

Relazione di Laboratorio di Biofisica Cellulare e Molecolare

Esperienza pratica: misurazioni intracellulari del Ca^{2+} per studiare le proprietà di TRPM8

Gruppo C: Antonicelli Giacomo, Casamassima Irene, Curatolo Loris, Lamberti Lorenzo, Lambiase Chiara, Rossetto Gloria, Scattareggia Marchese Adriana, Tonda Michela, Vantaggiato Stefano.

A.A. 2018-2019

Introduzione

Il calcio è il metallo più abbondante nel nostro organismo, circola nel plasma in parte in forma libera ionizzata e in parte legato a proteine plasmatiche come l'albumina o complessato con altri ioni a formare sali.

È un elemento essenziale per la mineralizzazione di denti ed ossa che rappresentano anche la maggiore riserva di calcio dell'organismo. Svolge diverse funzioni fisiologiche come la contrazione muscolare, la conduzione nervosa e la coagulazione; è implicato in processi di secrezione ormonale, funge da secondo messaggero per ormoni e fattori di crescita, ha un ruolo anche nella trascrizione genica e in attività metaboliche essendo cofattore di molti enzimi.

È molto importante regolare continuamente l'omeostasi del Ca^{2+} tramite meccanismi di Off che abbassano la sua concentrazione intracellulare come pompe ATPasiche, SERCA e PMCA e meccanismi di On che, viceversa, aumentano la concentrazione intracellulare come store intracellulari e canali ionici.

Per poter studiare in laboratorio il flusso di Ca^{2+} abbiamo utilizzato la sonda fluorescente Fura 2, ideale per calcolare la concentrazione di Ca^{2+} citosolica.

Le due linee cellulari utilizzate per l'esperimento sono cellule di carcinoma prostatico da metastasi ossea:

- 1) PC3 wild type
- 2) PC3 opportunamente transfettata stabilmente per over-esprimere il canale TRPM8

La proteina TRPM8 appartiene alla famiglia dei TRP channels ed è un canale ionico sensibile al Na^+ e al Ca^{2+} , ma attivato anche da basse temperature e composti chimici.

Lo scopo dell'esperimento è quello di osservare se effettivamente l'over-espressione di TRPM8 comporta un maggiore flusso intracellulare di Ca^{2+} e verificare che questo flusso in entrata non dipenda dall'apertura degli store intracellulari.

perchè? non potrebbe essere dipendente dal rilascio dagli stores? Perchè "non dipenda"?
Vogliamo verificar l'origine dei segnali di Ca^{2+}

Cosa vuol dire sensibile ???
Permeabile e forse?

Attenzione a distinguere il ruolo del Ca^{2+} extracellulare ed intracellulare

Giorno 1: preparazioni delle soluzioni fisiologiche extracellulari

L'obiettivo del giorno è quello di preparare due soluzioni tampone, Tyrode standard e Tyrode Ca²⁺-free.

Preparazione del tampone Tyrode Ca²⁺-free

	mM	MW	10X g/250 mL	10X µL/250 mL
NaCl	154	58.44	22.5	
KCl	4	74.56	0.745	
MgCl ₂	1	STOCK 4.9M	/	0.51
HEPES	5	238	2.975	
Glucose	5.5	180.2	2.477	

Il pH finale della soluzione deve essere 7.34.

Per poter ottenere i grammi e i volumi necessari per preparare il tampone, si fanno gli appositi calcoli. Avendo le concentrazioni iniziali e i pesi molecolari di NaCl, KCl, MgCl₂, HEPES e Glucose si utilizza la seguente formula:

$$\text{moli} = \text{Molarità} \cdot L$$

scritta così la formula non mi dice nulla

$$\text{gr} = \text{mol} \cdot \text{MW}$$

In questo modo si ottengono i grammi da pesare per ogni composto:

1. NaCl

$$\text{Moli} = 0.154 \text{ (mol/L)} \cdot 0.250 \text{ L} = 0.0385 \text{ mol}$$

$$\text{gr} = 0.0385 \text{ mol} \cdot 58.44 \text{ (g/mol)} = 2.25 \text{ gr.}$$

I grammi finali da pesare per 250 mL di soluzione saranno pari a $2.25 \cdot 10 = 22.5 \text{ gr}$

2. KCl

$$\text{Moli} = 0.004 \text{ (mol/L)} \cdot 0.250 \text{ L} = 0.001 \text{ mol}$$

$$\text{gr} = 0.001 \text{ mol} \cdot 74.56 \text{ (g/mol)} = 0.0745 \text{ gr}$$

I grammi finali da pesare per 250 mL di soluzione saranno pari a $0.0745 \cdot 10 = 0.745 \text{ gr}$

3. HEPES

$$\text{Moli} = 0.005 \text{ (mol/L)} \cdot 0.250 \text{ L} = 0.00125 \text{ mol}$$

$$\text{gr} = 0.00125 \text{ mol} \cdot 238 \text{ (g/mol)} = 0.2975 \text{ gr}$$

I grammi finali da pesare per 250 mL di soluzione saranno pari a $0.2975 \cdot 10 = 2.975 \text{ gr}$

4. Glucose

$$\text{Moli} = 0.0055 \text{ (mol/L)} \cdot 0.250 \text{ L} = 0.001375 \text{ mol}$$

$$\text{gr} = 0.001375 \text{ mol} \cdot 180.2 \text{ (g/mol)} = 0.2477 \text{ gr}$$

I grammi finali da pesare per 250 mL di soluzione saranno pari a $0.2477 \cdot 10 = 2.477 \text{ gr}$

Il cloruro di magnesio (MgCl_2), invece, è una soluzione. Dal momento che si hanno la concentrazione iniziale e finale, e il volume finale, si può utilizzare la formula delle diluizioni per ottenere il volume iniziale: $C_1V_1=C_2V_2$.

Per cui:

$$4,9 \text{ M} \cdot V_1 = 10^{-3} \text{ M} \cdot 250 \text{ mL}$$

$$V_1 = (10^{-3} \cdot 250) / 4.9 = 0.051 \text{ mL}$$

$$10X: 0.051 \text{ mL} \cdot 10 = 0.510 \text{ mL} \approx 500 \mu\text{L}$$

Preparazione del tampone Tyrode standard

	mM	MW	10X g/250 mL	10X μL /250 mL
NaCl	154	58.44	22.49	
CaCl_2	2	147.02	0.735	
KCl	4	74.56	0.743	
MgCl_2	1	STOCK 4.9 M	/	0.51
HEPES	5	238	2.975	
Glucose	5.5	180.2	2.49	

Il pH finale della soluzione deve essere 7.34.

Per poter ottenere i grammi e i volumi necessari si ripetono i calcoli come in precedenza.

In questo modo si ottengono i grammi da pesare per ogni composto:

1. NaCl

$$\text{Moli} = 0.154 \text{ (mol/L)} \cdot 0.250 \text{ L} = 0.0385 \text{ mol}$$

$$\text{gr} = 0.0385 \text{ mol} \cdot 58.44 \text{ (g/mol)} = 2.249 \text{ gr}$$

I grammi finali da pesare per 250 mL di soluzione saranno pari a $2.249 \cdot 10 = 22.49 \text{ gr}$

2. CaCl_2

$$\text{Moli} = 0.002 \text{ (mol/L)} \cdot 0.250 \text{ L} = 0.0005 \text{ mol}$$

$$\text{gr} = 0.0005 \text{ mol} \cdot 147.02 \text{ (g/mol)} = 0.0735 \text{ gr}$$

I grammi finali da pesare per 250 mL di soluzione saranno pari a $0.0735 \cdot 10 = 0.735 \text{ gr}$; la quantità effettivamente pesata è 0.737 gr.

3. KCl

$$\text{Moli} = 0.004 \text{ (mol/L)} \cdot 0.250 \text{ L} = 0.001 \text{ mol}$$

$$\text{gr} = 0.001 \text{ mol} \cdot 74.56 \text{ (g/mol)} = 0.0743 \text{ gr}$$

I grammi finali da pesare per 250 mL di soluzione saranno pari a $0.0743 \cdot 10 = 0.743 \text{ gr}$

4. HEPES

$$\text{Moli} = 0.005 \text{ (mol/L)} \cdot 0.250 \text{ L} = 0.00125 \text{ mol}$$

$$\text{gr} = 0.00125 \text{ mol} \cdot 238 \text{ (g/mol)} = 0.2975 \text{ gr}$$

I grammi finali da pesare per 250 mL di soluzione saranno pari a $0.2975 \cdot 10 = 2.975 \text{ gr}$

5. Glucose

$$\text{Moli} = 0.0055 \text{ (mol/L)} \cdot 0.250 \text{ L} = 0.001375 \text{ mol}$$

$$\text{gr} = 0.001375 \text{ mol} \cdot 180.2 \text{ (g/mol)} = 0.249 \text{ gr}$$

I grammi finali da pesare per 250 mL di soluzione saranno pari a $0.249 \cdot 10 = 2.49 \text{ gr}$; la quantità effettivamente pesata è 2.50 gr.

Il cloruro di magnesio (MgCl_2), invece, è una soluzione. Dal momento che si hanno la concentrazione iniziale e finale, e il volume finale, si può utilizzare la formula delle diluizioni per ottenere il volume iniziale: $C_1V_1 = C_2V_2$.

Per cui:

$$4.10\text{M} \cdot V_1 = 10^{-3} \text{ M} \cdot 250 \text{ mL} \rightarrow V_1 = (10^{-3} \cdot 250) / 4.9 = 0.051 \text{ ml}$$

$$10\text{X}: 0.051 \text{ ml} \cdot 10 = 0.510 \text{ ml} \approx 500 \text{ }\mu\text{l}$$

Per entrambe le soluzioni si pesano le quantità calcolate tramite l'utilizzo di una bilancia analitica, appositamente tarata.

I composti pesati si inseriscono poi all'interno di un becker. Successivamente si aggiunge acqua milliQ fino a circa 225 mL e si mette in agitazione utilizzando un agitatore magnetico. Quando tutta la soluzione è disciolta, si misura il pH con un pHmetro; per ottenere il pH desiderato si inserisce gradualmente NaOH.

Infine, si porta a volume finale di 250 mL e si divide tale volume in 5 stock da 50mL.

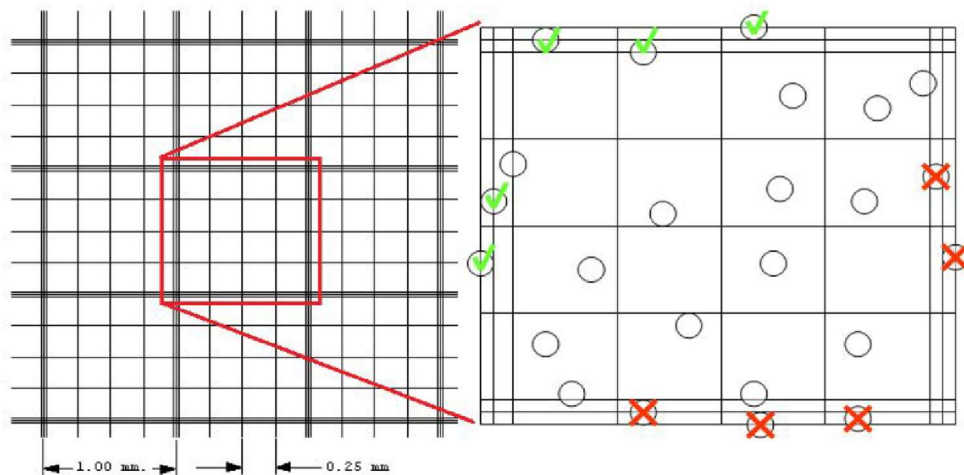
Un'aliquota da 50 mL (10X) della Tyrode Standard è stata portata a una concentrazione 1X. I 50 mL di una delle cinque falcon sono stati travasati nuovamente in un cilindro e sono stati diluiti in 500 mL di acqua milliQ.

Giorno 2: piastratura delle cellule per l'imaging del Ca^{2+}

Per andare a fare l'imaging del Ca^{2+} abbiamo bisogno di piastrare le due linee cellulari, sia le WT che le TRPM8, ognuna in due piastre da 20 mm. In ogni piastra è necessario inserire un numero adeguato di cellule in modo da avere una densità cellulare adatta al momento dell'imaging, per questo si effettua la conta cellulare prima di piastrare.

Per entrambe le linee cellulari si procede in questo modo, operando sotto cappa a flusso laminare verticale per mantenere le condizioni di sterilità:

1. Si rimuove il terreno aspirandolo con una pipetta e si effettua un lavaggio aggiungendo 3 ml di PBS W/O Ca^{2+} Mg^{2+} in modo da favorire il distacco delle cellule dalla piastra.
2. Si aggiunge 1 ml di tripsina 1X in modo da idrolizzare le proteine di adesione e staccare le cellule.
3. Queste vanno incubate a 37°C per 5 minuti e al termine dell'incubazione si verifica al microscopio che tutte le cellule si siano staccate dalla piastra. Nel caso ci siano cellule ancora adese si procede a staccarle meccanicamente con una pipetta.
4. Si risospende il contenuto della piastra in una provetta da 14 ml contenente 2 ml di terreno fresco (RPMI 10%). Si lava la piastra con 1 ml di terreno fresco in modo da recuperare eventuali cellule rimaste e si trasferisce nella provetta. In questo modo avremo una sospensione di 4 ml totali dove viene inibita l'azione della tripsina grazie alla presenza del siero bovino nel terreno.
5. Si caricano due camerette di Burkner ognuna con 10 μl di sospensione e si procede con la conta al microscopio. Per ogni cameretta, divisa in 9 riquadri, si contano le cellule presenti in 5 di questi (per comodità i quattro agli angoli e quello centrale), tralasciando le cellule che si trovano sui bordi laterale destro e inferiore di ogni riquadro.



6. Il totale delle cellule contate si divide per 5, ottenendo una media di cellule per riquadro; questo si moltiplica per 10^4 ottenendo il numero di cellule in 1 ml, in quanto il volume di un riquadro è di 0.1 μl . Si moltiplica il valore ottenuto per il volume della nostra sospensione ottenendo il numero totale di cellule presenti.

PC3:

Media conta = 14

$[\text{PC3}] = 14 \cdot 10^4 \text{ cells/ml}$

$n \text{ PC3} = 14 \cdot 10^4 \text{ cells/ml} \cdot 4 \text{ ml} = 56 \cdot 10^4 \text{ cells}$

PC3-TRPM8:

Media conta = 8,9 cells

[PC3-TRPM8] = $8,9 \cdot 10^4$ cells/ml

n PC3-TRPM8 = $8,9 \cdot 10^4$ cells/ml \cdot 4 ml = $35,6 \cdot 10^4$ cells

7. Si centrifugano le cellule nella provetta per 5 minuti a 1000 RPM.
8. Si elimina il surnatante con attenzione, cercando di non prelevare il pellet contenente le nostre cellule.
9. Si risospende il pellet recuperato in 1 ml di terreno fresco (RPMI 10%). È utile spipettare più volte per formare una sospensione il più omogenea possibile.
10. Si calcola l'aliquota di sospensione da prelevare per ottenere $5 \cdot 10^4$ cellule da risospendere in una nuova piastra:

n cells calcolato: $V = n \text{ cells voluto} : V \text{ da prelevare}$

PC3:

$V \text{ da prelevare} = (5 \cdot 10^4 \text{ cells} \cdot 1 \text{ ml}) / 56 \cdot 10^4 \text{ cells} = 0.089 \text{ ml} = 89 \mu\text{l}$

PC3-TRPM8:

$V \text{ da prelevare} = (5 \cdot 10^4 \text{ cells} \cdot 1 \text{ ml}) / 35,6 \cdot 10^4 \text{ cells} = 0,140 \text{ ml} = 140 \mu\text{l}$

11. Si preleva il volume calcolato e si mette in una piastra nuova da 20 mm. Si preparano in questo modo due piastre per ognuna delle due linee cellulari.
12. Si aggiungono 3 ml di terreno fresco (RPMI 10%) in ogni piastra.
13. Si incubano le piastre a 37°C per qualche giorno in modo da permettere alle cellule di moltiplicarsi e aderire alla superficie della piastra.

Abbiamo ora quattro piastre pronte per essere trattate e utilizzate per l'imaging.

Il dato che dovete riportare è la concentrazione finale di Fura-2. Altrimenti non date i dati sufficienti per poter ripetere l'esperimento

mi piacerebbe approfon-
dirla meglio, non sono convinto che vi sia chiaro

Se non date le concentrazioni di stock, le indicazioni sui volumi sono assolutamente inutili

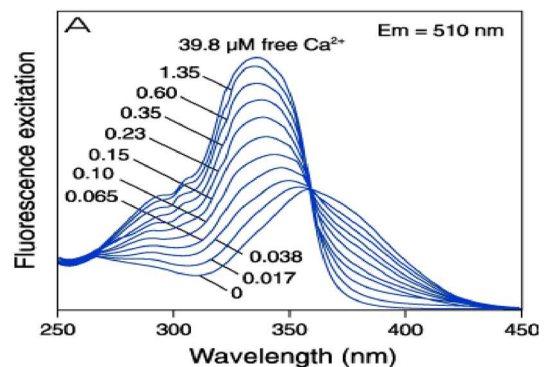
Giorno 3: imaging del Ca^{2+}

Le linee cellulari, PC3 e PC3M8, sono entrambe trattate separatamente con 2 μL di Fura-2 in DMSO (Dimetilsolfossido) 1:500, diluite in 1 ml di terreno di coltura e incubate a 37°C per 40 minuti. Il completo miscelamento della sonda viene assicurato vortexando per qualche secondo.

Fura-2 è un fluoroforo utilizzato come sonda ratiometrica con una alta sensibilità al Ca^{2+} (nell'ordine dei micromolari) ed è quindi utilizzabile per misurare la concentrazione di calcio intracellulare.

Il Fura-2 si trova commercialmente sotto forma di Fura-2AM (AcetoMetilestere) in questo modo è in grado di entrare nella cellula attraversando il doppio strato fosfolipidico, idrofobico. Una volta all'interno della cellula, le esterasi intracellulari tagliano il legame estere rilasciando Fura-2 che, essendo polare, non potrà più uscire dalla cellula. La sonda è eccitabile nell'UV a due diverse lunghezze d'onda, 340 nm e 380 nm.

La sua emissione di fluorescenza a 510 nm è legata alla concentrazione di calcio in maniera differente: l'eccitazione a 340 nm porta ad un assorbimento della radiazione incidente che è direttamente proporzionale alla concentrazione di calcio, mentre, attraverso l'eccitazione a 380 nm, si osserva una proporzionalità inversa tra assorbimento e concentrazione di calcio.



???? siete sicuri di aver testato l'icilina? a che concentrazione?

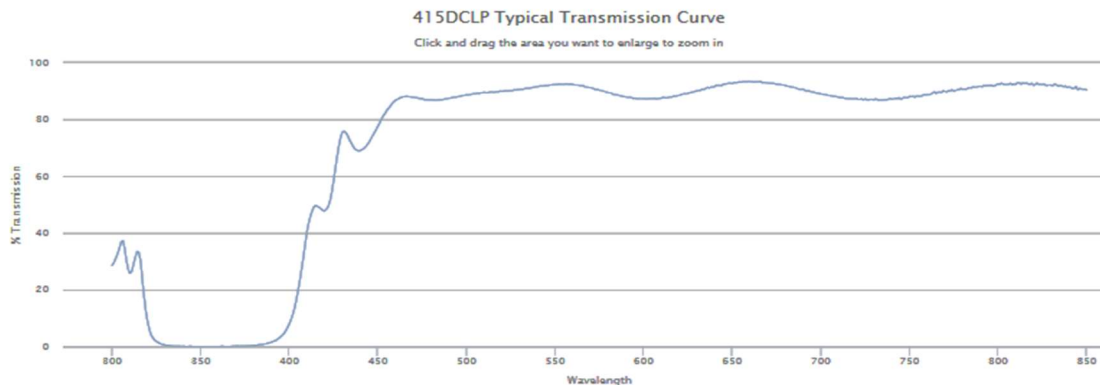
Si prepara a parte la soluzione con l'icilina, agonista coinvolto nell'attivazione dei canali TRPM8. Volendo ottenere una concentrazione finale di 10 μM , si prelevano 5 μL che vengono quindi diluiti in 5 mL di soluzione fisiologica Tyrode standard. I lavaggi con soluzione fisiologica Tyrode standard 10X servono per eliminare l'eccesso di Fura-2 e gli eventuali detriti.

Il vetrino dove si trovano piastrate le cellule viene rimosso, montato sul supporto e alloggiato nel microscopio. È fondamentale prestare particolare attenzione al posizionamento della guarnizione, per evitare che fuoriesca la soluzione e che arrivi così al microscopio, danneggiandolo. Le cellule, inoltre, vengono mantenute a temperatura controllata durante tutto il periodo dell'acquisizione.

L'imaging è effettuato utilizzando una sorgente allo Xenon che emette una luce bianca, quindi contiene tutte le lunghezze d'onda ed è in grado di generare uno spettro continuo. La radiazione viene resa monocromatica mediante un monocromatore, costituito da uno specchio con griglie che diffrange la luce nelle lunghezze d'onda che la compongono, ognuna con angolo differente.

Il software Metafluor regola l'inclinazione dello specchio e seleziona la lunghezza d'onda di interesse che è fatta passare all'interno di un foro e convogliata al microscopio. Quest'ultimo è un microscopio invertito, Nikon Eclipse Ti, che possiede un cubo con tre filtri dove incide la radiazione prima di arrivare al vetrino. In questo cubo non è presente il filtro di selezione perché la radiazione è già stata resa monocromatica. La seconda lente del cubo è uno specchio dicroico inclinato di 45° .

Come è possibile osservare nell'immagine in basso, lo specchio presenta una trasmittanza pari a zero tra 300 e 400 nm, quindi riflette la radiazione di 90° verso una lente trasparente all'UV e raggiunge il campione con Fura-2.



La presenza di due diverse lunghezze d'onda d'eccitazione permette di ottenere una ratio, cioè un rapporto tra l'intensità di fluorescenza con assorbimento a 340 nm e l'intensità di fluorescenza con assorbimento a 380 nm. In questo modo è possibile minimizzare gli effetti dovuti ad un eventuale disomogeneità di distribuzione di Ca^{2+} intracellulare o effetti dovuti al *photobleaching*, normalizzando i dati tramite il rapporto che sarà, quindi, direttamente proporzionale alla concentrazione di calcio.

Durante la prima acquisizione dell'emissione di fluorescenza a 510 nm, si osserva l'apertura di tre finestre, visualizzate sul monitor del computer collegato allo strumento.

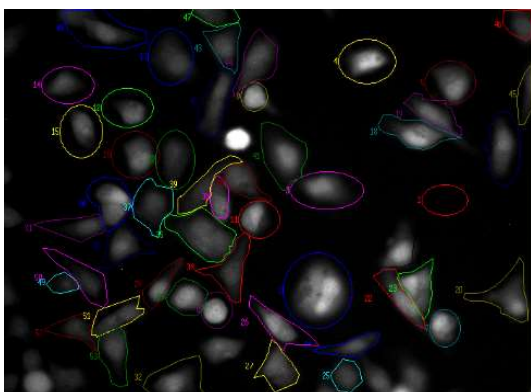
Le finestre mostrano:

- Fluorescenza con eccitazione a 340 nm
- Fluorescenza con eccitazione a 380 nm
- Ratio delle fluorescenze

Per ottenere una migliore visualizzazione della ratio, viene utilizzata una scala di colori che va dal blu al giallo; il viraggio verso il giallo indica un rapporto più alto della ratio che si traduce in una maggiore concentrazione di calcio e quindi un corrispettivo aumento dell'intensità a 340 nm ed una diminuzione dell'intensità a 380 nm.

???? Cos'è?

I dati qualitativi vengono tradotti in dati quantitativi attraverso la selezione di regioni di interesse definite ROI, per ogni cellula se ne delimita l'area e il software misurerà la **min-intensity** nel tempo. La prima regione selezionata è il background che verrà poi sottratto al segnale specifico di ogni ROI per ridurre il rumore di fondo. Non si ha un numero preciso di ROI da selezionare, ma ai fini statistici devono essere il maggior numero possibile.

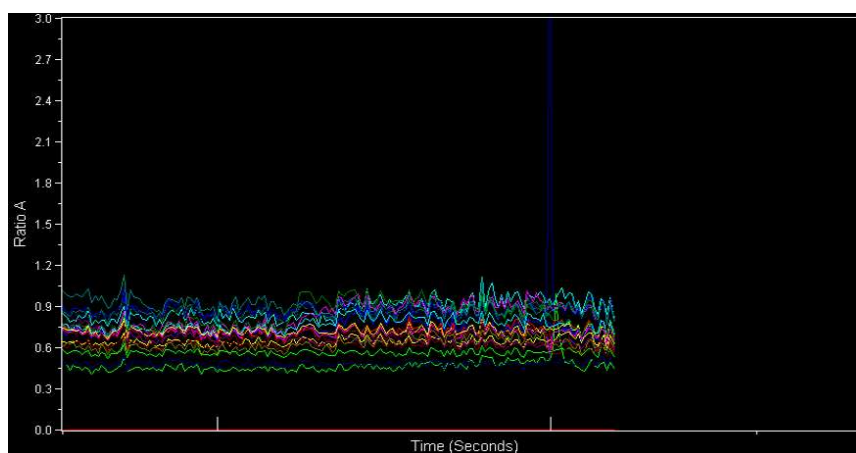


Nel grafico della ratio, ogni cellula è rappresentata con un colore ed una linea che corrisponde al suo andamento nel tempo. Nell'altra finestra abbiamo una linea tratteggiata che si riferisce all'andamento dell'emissione nel tempo dopo l'eccitazione a 340 nm, mentre la linea continua fa riferimento all'andamento dell'emissione nel tempo dopo l'eccitazione a 380nm.

Teoricamente, in risposta ad un aumento di calcio intracellulare, ci si aspetta un abbassamento dell'emissione relativa al 380 nm ed un aumento dell'emissione relativa a 340 nm.

Imponiamo al software di salvare i dati in formato numerico, su un foglio Excel, i quali saranno analizzati successivamente. Il programma Metafluor è, inoltre, in grado di riconoscere i momenti in cui si effettuano cambi di soluzione tramite un apposito comando, ogni stimolo verrà, quindi, salvato insieme ai dati sul file Excel.

Nel grafico si osservano dei segnali in cui le due lunghezze d'onda si muovono nella stessa direzione, non si tratta di un segnale di calcio ma di un artefatto, dovuto al cambiamento delle soluzioni durante l'esperimento.



Dovete mettere i riferimenti
alle figure nel testo,
altrimenti diventa difficile
seguire

Sono trattate prima le PC3 e successivamente le PC3M8 con utilizzo di soluzioni diverse.

WS12 o Icilina???

Per le PC3 sono effettuati 30 cicli in soluzione fisiologica; poi viene aggiunto WS12, l'icilina, un agonista sintetico di canali ionici TRPM8. Sebbene non abbia un'affinità strutturale con il mentolo, produce una forte sensazione di freddo attivando i recettori sensoriali TRPM.

I recettori sensoriali umani TRPM8 sono particolarmente sensibili a questo agonista ed essendo dei canali ionici, la loro attivazione, mediante questo metodo, viene particolarmente usata per studiare i flussi di calcio.

Successivamente si ha un'acquisizione solo in soluzione fisiologica.

Il protocollo utilizzato per le PC3M8 prevede gli stessi passaggi iniziali, come descritto per le PC3, ma in aggiunta vengono effettuati dei cicli con soluzione fisiologica a 0 calcio e 100 cicli con soluzione fisiologica a 0 calcio e con l'agonista WS12.

A seguito del primo stimolo con il competitor WS12 non si è ottenuta risposta, quindi si è proceduto con l'inserimento di una seconda dose di Tyrode + WS12.

Per comprendere se il segnale del calcio sia dovuto o all'entry dallo spazio extracellulare o al *release* di calcio da parte degli *store* intracellulari, effettuiamo un lavaggio in Tyrode Ca^{2+} free e in Tyrode Ca^{2+} -free con l'agonista WS12. Per impedire che gli *store* intracellulari si svuotino, il lavaggio in Tyrode Ca^{2+} free deve avere una durata breve perché, altrimenti gli *store* intracellulari comincerebbero a svuotarsi autonomamente e noi non saremmo più in grado di osservare segnali con l'inserimento di Tyrode Ca^{2+} -free + WS12. Anche nel caso dello stimolo con Tyrode Ca^{2+} -free + WS12 si è proceduto ad inserire due volte la soluzione in modo da avere più possibilità di osservare una risposta.

Sebbene ci si aspettasse una risposta netta delle cellule PC3M8 all'aggiunta della soluzione Tyrod Ca^{2+} + WS12 visualizzabile come un netto aumento dell'intensità di emissione a 340 nm e un calo dell'intensità di emissione a 380 nm, nel nostro caso la maggior parte delle ROI non ha mostrato questo andamento. Per questo si è provato a ripetere l'aggiunta di Tyrode Ca^{2+} + WS12 e, in questo caso, abbiamo osservato un leggero miglioramento nella risposta delle cellule. La mancata risposta potrebbe esser dovuta ad errori degli operatori o ad una non corretta conservazione delle cellule in coltura.

I dati ottenuti vengono elaborati attraverso un'analisi statistica.

Giorno 4: Analisi dati

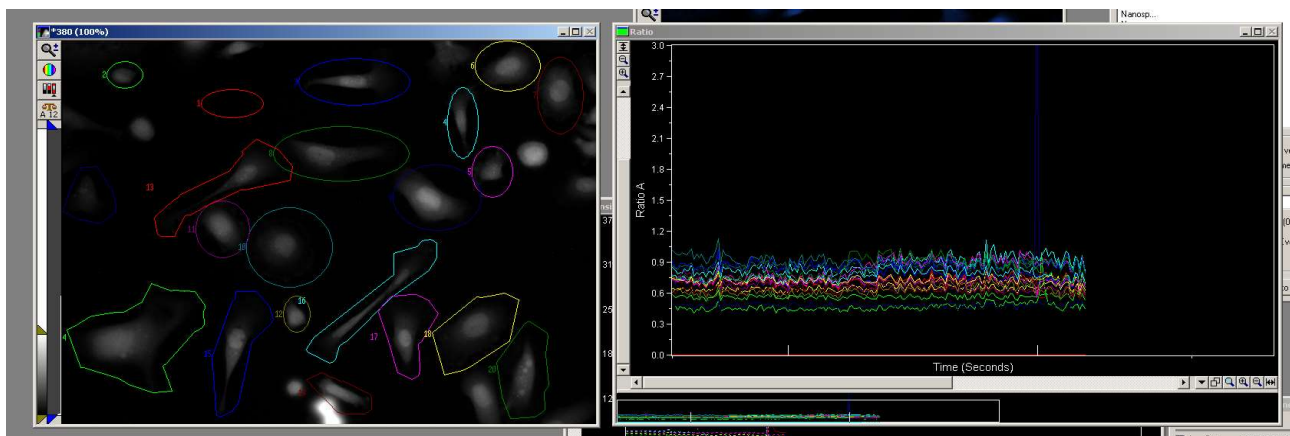
L'elaborazione dei dati qui riportata prende in esame la percentuale di cellule che rispondono attraverso fluorescenza per la linea cellulare PC3 e per la linea PC3M8. Per quest'ultima vengono riportate le condizioni in soluzione fisiologica sia in presenza di calcio che in sua assenza.

PC3 WT

In prima istanza abbiamo analizzato uno spazio vuoto per stimare il valore del background, eliminando nelle rivelazioni successive il bias del rumore di fondo. Il segnale derivante dall'utilizzo della sonda FURA-2 rappresenta la ratio tra 340/380 nm.

Ma perchè Icilina? Avete usato il WS12!

Abbiamo calcolato per prima cosa il basale come la media dei primi 10 valori di ratio prima di inserire l'agonista, **Icilina**. Successivamente abbiamo trovato il massimo tra i valori ottenuti dopo l'introduzione dell'agonista. Questi due dati sono serviti per calcolare l'ampiezza dei picchi come la sottrazione tra il picco e il basale, il processo viene ripetuto per tutti i valori di ratio. La procedura viene effettuata per capire quali tra le cellule prese in analisi rispondono all'Icilina. Una cellula è considerata attivata se la differenza è al di sopra del valore soglia scelto, pari a 0,1.

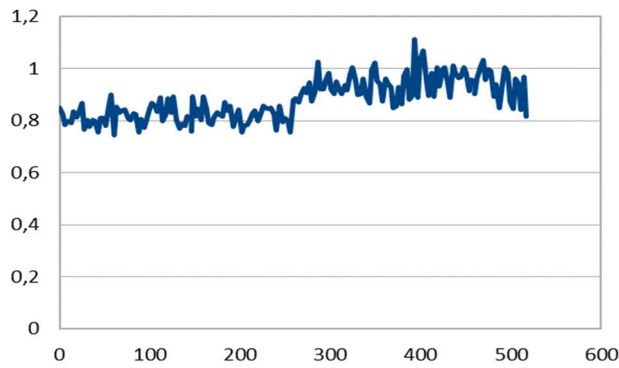


Nelle cellule che rispondono è osservabile un cambio di **tendenza** rispetto al basale. Nel nostro caso non sono stati notati cambiamenti sostanziali. Calcoliamo la deviazione standard per andare a valutare quali valori di risposta accettare e quali no. Su 20 cellule prese in esame solamente 6 hanno risposto significativamente, ciò vuol dire che la percentuale di risposta è del 30%.

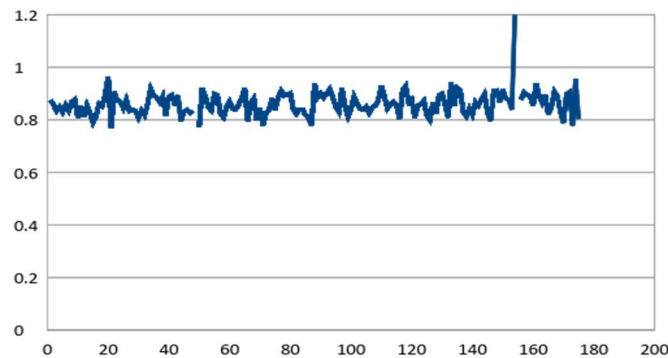
Dai dati presenti in letteratura ci saremmo aspettati una risposta molto maggiore sia nella percentuale di cellule sia nell'intensità della risposta; inoltre nessuna delle 20 cellule ha assunto un comportamento oscillatorio in seguito alla stimolazione.

No: quali dati di letteratura????

mancono le indicazioni degli assi: cosa reppresnetano i numeri?
 manca anche l'indicazione del trattamento: quando avete dato il trattamento?



Il grafico rappresenta una cellula responsiva, si nota infatti un cambiamento nella **tendenza** rispetto al basale.
pendenza



R9 è una ROI non responsiva, in quanto non si registrano variazioni di tendenza rispetto al basale, l'unico segnale ottenuto corrisponde ad un artefatto, per queste ragioni non viene presa in considerazione nell'analisi dei dati.

Per poter rappresentare in un unico grafico tutta la popolazione di cellule e in un altro solo la popolazione di cellule responsive dobbiamo per prima cosa calcolare l'errore per ogni punto.

Errore = deviazione / radici quadrata numerosità.

mancono le indicazioni degli assi: cosa reppresnetano i numeri?
 manca anche l'indicazione del trattamento: quando avete dato il trattamento?

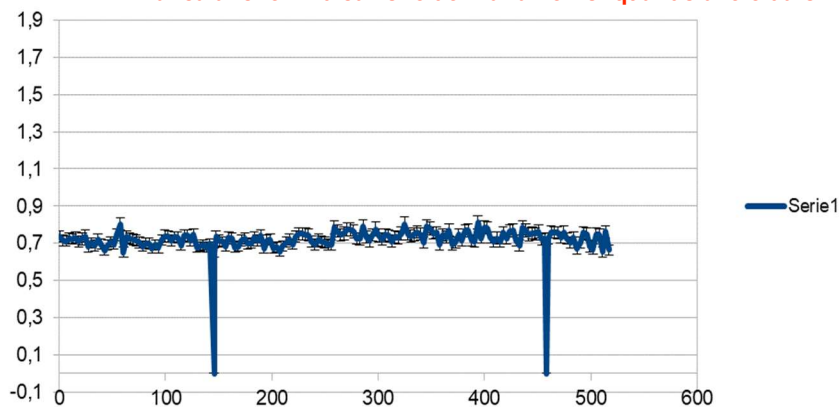


Grafico su tutta la popolazione delle cellule PC3

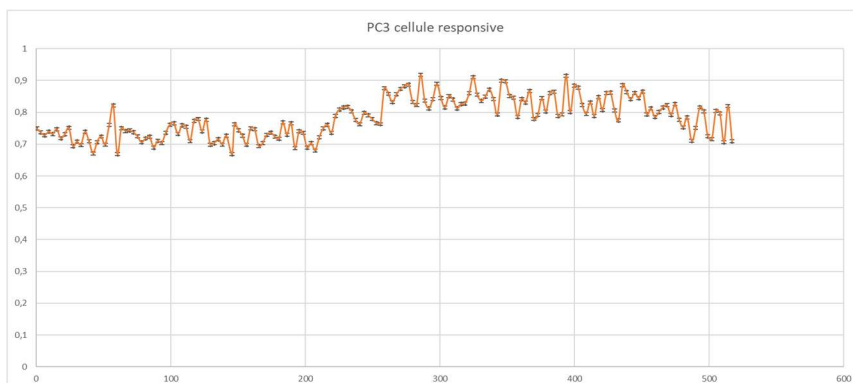
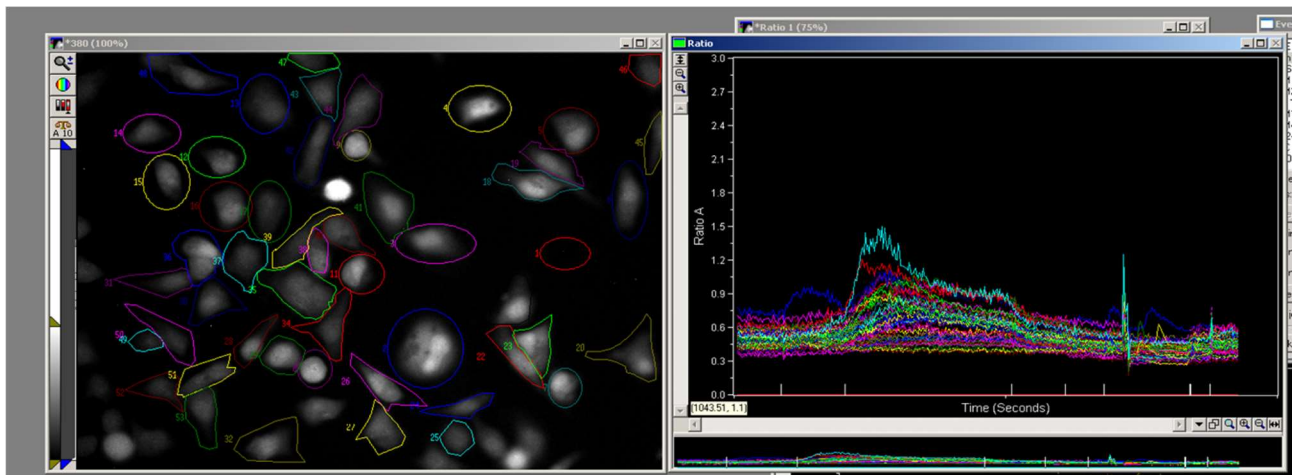


Grafico PC3 responsive

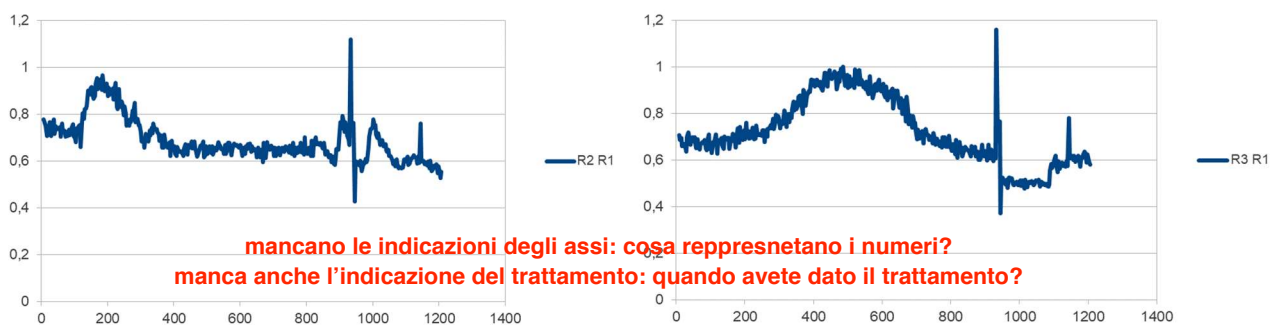
PC3M8

La stessa procedura applicata su PC3 per calcolare l'ampiezza dei picchi e la deviazione è stata applicata per le PC3M8.



Nell'immagine a sinistra sono state cerchiare le cellule prese in analisi e il background. Nell'immagine affianco sono riportate le variazioni della ratio delle rispettive cellule nel tempo prima in presenza di calcio e dopo in assenza di calcio.

La percentuale di risposte ottenute è stata del 71% in presenza di calcio, mentre del 9% in assenza di calcio. Sono quindi riportati alcuni grafici delle singole cellule:



In entrambi i grafici si può notare una risposta in presenza di Ca (tra 265 e 662 secondi). Mentre solo nell' R2 si osserva una risposta in zero calcio, mancante nell'R3 (tra 885 e 1089 secondi). La risposta in R2, tuttavia, non risulta pulita in quanto la misurazione è stata sporcata da un artefatto creato dall'operatore all'aggiunta dell'agonista; infatti anche R3 presenta lo stesso artefatto poco prima dei 1000 secondi.

Vengono riportati i grafici rappresentanti i diversi comportamenti delle cellule, assunti in presenza o assenza dello stimolo con calcio.

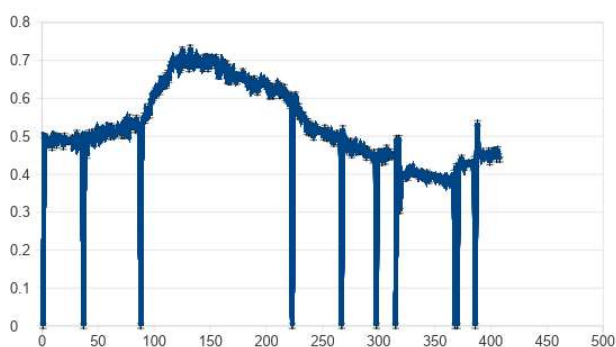


Grafico della risposta di tutta la popolazione di PC3M8

mancano le indicazioni degli assi: cosa rappresentano i numeri?
manca anche l'indicazione del trattamento: quando avete dato il trattamento?

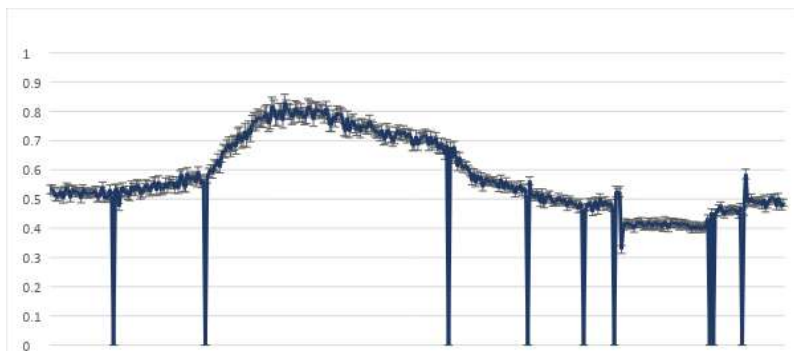


Grafico della risposta media delle cellule responsive in presenza di calcio

L'andamento della popolazione responsive e della popolazione totale risulta molto simile tra loro, questo perché le cellule non hanno risposto quanto ci si aspettava ragion per cui le differenze tra le due popolazioni non risultano particolarmente rilevanti. **Cosa vuol dire???? Non capisco**

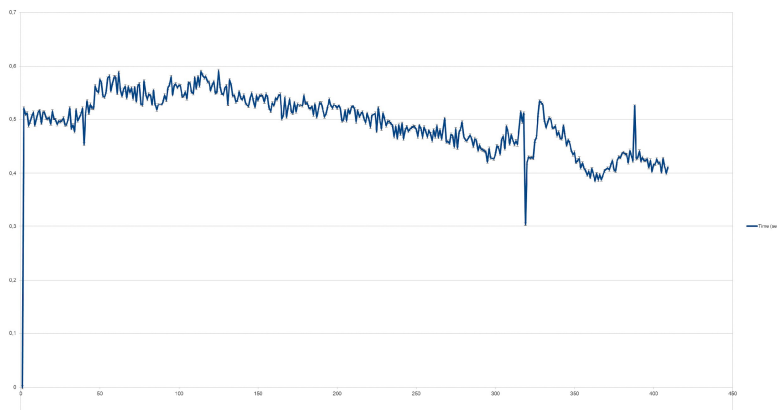
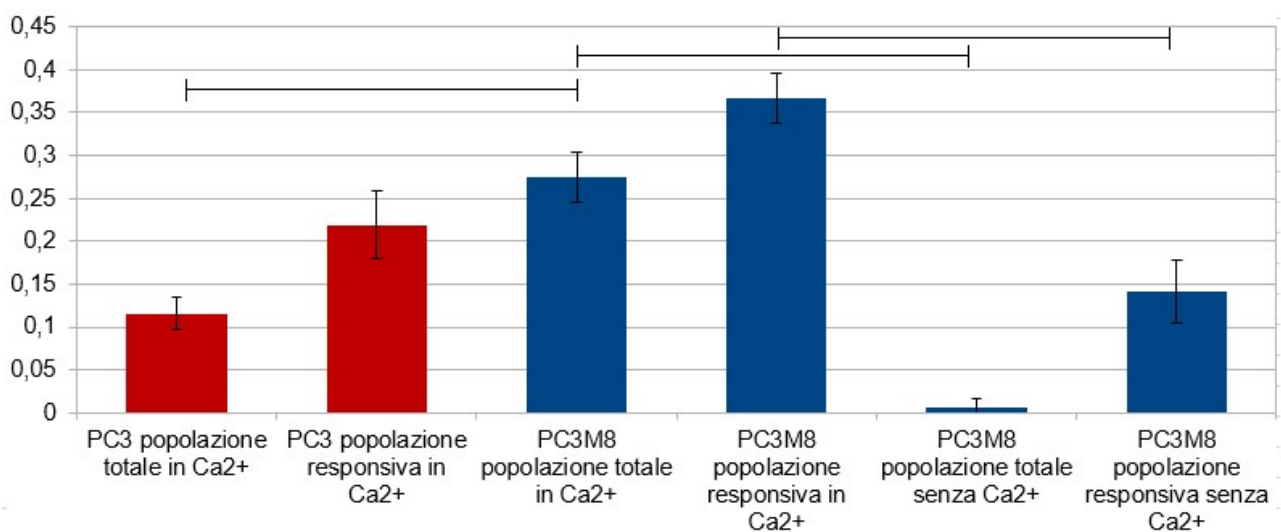


Grafico della risposta delle cellule responsive in assenza di calcio

Dall'analisi dei tre grafici possiamo riscontrare una discreta risposta delle cellule dovuta allo stimolo con calcio. Viceversa, in assenza di calcio la risposta è praticamente nulla e alcune cellule hanno dato un valore addirittura inferiore al basale.

In seguito abbiamo creato un grafico che riassume i principali dati raccolti per sviluppare un profilo generale di risposta relativo ad ogni tipo di cellula e condizione sperimentale.

mancano le indicazioni degli assi: cosa rappresentano i numeri sulle Y?



Perchè
appena
discrimi
nabile?
E'
statistic
amente
diversa
o no?

Come si evince dal grafico le due popolazioni cellulari hanno risposte diverse alla stimolazione dell'agonista WS12. Come ci si aspettava, la popolazione che esprime stabilmente il canale TRPM8 presenta una risposta maggiore rispetto alla linea Wt, valutando sia le popolazioni globali sia unicamente le responsive. Tuttavia, i risultati ottenuti complessivamente non sono incoraggianti, in quanto ci saremmo aspettati una risposta molto più alta nella popolazione PC3M8 che invece risulta appena discriminabile dalla popolazione Wt. Questo è causato da una minore espressione del canale rispetto a quanto riportato nei dati in letteratura.

Le cellule sono trasfettate con un plasmide contenente un gene per la resistenza antibiotica, necessario per la selezione, e il gene per l'espressione del canale TRPM8. Probabilmente la mancanza della risposta è dovuta ad una perdita del plasmide e il terreno non è stato opportunamente addizionato di antibiotico per permettere la selezione, questo ha determinato l'analisi di cellule, forse, non trasfettate.

NOOOO:
Shapiro
è un test
di
normalità

A causa dei risultati poco convincenti e con un errore stimato molto alto non è stato possibile applicare i test parametrici, test di Shapiro o il T-test, che necessitano di dati normalizzati. Si è anche cercato di applicare dei test non parametrici come quello di Wilcoxon, tuttavia, i z-value ottenuti hanno confermato quanto siano poco robusti i risultati. È opportuno, prima di fare ipotesi non sostenute da dati sperimentali, considerare la possibilità di ripetere l'esperimento.

Volendo comunque sfruttare i dati raccolti, possiamo osservare una risposta minore della popolazione Wt rispetto alla PC3M8. Si può apprezzare anche una diminuzione dell'attività di Fura-2 passando dalla soluzione fisiologica con Ca^{2+} alla soluzione priva di Ca^{2+} ; diminuisce anche la percentuale della popolazione responsiva in calcio che raggiunge il 71%, mentre in assenza di calcio arriva solo al 9%. Questo ci permette di dedurre che il canale TRPM8 si localizza sia sulla membrana sia sul reticolo endoplasmatico, in quanto la popolazione responsiva diminuisce ma non scompare del tutto.

In particolare, poiché è presente una diminuzione sostanziale nel numero di cellule responsive e dell'intensità della risposta, è possibile ipotizzare che il canale in questione sia maggiormente localizzato nella membrana cellulare e che quindi la corrente generata sia principalmente una corrente *inward*. L'ipotesi è avvalorata dalla presenza in letteratura di evidenze sperimentali che identificano l'attività del canale anche in seguito a stimolazione.