno un aumento dell'attività del canale e si potrà osservare una differente concentrazione di Ca^{2+} intracellulare.

- 2) Culture cellulari: L'utilizzo di culture cellulari comporta sia vantaggi che svantaggi.

- VANTAGGI – mediante modelli in vitro le cellule sono più facilmente coltivabili, manipolabili ed è maggiormente possibile controllare l'ambiente extracellulare (pH, temperatura, etc.), si ottiene in tale modo una semplificazione estrema del sistema cellulare rispetto ai modelli in vivo. Inoltre, le colture cellulari sono commercialmente disponibili, meno costose e hanno una maggiore rapidità di risposta.
- SVANTAGGI – la semplificazione del sistema cellulare talvolta può essere estrema e si perdono caratteristiche fisiologiche dell'organismo in toto, inoltre le condizioni delle cellule in vivo sono filtrate da effetti fisiologici dati dall'ambiente circostante come la microcircolazione, la filtrazione tissutale, etc. Situazioni che nelle linee cellulari in vitro non sono presenti.

Le cellule eucariotiche da noi utilizzate vengono coltivate adese ad un substrato, tuttavia esistono anche coltivazioni cellulari in sospensione.

Nel nostro caso le cellule sono mantenute in terreni di coltura in condizioni altamente controllate: pH costante mediante l'uso di tamponi, osmoliti e temperatura di circa 37°C costante.

Le cellule sono mantenute in incubatore adese in piastre petri con una fase gassosa costituita dal 95% di O_2 e 5% di CO_2 .

Il terreno utilizzato (RPMI) contiene glucosio, aminoacidi (come la glutammina), sali minerali e fattori di crescita che stimolano la proliferazione (presenti nel siero), antibiotici come la streptomycin o l'ampicillina in modo da evitare contaminazioni in coltura. Il terreno è conservato in frigorifero a 4°C fino all'utilizzo.

Il pH del mezzo di coltura è costante a valori di circa 7,2/7,4, per mantenerlo tale sono stati usati tamponi contenenti anidrasi carbonica (enzima che mantiene un corretto bilanciamento tra acidi e basi) e bicarbonato di sodio (NaHCO_3 il quale mantiene un pH costante diminuendo l'acidità). Per la crescita cellulare è infine necessaria una soluzione extracellulare con una composizione classica di sali (Ca^{2+} 2mM, rapporto $\text{Na}^+/\text{K}^+ > 1$).

Nel momento in cui le cellule arrivano ad uno stato di confluenza si instaurano tra loro delle inibizioni da contatto e la crescita si interrompe; per mantenere la coltura si devono dividere

le cellule in ulteriori piastre e per farlo si utilizzano enzimi proteolitici (tripsina) che tagliano le giunzioni cellulari dal substrato. Le colture cellulari devono essere maneggiate in condizioni di sterilità, quindi sotto cappa biologica ed utilizzando sempre i guanti e strumentazione sterile. Una volta in sospensione le cellule vengono contate e seminate in fiaschette; per la conta cellulare si utilizzano camere di Burker.

- 3) pH-metro: il pH-metro è uno strumento molto delicato composto da una sonda, generalmente di vetro, che misura una differenza di potenziale ai due lati dell'elettrodo presente nella sonda e che deve essere totalmente immersa nella soluzione da piacciare, la sonda va poi pulita accuratamente dopo l'utilizzo. È poi presente un misuratore elettrico collegato ad un display che fornisce il risultato della misurazione. Lo strumento va poi calibrato mediante l'utilizzo di diverse soluzioni a pH noto. Prima di procedere all'aggiunta goccia-goccia dell'acido o della base forte utilizzati per spostare il pH della soluzione è necessario misurare il pH iniziale della suddetta soluzione ed attendere un paio di minuti finché il valore che appare sul display non si sia completamente stabilizzato.
- 4) Imaging del Ca^{2+} : si utilizza una sonda raziometrica (FURA-2); si verifica il rapporto di emissione eccitando a due lunghezze d'onda (340nm e 380nm), in questo modo si ottiene il valore assoluto di ratio eliminando elementi di background (elimino problemi di scorretto caricamento delle sonde in cui si osserverebbe più fluorescenza/ aumento di concentrazione, con il rapporto l'aumento si ripartisce sulle due λ). I picchi di eccitazione osservati sono a 340nm ($> [Ca^{2+}] > \text{area del picco}$) e 380nm ($> [Ca^{2+}] > \text{area del picco}$), l'emissione si osserva a 510nm.
- 5) Set-up fluorescenza: la sonda fluorescente utilizzata è FURA2-AM la quale ha uno spettro di eccitazione nell'UV con due picchi a diverse lunghezze d'onda (λ): 340nm e 380nm. Per fare in modo che la sonda venga eccitata si utilizza un microscopio a fluorescenza che ha le seguenti componenti: lampada, monocromatore, oculari e detector. La lampada eccita negli UV, in tal caso è stata utilizzata una lampada allo xeno il cui spettro di emissione è costante e corrisponde allo spettro del rosso. Le lampade odierne utilizzano diodi o mercurio, ma non sono adatte ad eccitare negli UV. La luce emessa in tal caso dalla lampada è bianca perché emette a tutte le lunghezze d'onda, essa viene diretta in un monocromatore necessario per selezionare la luce monocromatica. Il monocromatore è regolato da un software che ruota diversi specchi per dare determinati angoli e selezionare una λ specifica. La luce, che da bianca è diventata monocromatica, esce da una fibra ottica ed entra in un microscopio invertito dove una serie di lenti e specchi la riflettono.

I filtri presenti sono 3:

1. FILTRO DI ECCITAZIONE
2. FILTRO DICROICO – posizionato con un angolo di 45°
3. FILTRO DI EMISSIONE

In questo caso avendo una luce monocromatica già presente, il filtro di eccitazione non è necessario. La luce incontra direttamente il filtro dicroico che fa passare solamente un determinato range di λ e riflette tutte le altre.

Lo spettro di assorbimento della sonda è caratterizzato da un grafico che sull'asse delle Y ha

i valori della trasmittanza e sull'asse delle X ha le diverse lunghezze d'onda.

Nel caso in cui la trasmittanza fosse uguale a 0, la riflessione sarebbe totale. Nel range da 340nm a 380nm (λ a cui la sonda assorbe/è eccitata), la trasmittanza è uguale a 0 quindi tutta la luce viene riflessa ad un obiettivo che è anche un condensatore. Quest'ultimo condensa la luce sul campione il quale contiene la sonda che viene eccitata.

In questo caso viene presa in considerazione la λ di 510 nm, ovvero la λ di emissione di luce della sonda, che nel grafico corrisponde ad una trasmittanza di 90. In tale circostanza la luce non è riflessa, ma è trasmessa al filtro (passa il range di luce con λ maggiore di 470 nm).

Successivamente è presente il filtro di emissione, in tal caso un filtro passa-banda, che fa passare solamente una specifica λ .

La luce quindi viene trasmessa e selezionata ed è in seguito presente uno specchio che manda la luce ad un oculare o ad una telecamera in base alla sua posizione.

È stato utilizzato come programma METAFLUO composto da un obiettivo 20X, settato per la fluorescenza e gli UV. I vetri utilizzati sono trasparenti agli UV.

GIORNO 1

Sono stati preparati due tipi di soluzioni fisiologiche extracellulari:

- SOLUZIONE TYRODE STANDARD
- SOLUZIONE TYRODE Ca^{2+} FREE

Il terreno di coltura per la successiva piastratura delle cellule era già pronto.

Tabella 1. - preparazione soluzione fisiologica extracellulare TYRODE Ca^{2+} FREE

| Ca^{2+} FREE | mM | MW | g/l | $\mu\text{l/l}$ | 10x g/l | 10x $\mu\text{l/l}$ | 10x g/250ml | 10x $\mu\text{l}/250\text{ml}$ |
|-----------------------|-----|---------------|------|-----------------|---------|---------------------|----------------|-----------------------------------|
| NaCl | 154 | 58,44 | 9 | / | 90 | / | 22,5 | / |
| KCl | 4 | 74,56 | 0,3 | / | 3 | / | 0,745 | / |
| MgCl_2 | 1 | STOCK 4,9M | / | 204 | / | 2040 | / | 510 (~500 μl) |
| HEPES | 5 | 238 | 1,19 | / | 11,9 | / | 2,975 | / |
| Glucose | 5,5 | 180,2 | 0,44 | / | 9,9 | / | 2,478 | / |

Nella **tabella 1** è possibile osservare la concentrazione dei reagenti utilizzati per preparare una soluzione extracellulare Ca^{2+} FREE 10x in 250 ml di volume finale.

Inizialmente sono state pesate tutte le polveri in un becher e successivamente, mediante l' H_2O pura bidistillata, si è portata la soluzione a ~150ml per poi aggiungere la concentrazione corretta di MgCl_2 . In seguito, la soluzione preparata è stata mescolata tramite ancorette magnetiche per poi essere portata a pH di ~7,34/7,4 mediante pH-metro (vedi materiali e metodi) e utilizzo di NaOH 1M per basificare (la soluzione infatti era inizialmente acida con pH ~6,4). Per la basificazione si è proceduto con cautela inserendo una goccia alla volta di NaOH attraverso una pasteur, ciò è stato fatto per non rischiare di modificare oltre il limite di 7,4 il pH della soluzione fisiologica, essenziale per la salute delle cellule.

L'ancoretta precedentemente introdotta è stata rimossa e la soluzione inserita in un cilindro

graduato portato ad un volume finale di 250ml con H₂O milliq.

Si è infine suddivisa la soluzione 10x ottenuta in aliquote da 50ml e le provette sono state nominate e congelate per un futuro utilizzo.

L'intero procedimento è stato eseguito anche per la preparazione della soluzione TYRODE STANDARD, con la differenza che tra i reagenti della soluzione era presente anche CaCl₂ (**Tabella 2**).

Tabella 2. - preparazione soluzione fisiologica extracellulare TYRODE STANDARD

| TYRODE STANDARD | mM | MW | g/l | μl/l | 10x g/l | 10x μl/l | 10x g/250ml | 10x μl/250ml |
|-------------------|-----|------------|-------|------|---------|----------|-------------|---------------|
| NaCl | 154 | 58,44 | 9 | / | 90 | / | 22,5 | / |
| CaCl ₂ | 2 | 147,02 | 0,294 | / | 2,94 | / | 0,735 | / |
| KCl | 4 | 74,56 | 0,3 | / | 3 | / | 0,745 | / |
| MgCl ₂ | 1 | STOCK 4,9M | / | 204 | / | 2040 | / | 510 (~500 μl) |
| HEPES | 5 | 238 | 1,19 | / | 11,9 | / | 2,975 | / |
| Glucose | 5,5 | 180,2 | 0,44 | / | 9,9 | / | 2,478 | / |

Quando necessario le aliquote di stock possono essere scongelate e, prima di essere utilizzate nell'esperimento, si aggiunge EGTA alla soluzione TYRODE Ca²⁺ FREE finale. L'EGTA è un chelante necessario per sottrarre possibili residui di Ca²⁺ presenti che andrebbero ad inficiare i risultati successivi. La soluzione viene a tal punto nuovamente portata a pH corretto con il pH-metro basificando con NaOH 1M.

GIORNO 2

In seguito, le cellule PC3 e PC3M8 sono state piastrate in modo tale da avere in ogni piastra un ugual numero di cellule per entrambe le colture.

Come detto precedentemente si lavora su due linee cellulari di carcinoma prostatico: PC3 wild type e PC3M8, trasfettate con il gene che codifica per il canale TRPM8 e che quindi lo over-esprimono. Si tratta di cellule in coltura adese al substrato, mantenute in terreno RPMI con parametri controllati di osmolarità, temperatura (37°C) e pH, e mantenute in incubatore con il 5% di CO₂, 95% di O₂ e con carbonato di sodio aggiunto al terreno. Il tutto serve a formare un tampone.

Il terreno di coltura RPMI fornisce glucosio, fattori di crescita, sali minerali e siero. Si aggiungono inoltre glutammina e antibiotici per evitare contaminazioni da parte dell'ambiente esterno. I sali contenuti nel tampone sono quelli tipici dell'ambiente extracellulare: Ca²⁺, Na⁺ e K⁺.

In seguito all'avvenuta confluenza delle cellule, esse si staccano dal terreno lavorando sotto cappe sterili a flusso verticale. Si rimuove il surnatante dal terreno con una pipetta da 5ml, e si effettua un lavaggio mediante l'uso di 3 ml di PBS W/O Ca²⁺ Mg²⁺ (calcio e magnesio aiutano l'adesione cellulare).

Successivamente il PBS viene aspirato e si aggiunge 1ml di tripsina 1X che degrada le molecole di adesione (le adesine) promuovendo il distacco delle cellule dal terreno. Il tutto è stato fatto agire

per 5 minuti in incubatore.

Nel frattempo, si è preparato sotto cappa 2 ml di terreno RPMI in una provetta da 14ml precedentemente etichettata. Il terreno ha il 10% di siero che servirà ad inattivare la tripsina.

Intanto le cellule sono state prelevate dall'incubatore e sono state controllate al microscopio invertito per verificare se la tripsina avesse agito correttamente.

Si è quindi osservata la morfologia delle cellule che appaiono ora tondeggianti perché non più adese al substrato (prima apparivano allungate).

Dal momento che le cellule sono completamente staccate, si recupera la sospensione dalla piastra e la si trasferisce nella provetta da 14ml.

Per essere certi di aver prelevato tutta la sospensione cellulare viene aggiunto 1ml di terreno nella piastra per lavarla completamente, il tutto poi posto nella provetta.

In totale si ottengono 4ml nella provetta (2ml terreno, 1ml tripsina, 1ml di terreno aggiunto in seguito). Il tutto è stato risospeso più volte con la pipetta evitando la formazione di bolle.

A tal punto è stato possibile effettuare la conta cellulare mediante Camera di Burkner inserendo 10 μ l per ogni cameretta (2 camerette: in alto e in basso) prelevati dalla provetta in cui sono risospese le cellule e contando le cellule in 5 campi diversi per ogni cameretta.

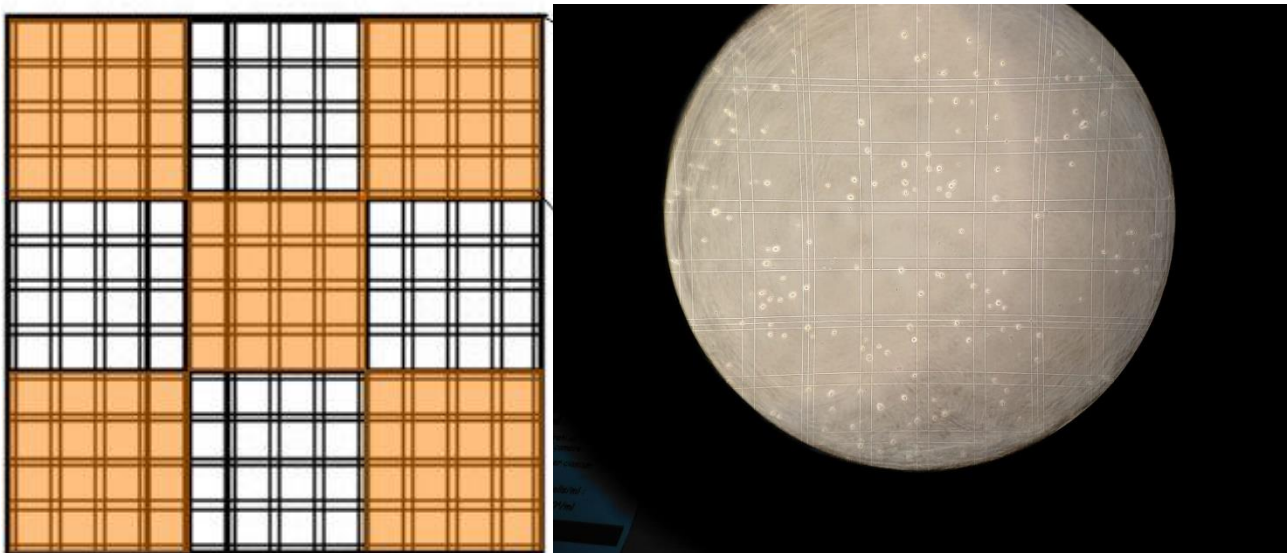


Figura 1 a sinistra uno schema della camera di Burkner, a destra immagine al microscopio delle cellule PC3 nella camera di Burkner.

Per la seguente esercitazione è stato seguito il metodo rappresentato in figura 1:

- contare i 5 campi evidenziati e di ognuno considerare solo due lati (in alto e a sx, o in alto e a dx, in basso e a sx, in basso e a dx).
- fare la media delle cellule totali per le due camerette.

Media totale PC3: 50 cellule, visto che 1 quadrato ha un volume di circa 10⁻⁴ ml

→ 50*10⁴ = 500.000 cellule/ml

→ 500.000*4ml = 2*10⁶ cellule totali (in provetta è presente un volume totale di 4ml)

Media totale PC3M8:

→ 29*10⁴ = 290.000 cellule/ml;

→ 290.000*4ml = 1,17 * 10⁶ cellule totali

Intanto le cellule nella provetta sono state centrifugate per 5 minuti a 1000 RPM.

Successivamente il surnatante contenente tripsina è stato eliminato ed il pellet risospeso in 1ml di terreno RPMI.

Si calcola quanti microlitri di sospensione cellulare sono da prelevare per seminarne $5 \cdot 10^4$ cell/1ml RPMI 10%.

Per le PC3:

$2 \cdot 10^6$: 1ml = $5 \cdot 10^4$: X \rightarrow X = 25 μ l (25 μ l prelevati dalla provetta per avere $5 \cdot 10^4$ cellule su 1 ml).

Per le cellule PC3M8:

$1,17 \cdot 10^6$: 1 = $5 \cdot 10^4$: X \rightarrow X = 43 μ l (in 43 μ l ci saranno $5 \cdot 10^4$ cellule).

Infine, vengono preparati due piastrellini con vetrino al loro interno per seminare le cellule di ogni coltura: inizialmente si introducono 1,5ml di terreno in ognuno di questi e poi si trasferiscono 25 μ l dalla provetta PC3 e 43 μ l dalla provetta PC3M8; i piastrellini vengono infine messi in incubatore per la crescita cellulare.

GIORNO 3

Il fulcro dell'esercitazione è l'imaging del Ca^{2+} . Si utilizza il microscopio a fluorescenza descritto in **(materiale e metodi- punto 5)**.

Il protocollo è stato effettuato sulle due linee cellulari PC3 e PC3M8 precedentemente piastrate.

Per entrambe le linee cellulari:

- il piastrellino è stato caricato con FURA2-AM 2 μ M a partire da una soluzione stock 1mM per 40'-45'. La concentrazione finale che si vuole ottenere di FURA2-AM è di 2 μ M, per cui dallo stock vengono prelevati 2 μ L da inserire in un volume finale di 1mL.

(Formula utilizzata $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$)

La sonda è esterificata con acetossimetilestere e per questo può attraversare la membrana plasmatica ed entrare nella cellula.

- Il piastrellino viene lavato mediante soluzione fisiologica TYRODE STANDARD (per eliminare eventuali residui di FURA2-AM) portata da 10x a 1x, 0 Ca^{2+} , + EGTA che chela tutto il calcio.
- Il vetrino viene montato (mai a secco) nella cameretta supporto e si è effettuato l'esperimento secondo i due diversi protocolli in base alla linea cellulare.

Il protocollo di acquisizione utilizzato per la linea cellulare PC3 è:

- stimolazione di 500millisec a 340nm
- stimolazione di 500millisec a 380nm

Successivamente il sistema si ferma per 2 secondi, in cui la cellula è al buio e il processo si ripete.

Tale protocollo è stato effettuato per le cellule utilizzando la soluzione fisiologica TYRODE STANDARD per circa 30 cicli (90 sec). In seguito, oltre alla soluzione fisiologica, è stato aggiunto l'agonista WS12 che stimola i canali TRPM8 eventualmente presenti (nel caso della linea cellulare PC3 il canale non è fisiologicamente presente). È stata utilizzata la soluzione STOCK 100mM per circa 100 cicli (300 sec) o meno, fino a quando la risposta non si esaurisce. Infine, è stata nuovamente aggiunta la soluzione fisiologica.

Senza l'utilizzo di programmi le PC3 risultano naturalmente verdi perché la λ di emissione della sonda

inserita è a 510nm (emissione nel verde).

L'output che il software restituisce corrisponde a 3 finestre:

- 380nm
- 340nm
- RATIO

La ratio è il rapporto tra le due lunghezze d'onda. Ciò che risulta è una scala di colori che va dal blu al rosso. Se la concentrazione di calcio è bassa avremo colorazione blu, se la concentrazione di calcio è alta avremo colorazione rossa.

In questo caso la concentrazione di calcio è bassa e quindi le cellule hanno un colore blu sullo schermo. Questa è un'analisi qualitativa, per ciò che concerne l'analisi quantitativa sono state scelte delle regioni di interesse:

- una regione per il background – selezionando la parte nera dello schermo che verrà poi sottratta a tutte le altre regioni che saranno state selezionate;
- una regione per ciascuna cellula.

Si ottengono, inoltre, altre due finestre per ogni regione di interesse selezionata:

- Acquisition RUN
- Intensity

Ogni cellula è rappresentata da un colore diverso e per ciascun colore si ha una linea tratteggiata e una linea continua. La linea tratteggiata rappresenta la fluorescenza a 380nm, la linea continua a 340 nm. In tal modo si ottiene la ratio per ogni cellula: se è presente una variazione di concentrazione del Ca^{2+} intracellulare varia il rapporto raziometrico per cui una linea sale mentre l'altra scende.

È stato possibile osservare come alcune di queste tracce salissero e scendessero nel corso dei cicli di acquisizione effettuati rappresentando come la cellula risponde alla differente concentrazione di Ca^{2+} intracellulare. È inoltre possibile il verificarsi di oscillazioni spontanee dovute all'entrata di Ca^{2+} dall'esterno. Nella situazione di 0 Ca^{2+} invece, tutto ciò non si verifica perché non vi è Ca^{2+} nell'ambiente extracellulare.

Quando si stimola la linea cellulare come da protocollo di acquisizione (ogni ciclo corrisponde a 3 secondi) si ottiene in automatico un dato, i valori ottenuti verranno inseriti in un foglio Excel e successivamente analizzati.

Situazione in 0 Ca^{2+} : è stato eseguito un controllo nella linea cellulare PC3 inserendo soluzione extracellulare TYRODE Ca^{2+} FREE per verificare se le oscillazioni fossero dovute realmente alla presenza di Ca^{2+} extracellulare. Se anche in questa condizione si verificano oscillazioni, esse non scaturiscono dalla presenza di Ca^{2+} .

Il protocollo di stimolazione utilizzato per la linea cellulare PC3M8 è come quello precedente, cambiano però i diversi cicli di acquisizione.

Si è inizialmente utilizzata la soluzione fisiologica TYRODE STANDARD per circa 30 cicli (90 sec). In seguito, oltre alla soluzione fisiologica, è stato aggiunto l'agonista WS12 500 nM che stimola i canali TRPM8 presenti; ciò è stato effettuato per circa 100 cicli (300 sec) o meno.

In tal caso, per le cellule della linea PC3M8, è possibile aspettarsi una grande risposta che dia come output una traccia rossa indicando la presenza di un'elevata concentrazione di Ca^{2+} intracellulare in seguito all'over-espressione del canale; il picco in seguito si abbassa perché le pompe lavorando

riportano il calcio nell'ambiente extracellulare.

La soluzione fisiologica è stata nuovamente inserita come passaggio graduale prima di eliminare Ca^{2+} extracellulare ed inserire la soluzione fisiologica TYRODE Ca^{2+} FREE (si dovrebbe in seguito osservare un abbassamento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, in quanto non è più presente Ca^{2+} che possa entrare nella cellula). È stato poi ulteriormente aggiunto alla soluzione l'agonista WS12 500nm per circa 100 cicli o meno finché la risposta non si esaurisce. L'agonista viene inserito in assenza di Ca^{2+} in maniera tale da osservare la risposta cellulare: se i canali sono attivi e portano Ca^{2+} intracellulare, ciò è dato dalla presenza dei suddetti canali sulla membrana degli store intracellulari (ad esempio il reticolo endoplasmatico), questo perché i canali sulla membrana esterna della cellula sono inattivi data l'assenza del Ca^{2+} extracellulare.

Infine, l'agonista è stato eliminato e si è reinserita la soluzione fisiologica Ca^{2+} FREE.

Anche in questo caso, quando si stimola la linea cellulare come da protocollo di acquisizione si ottiene in automatico un dato derivante dal software utilizzato e i valori ottenuti verranno inseriti in un foglio Excel e successivamente analizzati.

GIORNO 4

Dopo aver fatto l'esperimento, si è svolta l'analisi dei dati. Si è andati ad individuare se le cellule mostrassero o meno oscillazione (in questo caso solo una cellula della linea PC3 mostrava

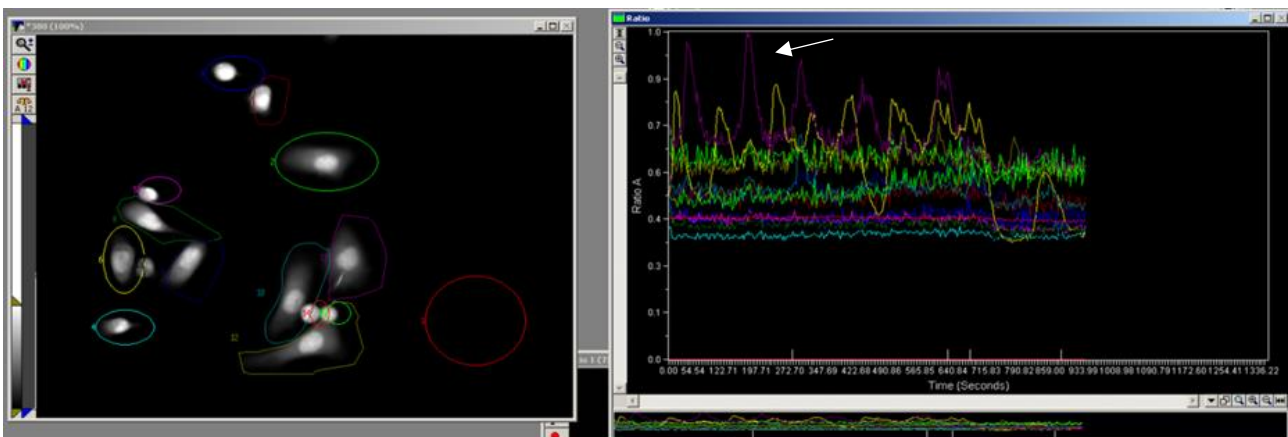


Figura 2 sinistra cellule PC3, destra ratio, la freccia bianca indica l'oscillazione della cellula 11.

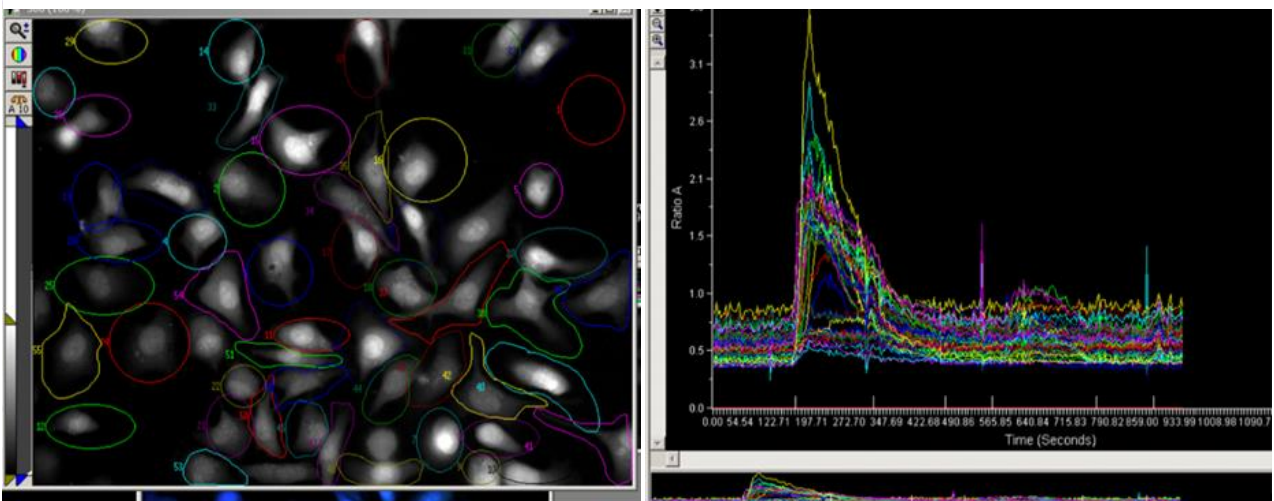


Figura 3 sinistra cellule PC3M8 destra ratio.

oscillazione e dunque non è stata considerata nell'analisi) e quali davano, invece, una risposta in presenza dell'agonista. Quindi si è fatto un grafico per ogni cellula e si è calcolato il picco facendo la differenza tra il massimo e il basale, di cui il massimo è dato da tutti i valori presi durante la presenza dell'agonista WS12 ed il basale dato dai dieci valori presi partendo da dieci cicli prima della somministrazione di WS12, in sola soluzione fisiologica. Dopodiché si è valutato il valore ottenuto del picco e se risultava maggiore di 0,1 si confrontava con il grafico e in particolare con l'intervallo di tempo in cui era presente il ws12 così da poter confermare la responsività delle cellule.

Per le PC3 (**Fig.2**) si è partiti da quattordici cellule, ma ne sono state conteggiate tredici in quanto una presentava un andamento basale non idoneo (cellula 6). Su queste un'altra presentava oscillazioni (cellula 11), per cui su un totale di 12 cellule considerate come buone, tre risultavano responsive, con una percentuale del 25%. Rapportando la cellula 11 al totale di cellule prese si può dire che il 7,7% sono oscillanti. Di seguito è riportato il grafico che conferma ulteriormente il comportamento di tale cellula.

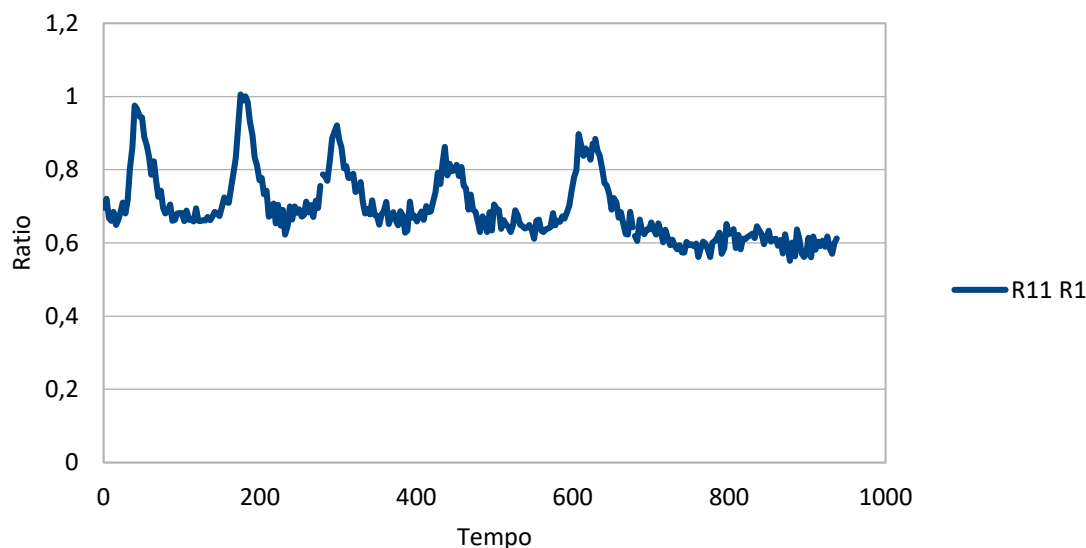


Grafico 1 rappresentazione cellula PC3 con comportamento oscillante.

Per quanto riguarda le PC3M8 (**Fig.3**) si è partiti da 54 cellule e si è visto che in presenza di calcio hanno risposto 50 cellule, in assenza di calcio la risposta è stata data da 20 cellule, dando come percentuali rispettivamente una risposta del 92,6% e del 37%.

Dopodiché ci si è concentrati sulla traccia media. Si è calcolata la media per ogni tempo di tutte le ratio la deviazione standard e l'errore standard. Si è costruito il grafico con la media calcolata (ordinate) in relazione con il tempo (ascisse) ed è stato aggiunto l'errore standard. In questo modo abbiamo ottenuto il grafico rispettivo per tutte le cellule PC3 e tutte le cellule PC3M8 (**grafico 2 e 3**).

cosa
intendete
con
"media"

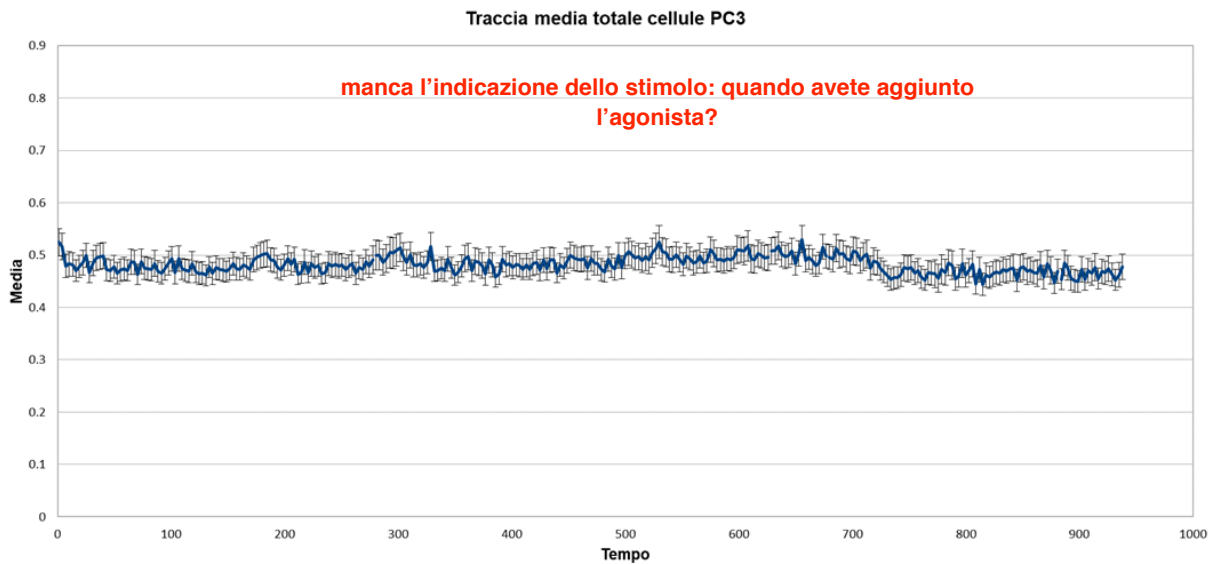


Grafico 2 traccia media cellule PC3 totali

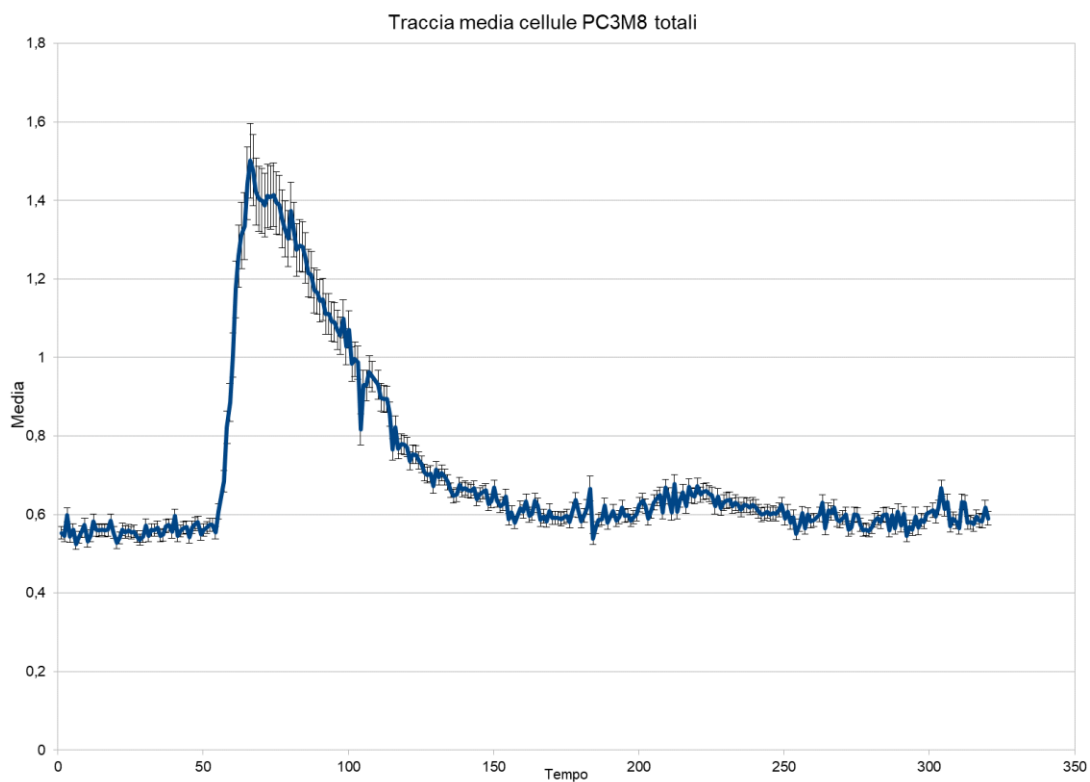


Grafico 3 traccia media cellule PC3M8 totali

Dopodiché si è fatta la stessa cosa ma calcolando solo la media delle responsive e ottenendo così i grafici per le rispettive cellule PC3, PC3M8 in zero calcio e PC3M8 in calcio. (**grafico 4, 5 e 6**).

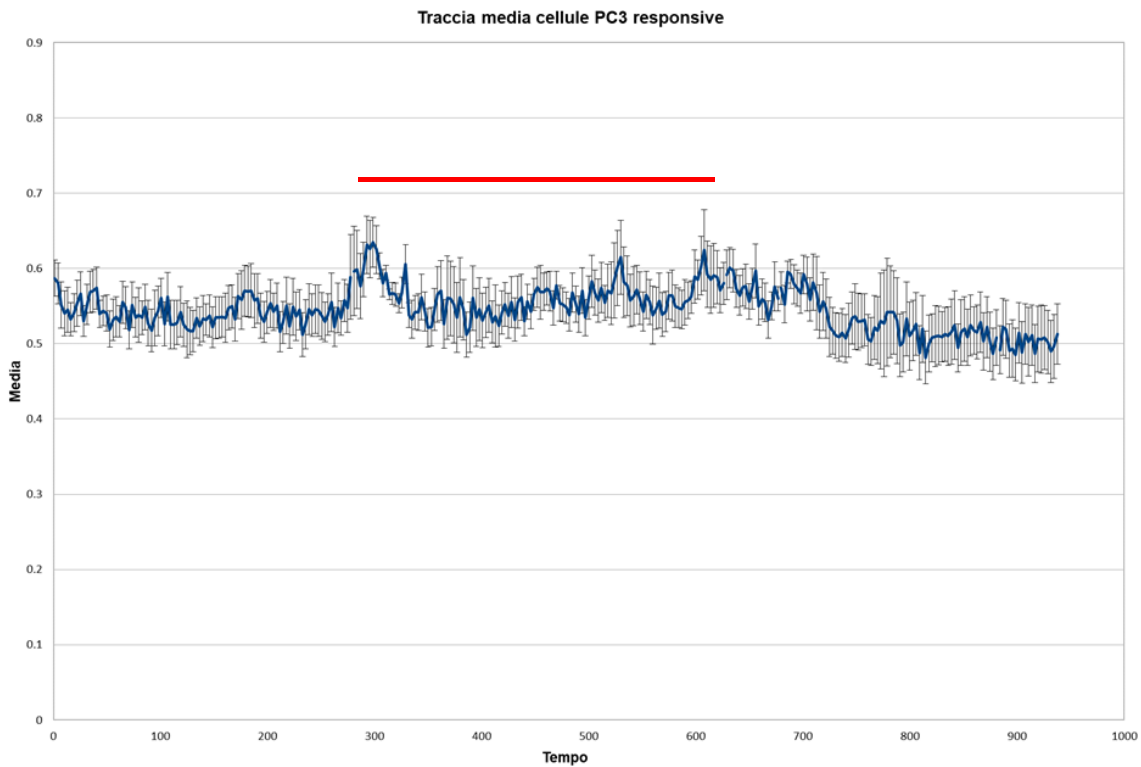


Grafico 4 traccia media cellule PC3 responsive, la linea rossa indica il range di tempo che intercorre tra l'inserimento dell'agonista WS12 e il lavaggio, in questo caso tra 278 e 628 secondi.

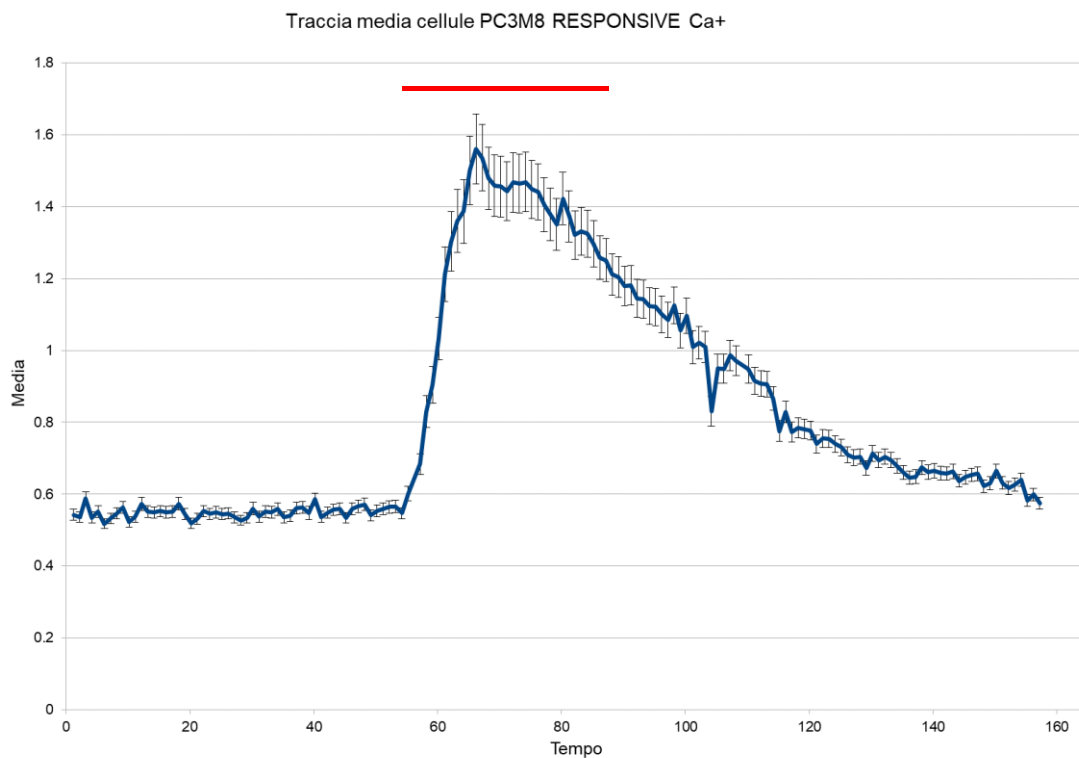


Grafico 5 traccia media cellule PC3M8 responsive in calcio. La linea rossa indica il range di tempo che intercorre tra l'inserimento del l'agonista WS12 e il lavaggio, in questo caso è tra i 56 e gli 89 secondi.

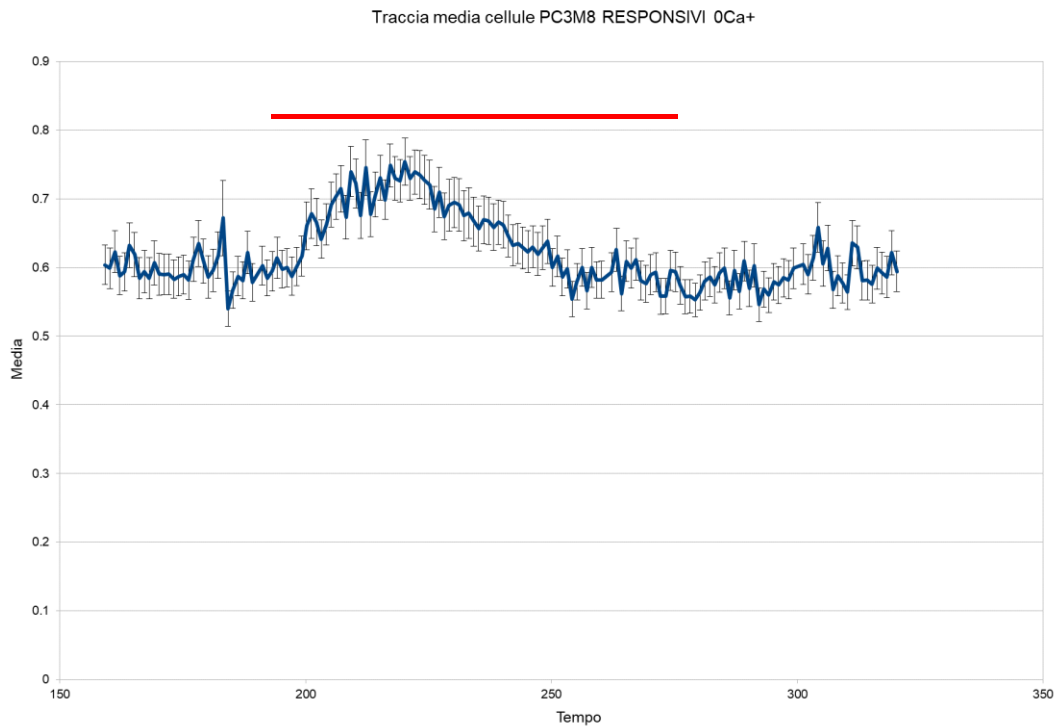


Figura 6 traccia media delle cellule PC3M8 responsive in zero calcio, la linea rossa indica il range di tempo che intercorre tra l'inserimento dell'agonista WS12 e il lavaggio, in questo caso da 190 a 271 secondi.

Per un confronto più evidente è stato costruito un istogramma in cui sono state riportate le medie di ampiezza dei picchi delle cellule totali e responsive PC3 e PC3M8 (queste sia in assenza che presenza di calcio). (**grafico 7**).

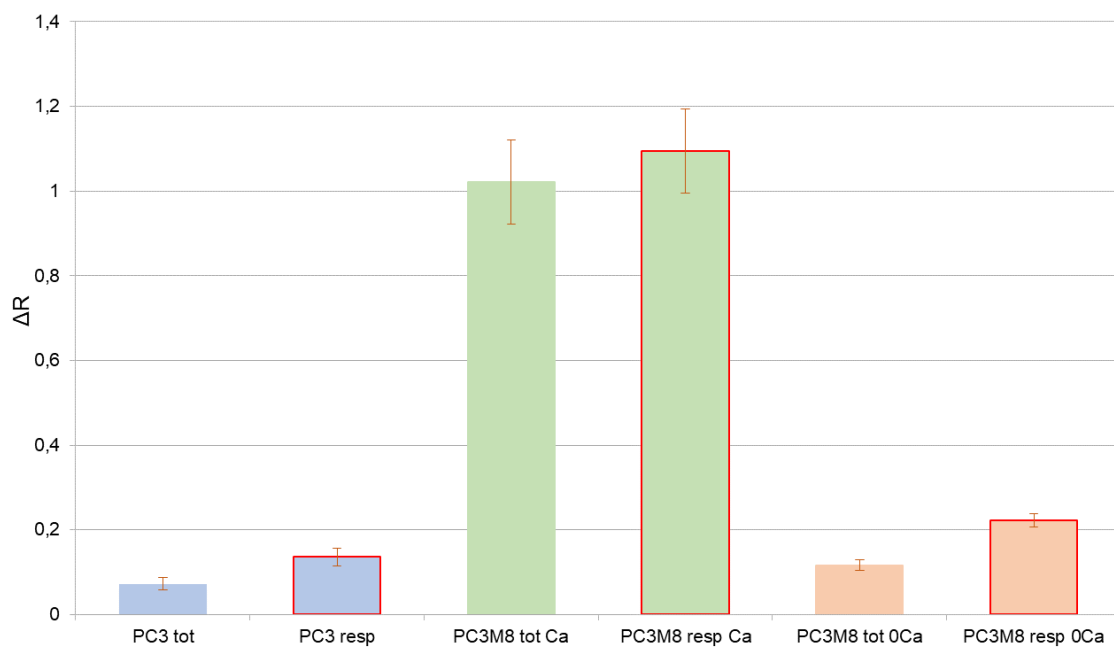


Grafico 7 in azzurro cellule PC3 totali sinistra e responsive destra, in verde le cellule PC3M8 in calcio e in rosa cellule PC3M8 in zero calcio. Le cellule sono rapportate alla media ed è stato inserito l'errore standard (indicato in rosso).

Si può notare come la media delle cellule PC3 responsive sia molto minore rispetto alle PC3M8 responsive in calcio, infatti le cellule PC3M8 esprimono stabilmente un canale al calcio e sono particolarmente responsive all'agonista WS12. Viceversa, le PC3 wild type, che non esprimono il canale o lo esprimono solo in quantità molto bassa, hanno una media minore, come ci si aspetta. Passando in una soluzione a zero calcio, la media delle PC3M8 che rispondono all'agonista diminuisce drasticamente, ovvero la concentrazione di calcio intracellulare è molto minore. In queste condizioni la risposta all'agonista ws12 dipende esclusivamente dagli stock intracellulari.

Analisi statistica

Per poter verificare la significatività delle medie dei picchi analizzate in precedenza si è effettuata un'analisi statistica dei dati, mediante l'utilizzo del software "R". Inizialmente si è calcolata la normalità delle diverse medie (PC3tot, PC3resp, PC3M8totCa, PC3M8respCa, PC3M8tot0Ca, PC3M8resp0Ca) con un test di Shapiro-Wilk (**Figura 4**). Questo test prevede due ipotesi: una ipotesi H_0 per la quale la distribuzione della popolazione dalla quale è stato estratto il campione è normale (ipotesi di normalità), ed una ipotesi H_1 per la quale la distribuzione non è normale. Nel caso in cui

| | |
|---|---|
| <pre>> shapiro.test(PC3tot) shapiro-wilk normality test data: PC3tot W = 0.95118, p-value = 0.6543 > shapiro.test(PC3resp) shapiro-wilk normality test data: PC3resp W = 0.97691, p-value = 0.7087 > shapiro.test(PC3M8totCa) shapiro-wilk normality test data: PC3M8totCa W = 0.91974, p-value = 0.00146</pre> | <pre>> shapiro.test(PC3M8respCa) shapiro-wilk normality test data: PC3M8respCa W = 0.92872, p-value = 0.004943 > shapiro.test(PC3M8tot0Ca) shapiro-wilk normality test data: PC3M8tot0Ca W = 0.88946, p-value = 0.0001253 > shapiro.test(PC3M8resp0Ca) shapiro-wilk normality test data: PC3M8resp0Ca W = 0.97055, p-value = 0.7664</pre> |
|---|---|

Figura 4. Calcoli della normalità con il test di Shapiro-Wilk

il p-value restituitoci dal test sia maggiore di 0.05 si accetta l'ipotesi di normalità H_0 , mentre se risultasse minore di 0.05 si accetta l'ipotesi di non normalità H_1 .

I dati relativi alle cellule "PC3tot", "PC3resp" e "PC3M8resp0Ca" presentano una distribuzione normale (infatti il valore di p-value risulta essere maggiore di 0.05) mentre tutti gli altri risultano non distribuiti normalmente. Di conseguenza si è utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon per verificare la significatività statistica tra: "PC3tot" e "PC3M8totCa", "PC3M8totCa" e "PC3M8tot0Ca", "PC3M8respCa" e "PC3M8resp0Ca".

Le ipotesi di partenza di questo test sono:

- H_0 = non vi è una differenza statistica tra i campioni;

- H_1 = vi è una differenza statistica tra i campioni.

```
> wilcox.test(PC3tot,PC3M8totCa)

wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: PC3tot and PC3M8totCa
W = 21, p-value = 4.928e-07
alternative hypothesis: true location shift is not equal to
0

> wilcox.test(PC3M8totCa,PC3M8tot0Ca)

wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: PC3M8totCa and PC3M8tot0Ca
W = 2655, p-value = 1.955e-13
alternative hypothesis: true location shift is not equal to
0

> wilcox.test(PC3M8respCa,PC3M8resp0Ca)

wilcoxon rank sum test with continuity correction

data: PC3M8respCa and PC3M8resp0Ca
W = 811, p-value = 5.422e-05
alternative hypothesis: true location shift is not equal to
0
```

Figura 5 Calcoli della normalità con il test di Wilcoxon

Anche qui valutiamo il p-value, come descritto precedentemente, per accettare una delle due ipotesi.

In tutte e tre i test si sono ottenuti dei p-value molto minori di 0.05 portandoci ad accettare l'ipotesi H_1 . Questo sta ad indicare che le coppie considerate hanno una differenza statistica e quindi un'alta significatività. Possiamo quindi dire che:

- È statisticamente significativo considerare la differenza tra le medie dei picchi di risposta delle cellule "PC3" e "PC3M8totCa" dovuta alla over-espressione del canale nella seconda condizione.
- È statisticamente significativo considerare la differenza tra le medie dei picchi di risposta delle cellule "PC3M8totCa" e "PC3M8tot0Ca" dovuta all'azione del canale in presenza di Ca.
- È statisticamente significativo considerare la differenza tra le medie dei picchi di risposta delle cellule "PC3M8respCa" e "PC3M8resp0Ca" dovuta all'azione del canale in presenza di Ca.

Discussione

In conclusione, dai dati ottenuti con i grafici e dall'analisi statistica possiamo osservare che alcune cellule PC3 nonostante siano prive del canale calcio danno una risposta a contatto con l'agonista WS12. Questa risposta però non è paragonabile a quella delle cellule PC3M8 responsive in calcio, che sovra-esprimono i canali. A confronto le cellule PC3 rispondono con una percentuale del 25% contro il 92% delle PC3M8 responsive in calcio.

In zero calcio le cellule PC3M8 danno una risposta pari al 37%. Tale segnale è dovuto solo agli stock intracellulari e quindi ad un *release* citoplasmatico. Mentre nelle PC3M8 in presenza di calcio, la risposta è dovuta sia ad un *entry* che a un *release*, passando in una soluzione priva di calcio non si ha più un *entry* e il segnale è dato solo dalla probabilità che alcuni canali del reticolo endoplasmatico si aprano e che quindi le sonde risentano di questo rilascio.