



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Galileo Galilei”

Corso di Laurea in Fisica

Tesi di Laurea

Studio del rilascio di ATP da parte degli emicanali di
connessina 32 mediante tecniche biofisiche

Relatore
Prof. Mario Bortolozzi

Laureando
Giacomo Toso

Correlatore
Dr.ssa Simona Pisu

Anno Accademico 2019/2020

SOMMARIO

ABSTRACT	3
1 INTRODUZIONE	4
1.1 Connessina 32 e neuropatia Charcot-Marie-Tooth.....	4
1.1.1 Connessina 32	4
1.1.2 ATP - Adenosina trifosfato	5
1.1.3 Neuropatia Charcot-Marie-Tooth e ipotesi del ruolo della Cx32	6
1.1.4 Obiettivi dello studio e della tesi	7
1.2 Biosensori dell'ATP	8
1.2.1 ATeam's family [5].....	8
1.2.2 eCAT3.10 [2].....	9
1.2.3 QUEEN [6].....	11
1.2.4 Perceval e PercevalHR [7, 8]	12
1.3 <i>Imaging</i> a Fluorescenza e FRET	13
1.3.1 Fluorescenza.....	13
1.3.2 GFP – <i>Green Fluorescent Protein</i>	14
1.3.3 FRET.....	15
2 MATERIALI E METODI.....	20
2.1 Coltura cellulare e trasfezione	20
2.2 Setup sperimentale	21
2.3 <i>Imaging</i> e protocollo di acquisizione	22
2.4 Analisi dei dati	24
3 RISULTATI	25
3.1 Ottimizzazione del protocollo di acquisizione delle immagini	25
3.1.1 Verifica dell'espressione, localizzazione e risposta del biosensore eCAT	25
3.1.2 Variazione delle pause tra i frame dell'acquisizione	27

3.2 Risultati con protocollo di acquisizione veloce ottimizzato.....	31
4 DISCUSSIONE.....	34
5 CONCLUSIONI.....	38
6 BIBLIOGRAFIA.....	39

ABSTRACT

La più comune neuropatia periferica ereditaria, la forma X della malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT1X), è causata da mutazioni nel gene *GJB1*, che codifica per la connessina 32 (Cx32); i pazienti con CMT1X sviluppano amiotrofia e debolezza muscolare, insieme ad anomalie sensoriali che risultano più pronunciate alle estremità degli arti, causando difficoltà di deambulazione e dolore che possono richiedere ausili protesici e farmacologici.

Recenti studi biofisici suggeriscono che la funzione svolta dagli emicanali di Cx32 nelle cellule di Schwann possa essere coinvolta nella patogenesi della malattia. In particolare, i meccanismi di segnalazione extracellulare mediati dall'adenosina trifosfato (ATP) nelle cellule di Schwann potrebbero essere fondamentali per il processo di mielinizzazione degli assoni, e dunque un'alterazione nel rilascio di ATP da parte degli emicanali di Cx32 potrebbe essere alla base della CMT1X.

La presente tesi ha avuto l'obiettivo di caratterizzare il biosensore dell'ATP eCAT3.10, con lo scopo di porre le basi per un protocollo di misura dell'ATP rilasciato dagli emicanali di Cx32 sani o recanti mutazioni CMT1X. Risultato più significativo della tesi è stato la derivazione di una curva dose-risposta ATP-rapporto di fluorescenza del biosensore eCAT3.10 che potrà essere utilizzata per tale protocollo di misura.

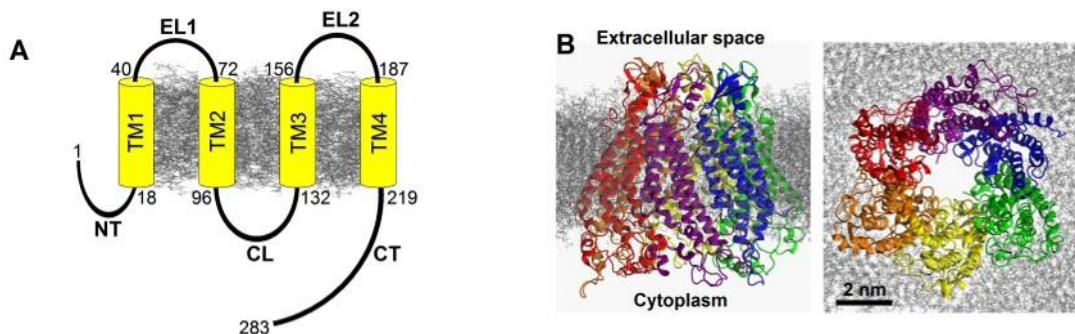
1 INTRODUZIONE

1.1 Connessina 32 e neuropatia Charcot-Marie-Tooth

1.1.1 Connessina 32

Le Connessine (Cx) sono proteine transmembrana costituite da sei subunità di connessina, ciascuna delle quali formata da quattro segmenti transmembrana, e mettono in comunicazione il citoplasma con l'ambiente intercellulare formando un emicanale (o connessone); quando due emicanali di due cellule adiacenti si trovano a contatto, essi si uniscono creando un canale di *gap junction* (GJ). La famiglia delle connessine è ordinata in base al peso atomico delle diverse proteine oppure in base al gene che le codifica.

La Connessina 32 (Cx32) è una proteina di 32 kDa della famiglia delle connessine espressa in numerosi tessuti fra cui il fegato ed il sistema nervoso centrale e periferico; a livello del sistema nervoso periferico la si trova in piccoli aggregati intracellulari, detti canali di *gap junction*, presenti in regioni non compatte della mielina delle cellule di Schwann (SC), quando gli esameri di Cx32 che si trovano su strati adiacenti di mielina si uniscono fornendo un rapido percorso radiale diffusivo tra la regione abassonale e quella adassonale. Ciò ha portato alla proposta che i canali giunzionali di Cx32 siano fondamentali per il passaggio di ioni K^+ e di molecole messaggere attraverso la guaina mielinica delle cellule di Schwann, la cui funzione non è solo quella di mielinizzare gli assoni ma anche di mantenerne l'integrità funzionale nel lungo termine [1].



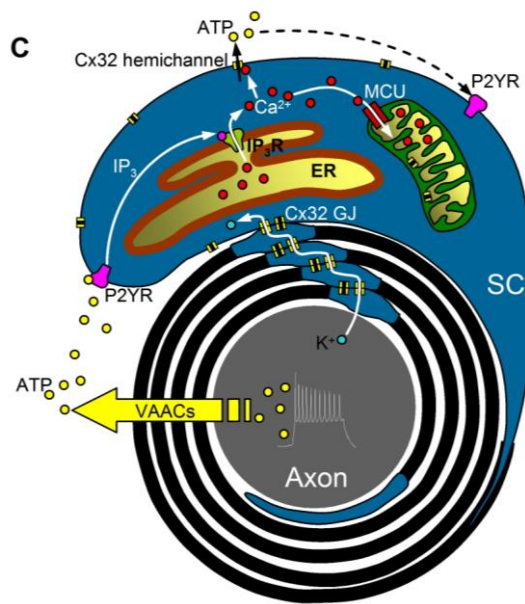


Figura 1.1. Topologia / struttura della proteina Cx32 e sue possibili funzioni nelle SC mielinizzate. (A) Domini della proteina Cx32 con indicazione degli intervalli amminoacidici (± 1 amminoacido). (B) Vista laterale (pannello di sinistra) e citoplasmatica (pannello di destra) del modello atomistico dell'emicanale di Cx32 wild type (WT), derivato mediante dinamica molecolare e omologia di sequenza dalla struttura cristallografica ad alta risoluzione della connessina 26 (Cx26). Le singole Cx32 sono raffigurate con colori diversi. (C) L'attività elettrica dei nervi mielinizzati innesca il rilascio assonale di K^+ , il cui riciclo potrebbe coinvolgere le GJ di Cx32 localizzate nei paranodi delle cellule di SC e nelle fessure di Schmidt-Lanterman.

1.1.2 ATP - Adenosina trifosfato

L'adenosina trifosfato, o ATP, è un nucleotide formato da una base organica azotata, l'adenina, dal ribosio, uno zucchero pentoso, e da tre gruppi fosfato inorganici; esso svolge il ruolo di principale mediatore nel metabolismo energetico della cellula, essendo il tramite tra le reazioni esoergoniche, che generalmente costituiscono le vie cataboliche, e le reazioni endoergoniche, le quali fanno generalmente parte delle vie anaboliche. Questo avviene tramite l'idrolisi della molecola in ADP, adenosina difosfato, con la cessione di un gruppo fosfato che, se non trasferito ad un'altra molecola, viene liberato come fosfato inorganico. A livello intercellulare esso è un componente fondamentale della segnalazione purinergica, la quale entra in gioco in molti processi fisiologici fondamentali come la

comunicazione tra neuroni e cellule gliali, la risposta immunitaria, l'infiammazione, e anche in condizioni fisiopatologiche come il cancro [2]. L'ATP è rilasciato nell'ambiente extracellulare in varie modalità, tra cui l'esocitosi stimolata o il passaggio conduttivo attraverso emicanali, e si lega ai recettori purinergici, in particolare il P2X e il P2Y, diventando un agente endocrino e paracrino. Per esempio, in un contesto di risposta immunitaria, l'ATP rilasciato da cellule apoptotiche in un tessuto sano agisce come segnale chemiotattico per i fagociti [2]. Tramite le ectonucleotidasi cellulari, come la CD39 e la CD37, l'ATP extracellulare viene indrolizzato in ADP, AMP e adenosina, e può in tal modo interagire con la totalità dei recettori purinergici.

1.1.3 Neuropatia Charcot-Marie-Tooth e ipotesi del ruolo della Cx32

Le mutazioni nel gene *GJB1*, che codifica per la Cx32, causano la forma X della malattia di Charcot-Marie-Tooth (CMT1X), la più comune neuropatia periferica ereditaria, per la quale non esiste ancora una cura [3]. I pazienti con CMT1X sviluppano amiotrofia e debolezza muscolare, insieme ad anomalie sensoriali che risultano più pronunciate alle estremità degli arti, causando difficoltà di deambulazione e dolore che possono richiedere ausili protesici e farmacologici. Il mutante che scatena la patologia attualmente più studiato è dovuto al troncamento del C-terminale della *GJB1* dovuto a mutazione R220X.

Recenti studi suggeriscono che la funzione svolta dagli emicanali di Cx32 nelle Cellule di Schwann potrebbe essere coinvolta nella patogenesi della malattia [4]: un numero crescente di dati indica che la segnalazione paracrina ATP-mediata nelle SC è fondamentale per il processo di mielinizzazione e dunque l'alterazione nel rilascio di ATP da parte degli emicanali di Cx32 potrebbe essere alla base della CMT1X. Ad oggi si sa poco riguardo il meccanismo che controlla l'apertura e la chiusura (*gating*) degli emicanali di Cx32 in condizioni fisiologiche, tuttavia è stato recentemente scoperto che gli emicanali di Cx32 che recano la mutazione R220X non si aprono in risposta ad una tipica cascata di segnalazione purinergica che eleva il Ca^{2+} citosolico. Questa evidenza *in vitro* suggerisce che l'alterazione del segnale paracrino dovuta

alla disfunzione dell'emicanale di Cx32 sia alla base della patogenesi della CMTX1 [4].

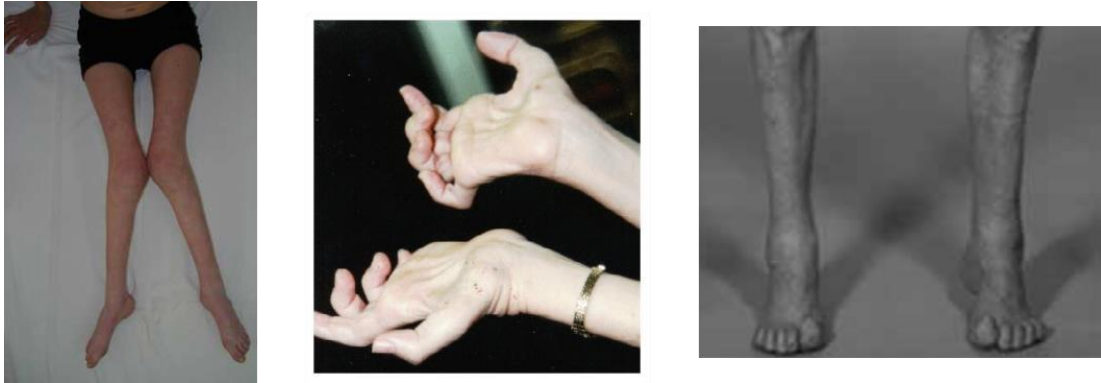


Figura 1.2. Esempi di sintomi della forma X della neuropatia Charcot-Marie-Tooth

1.1.4 Obiettivi dello studio e della tesi

Lo studio del rilascio di ATP da parte degli emicanali di Connexina 32 si inserisce in un quadro di studi volti a conoscere in modo più approfondito le cause e le modalità dello sviluppo della neuropatia CMT1X, nell'ottica di trovarne una cura. La presente tesi ha avuto l'obiettivo di caratterizzare il biosensore eCAT3.10, con lo scopo di elaborare un protocollo di misura dell'ATP rilasciato dagli emicanali di Cx32 sani o mutazioni CMT1X espressi in cellule modello. Scopo finale della tesi è stato la derivazione di una curva dose-risposta ATP-rapporto di fluorescenza del biosensore eCAT3.10 che potrà essere utilizzata per studi futuri.

1.2 Biosensori dell'ATP

L'esigenza di disporre di uno strumento per la misura della concentrazione di ATP, sia intracellulare che extracellulare, rappresenta un importante stimolo che nell'ultimo decennio sta dando vita a sonde e metodi sempre più precisi e adatti alle diverse esigenze. Di seguito sono elencati i principali biosensori utilizzati in letteratura, tra i quali il secondo, l'eCAT3.10, è oggetto di studio di questa tesi.

1.2.1 ATeam's family [5]

L'ATeam fu sviluppata per sondare l'ATP intracellulare tramite FRET, ed è costituita da un sito attivo, la subunità ϵ dell'FOF1-ATP sintasi batterica, cui sono state aggiunte due proteine fluorescenti, la mseCFP, variante della CFP, e la mVenus, variante della YFP, entrambi fluorofori discendenti dalla GFP (*Green Fluorescent Protein*).

La subunità ϵ dell'FOF1-ATP sintasi è una delle più piccole proteine note capace di legarsi all'ATP (14 kDa), e si presume funga da regolatore dell'attività dell' F_0F_1 -ATP sintasi stessa in base al livello di ATP interno alla cellula; essa offre diversi vantaggi ad una sonda basata sul trasferimento di energia per risonanza, tra cui il fatto che si lega all'ATP senza idrolizzarlo, la sua alta specificità per la molecola e non per altri nucleotidi fosfati, come l'ADP o l'AMP, e infine il grande cambiamento strutturale in cui incorre legandosi all'ATP, del tutto reversibile: essa infatti è costituita da un foglietto β N-terminale e da due α eliche C-terminali; quando la proteina si lega all'ATP, le due α eliche si avvicinano tra di loro, secondo lo schema a pagina seguente, facendo in tal modo avvicinare le due molecole fluorescenti, determinando un aumento del segnale di FRET (*gain of FRET*).

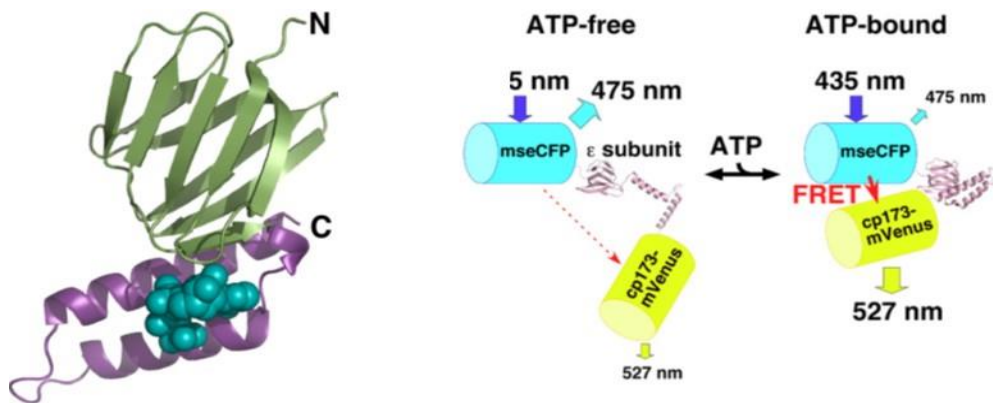


Figura 1.3. [5] Struttura tridimensionale della subunità ϵ dell'FOF1-ATP sintasi batterica legata all'ATP nell'immagine di sinistra, dove si possono distinguere il foglietto β N-terminale e le due α eliche C-terminali vicine tra loro poiché legate all'ATP, rappresentato con un modello a sfere di colore ciano. Nell'immagine di destra si ha una rappresentazione schematica del meccanismo di funzionamento dei biosensori della famiglia dell'ATeam (Cfr. par. 1.3.3).

1.2.2 eCAT3.10 [2]

La sonda eCAT3.10, prodotta dal laboratorio di Matthew Tantama dell'università di Purdue (Indiana, USA), è una discendente della famiglia delle sonde ATeam.

Il punto di partenza per la sintesi dell'eCAT è stata la variante ATeam3.10, sonda solubile che può fornire un segnale raziometrico di fluorescenza, il quale facilita gli studi quantitativi su cellule *in vivo* normalizzando rispetto al livello di espressione e al *photobleaching* del segnale; inoltre risulta essere una variante a più alta affinità e con sensibilità maggiore nel range stimato della concentrazione fisiologica di ATP extracellulare. Per fare in modo che tale sensore sia indirizzato verso la superficie esterna della cellula, si è preso spunto da tecniche già consolidate nella creazione di sensori per il glutammato extracellulare: l'ATeam3.10 è stato inserito tra la sequenza su dominio N-terminale di una IgK e un dominio ancora transmembrana su sequenza C-terminale del recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*); queste modifiche indirizzano la sonda verso la via secretoria e la legano alla membrana cellulare. È stata battezzata eCAT3.10, cioè *extracellularATeam3.10*.

Il produttore ha testato la sonda in primis su cellule Neuro2A. Egli dichiara che la localizzazione del sensore sulla superficie esterna della membrana cellulare sia

chiaramente visibile anche con un microscopio a epifluorescenza; inoltre le cellule manifestano dei “punti fluorescenti” interpretabili come accumuli di proteine fluorescenti a livello del reticolo endoplasmatico, fenomeno già osservato in altri sensori a fluorescenza. L’analisi della risposta della sonda risulta fattibile sia tramite microscopi confocali, tramite i quali si evidenzia facilmente la provenienza del segnale dalla superficie cellulare, sia con microscopi a epifluorescenza, come fatto dallo stesso produttore, poiché il segnale raccolto su tutta la cellula rispecchia la risposta della membrana.

Dai test risulta che alla concentrazione di ATP 100 μ M la sonda raggiunge un aumento massimo del segnale di *ratio* YFP/CFP pari a 0.27 ± 0.01 , che corrisponde ad un picco di segnale di 1.127 ± 0.005 normalizzato rispetto alla fluorescenza prestimolo (media \pm errore standard della media, n = 41 cellule); gli esperimenti dimostrano che la sonda è reversibile, e quindi impiegabile per rilevare variazioni nella concentrazione dell’ATP.

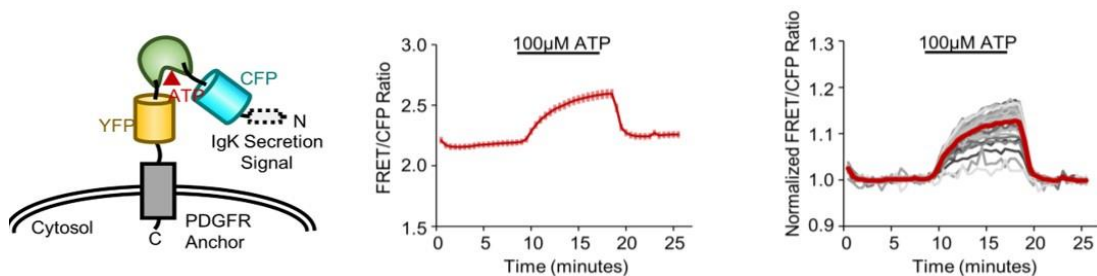


Figura 1.4. [2] Rappresentazione schematica della struttura del biosensore eCAT3.10 sulla sinistra; al centro andamento del rapporto (“ratio”) dei segnali di fluorescenza YFP/CFP alla concentrazione di ATP 100 μ M, dove si riscontra un aumento massimo pari a 0.27 ± 0.01 ; a sinistra media dei ratio normalizzati rispetto alla fluorescenza prestimolo.

1.2.3 QUEEN [6]

La sonda QUEEN, acronimo per *quantitative evaluator of cellular energy*, è un sensore a singola lunghezza d'onda, utilizzabile per misurare la concentrazione di ATP intracellulare; essa è costituita da una proteina fluorescente, la cpEGFP, inserita tra le due α -eliche della subunità ϵ dell' F_0F_1 -ATP sintasi batterica.

Infatti la principale complicazione nell'uso di sensori FRET in cellule dall'alto tasso di crescita risiede nel fatto che si può verificare che i due fluorofori necessari per la raccolta del segnale siano prodotti con tempi differenti, dando luogo a sonde incomplete e inabili; QUEEN nasce proprio con l'obiettivo di ottenere una sonda sensibile all'ATP la cui efficacia non dipenda dalla velocità di crescita della cellula ospite, rendendola in tal modo utilizzabile anche in batteri, dato che il loro tasso di crescita varia su un ampio intervallo di ordini di grandezza.

Di questa sonda sono state realizzate tre varianti:

- QUEEN-7 μ , basata sulla subunità ϵ del batterio termofilo *Bacillus PS3*; questa variante possiede la più alta affinità con l'ATP;
- QUEEN-2m, derivata dalla QUEEN-7 μ con un parziale scambio della sequenza con la subunità ϵ del batterio *Bacillus subtilis*, ideata per avere un'affinità più bassa in maniera da renderla utilizzabile per la misura del livello di ATP fisiologico;
- QUEEN-NA (*no affinity*), con un mutazione del sito di legame all'ATP che la rende insensibile alla molecola; è utilizzata negli esperimenti di controllo.

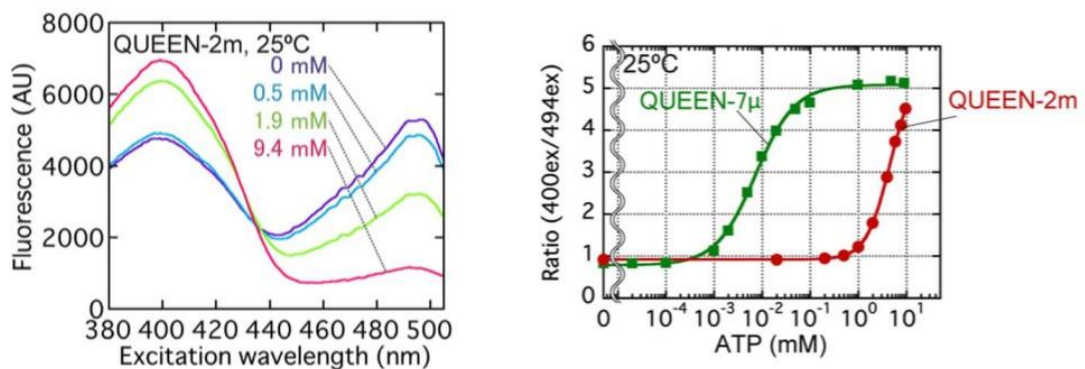


Figura 1.5. Andamento del segnale di fluorescenza in base alla lunghezza d'onda d'eccitazione per il biosensore QUEEN-2m e confronto curva dose-risposta con la variante QUEEN-7 μ (in ordinata il ratio tra i segnali a 400 e 494 nm)

1.2.4 Perceval e PercevalHR [7, 8]

La sonda Perceval, pubblicata nel 2009 e disponibile nella banca di plasmidi *addgene*, è stata costruita combinando una variante della GFP con una proteina regolatrice di origine batterica, la GlnK1, dall'archeobatterio *Methanococcus jannaschii*. Essa ha una soglia di sensibilità all'Mg-ATP inferiore alla concentrazione di 100nM, caratteristica che si ritrova in altre proteine della famiglia delle proteine regolatrici PII; tale soglia è sorprendentemente bassa paragonata alle concentrazioni di ATP intracellulare che solitamente cadono nell'ordine della millimolarità.

L'ADP si lega allo stesso sito attivo del sensore, diventando un competitore dell'Mg-ATP, ma produce un piccolo cambio nel segnale di fluorescenza. Alle concentrazioni fisiologiche di ATP e ADP il sito di legame è saturato, ma la competizione tra i due nucleotidi rende il sensore una sonda quasi ideale del rapporto delle concentrazioni ATP:ADP; Perceval può dunque essere utilizzato per monitorare il rapporto delle concentrazioni di ATP e ADP intracellulari durante l'*imaging* di cellule *in vivo*.

PercevalHR nasce come variante del precedente sensore, pubblicata nel 2013 e disponibile su *addgene*, ottimizzata per il range del rapporto di concentrazione ATP:ADP atteso nelle cellule dei mammiferi, e può essere usato in microscopia *in vivo* con assorbimento lineare o a due fotoni. I produttori l'hanno testato su neuroni, visualizzando i cambiamenti del rapporto ATP:ADP in dipendenza da stimoli multipli, dimostrando che è uno strumento sensibile alle variazioni corrispondenti al consumo o alla produzione di energia; inoltre è stato utilizzato per visualizzare il rapporto ATP:ADP intracellulare con simultanea misura della corrente attraverso i canali potassio ATP-dipendenti (K_{ATP}), dimostrando che PercevalHR permette di studiare le variazioni coordinate nel rapporto ATP:ADP e la probabilità di apertura dei canali K_{ATP} .

1.3 *Imaging* a Fluorescenza e FRET

1.3.1 Fluorescenza

Dal punto di vista spettroscopico, lo spettro energetico delle molecole è descrivibile in termini di potenziali che tengono conto delle varie tipologie di contributi energetici che coesistono in esse: gli stati elettronici e di spin dovuti agli elettroni molecolari, caratterizzati da bande molto energetiche ed eccitabili attraverso l'uso di radiazioni nel visibile e nell'ultravioletto; stati vibrazionali dovuti al moto relativo dei nuclei atomici all'interno della molecola, che presentano differenze energetiche più moderate e corrispondenti a radiazioni nella regione degli infrarossi; stati rotazionali dovuti ai moti collettivi dei nuclei atomici, caratterizzati da salti energetici ancor più ridotti, tipici delle radiazioni nello spettro delle microonde.

Nelle molecole biatomiche la sommatoria di questi contributi è ben descritta dal potenziale di Morse; lo spettro energetico di una molecola biatomica risulta quindi caratterizzato da una serie di stati energetici elettronici, rappresentabili da un potenziale di Morse dallo stato fondamentale (*ground state*) S_0 a stati via via più eccitati, S_1 , S_2 , ecc., ciascuno dei quali è suddiviso in sottolivelli dovuti ai contributi rotazionali e vibrazionali.

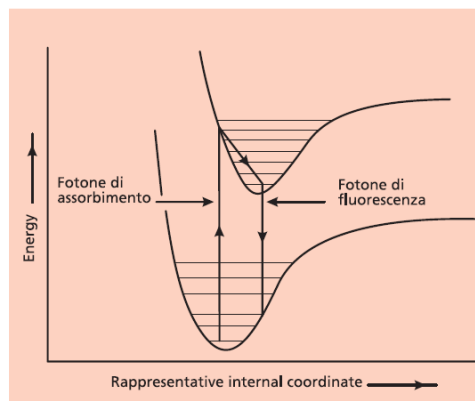


Figura 1.6. *Rappresentazione schematica del potenziale di Morse e del fenomeno dell'emissione di fluorescenza.*

Il fenomeno della fluorescenza si ha quando l'elettrone di un fluoroforo (molecola fluorescente), assorbendo radiazione elettromagnetica nel visibile o nell'ultravioletto con intervalli temporali tipici dell'ordine dei femtosecondi (10^{-15} s),

viene eccitato dallo stato fondamentale S_0 ad un livello energetico vibrazionale più alto di uno stato elettronico superiore, per esempio il primo stato eccitato S_1 ; prima di ritornare allo stato fondamentale, avviene un rilassamento interno allo stato S_1 tra la banda vibrazionale occupata dall'elettrone ed una inferiore, processo della durata tipica dei picosecondi (10^{-12} s) durante il quale la differenza di energia tra le due bande viene emessa sotto forma di energia termica vibrazionale. Infine, nel diseccitarsi fino al *ground state*, l'elettrone compie un salto energetico inferiore rispetto a quello compiuto nell'eccitazione, emettendo così un fotone di fluorescenza ad una frequenza minore e lunghezza d'onda maggiore rispetto alla radiazione incidente.

Il fenomeno è ben descritto dai diagrammi di Jablonski, strumenti utili per la descrizione dei vari tipi di transizioni molecolari, radiative e non. Un altro modo per descrivere sinteticamente il fenomeno nelle sue varie fasi è il seguente schema, che separa la fase di eccitazione, la fase di rilassamento non radiativo e l'emissione della luce di fluorescenza:

- Eccitazione: $S_0 + h\nu_{ex} \rightarrow S_1^*$
- Rilassamento: $S_1^* \rightarrow S_1 + heat$
- Fluorescenza: $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{em}$

1.3.2 GFP – *Green Fluorescent Protein*

La Green Fluorescent Protein, o GFP, è una proteina fluorescente naturalmente espressa da molti organismi marini; tradizionalmente, per riferirsi alla prima proteina isolata dalla medusa *Aequorea Victoria*, si usa l'acronimo avGFP o wtGFP (*wild type*)[9]. Essa presenta un picco principale di eccitazione alla lunghezza d'onda di 395 nm e uno secondario a 475 nm con un rapporto di intensità di 6:1, mentre emette a 509 nm, nella regione dello spettro visibile relativa al verde. Fu purificata e studiata per la prima volta negli anni 60 e 70 da Osamu Shimomura, e successivamente studiata dal laboratorio di Martin Chalfie e di Roger Y. Tiesen, tutti e tre insigniti nel 2008 del premio Nobel per la Chimica.

Dalla wtGFP, con la mutazione a punto singolo S65T si ottenne la GFP/S65T, con un miglioramento delle caratteristiche del fluoroforo: aumento della fluorescenza, fotostabilità e spostamento del picco principale di eccitazione a 488 nm, mantenendo il picco di emissione a 509 nm; in seguito a ulteriori miglioramenti, essa venne chiamata EGFP (*enhanced*)[10].

Altri fluorofori derivati dalla wtGFP sono le *blue fluorescent protein*, BFP, la famiglia delle *cyan fluorescent protein* di cui fa parte la CFP, e le *yellow fluorescent protein*, cui appartiene la YFP, quest'ultima ottenuta dalla sostituzione di un singolo amminoacido nella struttura della wtGFP, il T203Y.

L'utilizzo della GFP rispetto ad altre proteine fluorescenti nell'ambito della ricerca è incentivato da sue importanti peculiarità, quali la fluorescenza a temperatura ambiente, senza bisogno di enzimi, cofattori o fonti energetiche diverse dalla radiazione d'eccitazione; inoltre essa non è fototossica come altre molecole fluorescenti, quali ad esempio la FITC (isotiocianato di fluoresceina), risultando molto utile negli esperimenti *in vivo*. Queste proprietà la rendono un utile gene reporter, vale a dire un gene utilizzato per studiare l'attività di sequenze regolatrici di altri geni di interesse, e come altri geni reporter può essere facilmente impiegata per controllare l'efficienza di trasfezione, inserendo la sua sequenza nucleotidica nel DNA che codifica l'espressione della proteina oggetto di studio. Può inoltre fungere da indicatore per processi interni alla cellula, come il ripiegamento delle proteine, il trasporto delle stesse o le dinamiche dell'RNA. Infine dall'utilizzo di due fluorofori derivati dalla GFP, di solito rispettivamente uno della famiglia delle CFP e l'altro delle YFP, nell'ambito della microscopia a fluorescenza è stata sviluppata la tecnica del FRET.

1.3.3 FRET

Il trasferimento di energia per risonanza (FRET, dall'inglese *Fluorescence Resonance Energy Transfer* o *Förster Resonance Energy Transfer*) è un fenomeno fisico descritto dal chimico e fisico tedesco Theodor Förster nel 1959. Si tratta di un trasferimento energetico tra due fluorofori, uno detto "donatore" e l'altro

“accettore”: eccitando il primo con un’onda luminosa ad una specifica lunghezza d’onda, tipicamente quella corrispondente al suo picco di eccitazione, esso emette fluorescenza; se vicino ad esso è collocato un altro fluoroforo con uno spettro di assorbimento sovrapposto allo spettro di emissione del primo, condizione che corrisponde al fatto che i salti energetici associati alla diseccitazione dell’uno e all’eccitazione dell’altro sono comparabili, anche il secondo emette luce di fluorescenza. Il trasferimento energetico che avviene tra le due molecole non è veicolato da una radiazione elettromagnetica, dunque non c’è emissione di fotoni, ma avviene tramite interazione dipolo-dipolo: eccitandosi, il donatore diventa assimilabile ad un dipolo oscillante, il quale può trasferire energia ad un secondo dipolo ad una particolare frequenza di risonanza in maniera simile all’interazione tra oscillatori accoppiati. In questo modo il fenomeno non è sensibile al tipo di solvente in cui si trova il campione, poiché non c’è alcuna dipendenza dall’indice di rifrazione del mezzo.

L’efficienza del FRET dipende da diversi parametri fisici che si possono raggruppare in:

- distanza tra il donatore e l’accettore (tipicamente nel range di 1-10 nm);
- sovrapposizione degli spettri di emissione del donatore e di assorbimento dell’accettore;
- relativa orientazione dei momenti di dipolo dei due fluorofori.

Per massimizzare il trasferimento di energia è conveniente scegliere due fluorofori tali da avere la maggior sovrapposizione possibile dello spettro di emissione del donatore e di eccitazione dell’accettore. Al contempo è necessario che la lunghezza d’onda d’emissione delle due molecole sia diversa, altrimenti si avrebbero problemi nel distinguere le due emissioni di fluorescenza.

Per quantificare la sovrapposizione degli spettri si definisce l’integrale di *overlap*:

$$J = \frac{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} F_D(\lambda) d\lambda}$$

ove $F_D(\lambda)$ è l'intensità di fluorescenza dello spettro del donatore in funzione della lunghezza d'onda, $\varepsilon_A(\lambda)$ è il coefficiente di assorbimento molare dell'accettore.

Il trasferimento di energia può essere descritto da una costante di velocità (*rate constant*), solitamente indicata con k_T ; se c'è sufficiente *overlap* tra gli spettri, k_T è proporzionale al quadrato dell'energia di interazione tra i due dipoli. Infatti l'energia potenziale di un dipolo \mathbf{p}_A in un campo elettrico esterno \mathbf{E}_D è: $U = -\mathbf{p}_A \cdot \mathbf{E}_D$;

il campo elettrico \mathbf{E}_D generato da un dipolo elettrico \mathbf{p}_D risulta:

$$\mathbf{E}_D = \frac{3\mathbf{p}_D \cdot \mathbf{u}_r}{4\pi\varepsilon r^3} \mathbf{u}_r - \frac{\mathbf{p}_D}{4\pi\varepsilon r^3}$$

ove ε è la costante dielettrica del mezzo, \mathbf{u}_r è il versore definito come $\mathbf{u}_r = \frac{\mathbf{r}}{r}$, e \mathbf{r} è il vettore posizione del punto in cui si valuta il campo elettrico. Quindi

$$k_T \propto U^2 = (\mathbf{p}_A \cdot \mathbf{E}_D)^2 = \frac{|\mathbf{p}_A|^2 |\mathbf{p}_D|^2}{r^6} \kappa^2$$

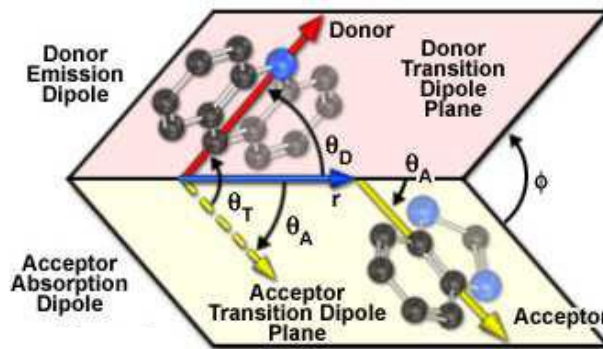


Figura 1.7. Schema esplicativo dei parametri in gioco per la descrizione delle reciproche posizioni dei fluorofori.

Il parametro κ^2 indica il fattore di orientazione del dipolo e dipende dalla libertà di rotazione delle molecole: $\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2$; θ_T è l'angolo tra l'emissione della transizione di dipolo del donatore e l'assorbimento della transizione di dipolo dell'accettore, θ_D e θ_A sono gli angoli tra questi dipoli e il vettore \mathbf{r} che unisce il donatore all'accettore. Questo parametro varia tra 0, quando tutti gli angoli sono di 90° , e 4, quando tutti gli angoli sono di 0° ; esso può essere assunto

pari a $2/3$ qualora i fluorofori non siano soggetti a vincoli nel loro moto isotropico e la reciproca posizione angolare sia casuale per la durata dello stato eccitato.

L'efficienza dell'energia trasferita, E , è la frazione di energia trasferita sul totale degli eventi di eccitazione del donatore, ed equivale a

$$E(r) = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

R_0 è detta distanza di Förster, e corrisponde alla distanza tra i fluorofori alla quale l'efficienza di trasferimento è al 50%; invertendo la funzione $E(r)$ si evince la possibilità di determinare la distanza tra i due fluorofori misurando l'efficienza E :

$$r = R_0 \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{1/6}$$

Da qui l'applicazione di base del FRET nella spettroscopia, vale a dire la possibilità di misurare distanze tra molecole di interesse o tra parti della stessa molecola, utilizzando i fluorofori come "etichette"; questa tecnica è inoltre utilizzata nell'assemblamento di biosensori costituiti da una proteina che nel legarsi alla sostanza cui è sensibile cambia conformazione: tramite manipolazioni genetiche, a tale proteina vengono uniti una coppia di fluorofori in modo tale che essi si avvicinino quando il sensore è legato alla sostanza, emettendo così un segnale. Queste sonde sono divise in due categorie, a seconda che il FRET avvenga quando la proteina è a riposo o quando essa è legata al ligando specifico; si parla rispettivamente di sonde *gain of FRET* nel primo caso e di sonde *loss of FRET* nel secondo caso.

Una coppia di fluorofori solitamente utilizzata è quella costituita da due varianti della GFP, la CFP e la YFP. L'immagine qui di seguito illustra gli spettri di eccitazione ed emissione delle due proteine ed evidenzia la sovrapposizione tra lo spettro di emissione della CFP e quello di eccitazione della YFP.

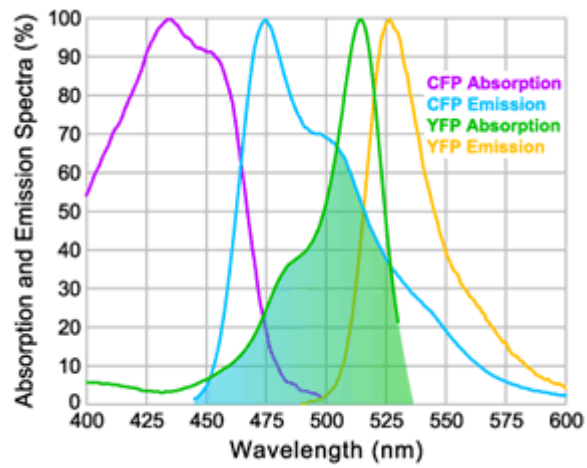


Figura 1.8. Spettri di emissione ed assorbimento per la coppia di fluorofori CFP-YFP; la sovrapposizione (overlap) tra lo spettro di emissione e della CFP e lo spettro di assorbimento della YFP è rappresentata in verde

2 MATERIALI E METODI

2.1 Coltura cellulare e trasfezione

Per testare l'eCAT3.10 sono state utilizzate cellule HeLa, mantenute in DMEM/F-12 con l'aggiunta di L-Glutamina (Gibco 11320-074), 10% FBS (Gibco 10082147) e 1% penicillina-streptomina (Gibco 15140-122) in incubatore a 37°C e con 5% di CO₂. Una volta giunte a confluenza sono state staccate utilizzando TryPLE™ Express senza rosso fenolo (Gibco 12604-021) e seminate su vetrini da 12mm di diametro ad una concentrazione tale che raggiungessero il 50% di confluenza a 72h dalla semina, vale a dire al momento dell'*imaging*.

Per la trasfezione sono stati testati vari agenti trasfettanti, quali *Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen 11668-019), *Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent* (Invitrogen L3000-001), *JetPRIME® Transfection Reagent* (Polyplus 11) e Transfectosome (), partendo dai rispettivi protocolli dei produttori e variando la concentrazione di DNA e reagenti per ottimizzare l'efficienza di trasfezione minimizzando la tossicità; infine si è deciso di procedere con la *Lipofectamine™ 3000*, qui di seguito la procedura per la trasfezione di una coppia di vetrini in *well* di una *24-well dish*: all'indomani della semina delle cellule si preparano due fiale con 50 µL di OptiMEM (Gibco: 31985062) ciascuna, in una vi si pone 1,2 µL di *Lipofectamine® 3000 Reagent*, nell'altra 1,6 µL di *P 3000® Reagent* e 2 µg di DNA plasmidico dell'eCAT3.10 (densità 1245 ng/µL), corrispondente a 1,4 µL; il contenuto delle fiale è incubato a temperatura ambiente per 5 min, poi viene unito e incubato per altri 10 min. Nel frattempo si rimuove il terreno di coltura dalle due *well* che ospitano i vetrini, si esegue un risciacquo del pozzetto con 300µL di OptiMEM per eliminare i residui di penicillina-streptomina che reagirebbero in maniera tossica con l'agente trasfettante, e vi si pongono 450 µL di OptiMEM per pozzetto; successivamente si aggiungono 50 µL per *well* del mix di trasfezione facendolo colare goccia a goccia, lasciando agire per 4h, per poi sostituire il *medium* con il terreno di cui sopra.

2.2 Setup sperimentale

Il *setup* è composto da un microscopio diritto Olympus BX51WI con obiettivo Olympus LUMPlanFLN ad acqua 40X/0.80W, montato su un banco ottico al di sopra di una camera con sistema di perfusione per gravità e aspirazione tramite vuoto. Il microscopio permette l'illuminazione del campione per l'acquisizione sia in modalità fluorescenza che in luce trasmessa: per l'eccitazione della CFP è stato utilizzato un LED della Thorlabs con lunghezza d'onda 427 nm, filtrato da un Edmund Optics con banda passante 425/25 nm; per l'illuminazione in luce trasmessa è stato utilizzato un monocromatore Polychrome V (TILL Photonics) alla lunghezza d'onda di 570/10 nm, vale a dire al di fuori dello spettro di assorbimento di entrambi i fluorofori costituenti l'eCAT3.10, per evitare di incorrere in *photobleaching* nelle operazioni preliminari all'acquisizione vera e propria. Il fascio collimato della radiazione di eccitazione viene riflesso da un dicroico a 585 nm e focalizzato sul campione dell'obiettivo, il quale raccoglie la luce di fluorescenza; questa percorre il cammino ottico fino a raggiungere il *beam splitter* (Edmund Optics) che divide la luce di emissione in due canali, filtrati a 482/35nm per isolare la radiazione della CFP e a 535/43 per la YFP. Infine la luce è raccolta da una camera PCO Edge (sCMOS).

L'intero apparato del microscopio, eccezion fatta per la regolazione della messa a fuoco che in parte è manuale, è gestita da un computer che dialoga con un *controller* (Olympus BX-UCB) per la regolazione di filtri di assorbimento e dicroici, con l'alimentatore del LED, il monocromatore e la camera; per la gestione dei protocolli di stimolazione e contemporanea acquisizione illustrati al prossimo paragrafo è stato utilizzato il software Roboscope, sviluppato al VIMM dal Dr. Catalin Ciubotaru (*Istituto Veneto di Medicina Molecolare*).

La cameretta che ospita il vetrino con le cellule è montata su un supporto, il quale si può muovere nel piano *xy* grazie ad un *controller*, permettendo la selezione delle cellule su cui operare la presa dati; un controller identico a quest'ultimo muove un *micro manipulator* per pipette da patch clamp (Axon instruments, CV-7B) che sostiene la micropipetta con cui sarà puffata la soluzione contenente ATP; tale

supporto è dotato di un elettrodo che va inserito all'interno della pipetta per misure di elettrofisiologia.

Le micropipette utilizzate per il *puff* sono state ricavate da capillari di vetro borosilicato di lunghezza 10cm, diametro esterno 1.5mm e diametro interno 0.86mm (Sutter Instrument Co., catalog#: B150-86-10), tirati in due *step*; inoltre per regolare la pressione di uscita della soluzione dalla pipetta è stato utilizzato un *puffer* Pneumatic PicoPump PV820 (WPI).

Durante l'*imaging* le cellule sono state mantenute a temperatura ambiente in una soluzione extracellulare composta da 150mM di NaCl, 5mM di KCl, 2 mM di CaCl₂, 1mM di MgCl₂ esaidrato, 2mM di Piruvato di Sodio, 10mM di HEPES e 5mM di glucosio, con pH 7,35 grazie all'aggiunta finale di NaOH. Le soluzioni per il *puff* sono state ottenute aggiungendo l'ATP (*Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate*, Sigma-Aldrich A2383-10G) alla soluzione extracellulare, ricalibrando nuovamente il pH e subito congelandole per evitare la degradazione termica del nucleotide; per l'utilizzo nell'esperimento sono state scongelate a ghiaccio e mantenute in esso nei tempi di attesa.

Il *setup* sperimentale comprende anche l'apparato per esperimenti di elettrofisiologia con la tecnica del *patch clamp*, costituito da un computer collegato ad un amplificatore di corrente e voltaggio per microelettrodi (Axon Instrumets, MultiClamp 700B) e ad un *digitizer* (Axon Instrumets, Digidata® 1550A Low-Noise Data Acquisition System), entrambi a loro volta collegati a due CV-7B, dei quali uno utilizzato come *holder* per le micropipette negli esperimenti.

2.3 *Imaging* e protocollo di acquisizione

L'*imaging* a fluorescenza è stato effettuato a 48 h di incubazione (37°C, 5% di CO₂) dalla trasfezione, per permettere alle cellule HeLa di esprimere l'eCAT3.10 in quantità ottimale. Il software Roboscope permette sia la gestione diretta dell'apparato sperimentale, sia l'esecuzione di protocolli di acquisizione. Per le operazioni preliminari alla presa dati, quali la messa a fuoco del piano occupato dalle cellule e il posizionamento della pipetta, ci si è avvalsi di un protocollo di *live*

con illuminazione continua a 570 nm tramite il monocromatore ed esposizioni della durata di 20 ms per ciascun frame alternate a 80 ms di pausa. Per la selezione della cellula su cui operare è stato utilizzato un protocollo di *live* tramite il LED a 427 nm di lunghezza d'onda, con illuminazioni ed esposizioni della durata di 300 ms, seguite da 300 ms di pausa per evitare di incorrere nel *photobleaching*. Per la presa dati ci si è serviti di un protocollo da 1 s di esposizione ed eccitazione tramite lo stesso LED, seguito da 500 ms di pausa.

Si procede selezionando una cellula che emetta un segnale di fluorescenza sufficientemente elevato (almeno 700 unità) rispetto al segnale di fondo; a questo punto si inserisce la soluzione contenente ATP, precedentemente filtrata e tenuta a ghiaccio, nella pipetta, si facilita la risalita di bolle d'aria picchiettandola delicatamente e la si fissa all'*holder* con l'inserimento del relativo elettrodo in essa, assicurandosi che quest'ultimo risulti a bagno: questo espediente serve per verificare che la pipetta non si ostruisca durante l'esperimento per effetto di eventuali bolle d'aria residue, poiché tramite l'apparato per le misure di elettrofisiologia si vedrebbe un aumento della resistenza elettrica della pipetta dal range di 9-11M Ω a valori nettamente superiori. Successivamente, sfruttando la limitata profondità di campo del microscopio e il relativo sezionamento ottico, si posiziona la punta della pipetta in un piano che intercetta la sommità della cellula, alla distanza di circa 25-30 μm . In tal modo si è sicuri che il *puff* investa completamente la superficie della cellula.

Per l'acquisizione del segnale di fluorescenza è stato utilizzato il protocollo descritto sopra, registrando il segnale dei primi 60 frame senza lo stimolo, successivamente spruzzando la soluzione con l'ATP dal 60° al 120° frame, eseguendo un *washout* nell'intervallo dal 120° al 200° frame, e infine continuando l'acquisizione senza stimolo né *washout* per gli ultimi 50 frame. Gli intervalli precedenti allo stimolo e successivi al *washout* servono per il calcolo del fit esponenziale che rappresenta l'andamento del *photobleaching*.

2.4 Analisi dei dati

I dati grezzi ricavati dagli esperimenti sono costituiti da una sequenza di immagini in cui ciascun fotogramma risulta diviso a metà per effetto del *beam splitter*, presentando quindi la stessa immagine vista nei due canali, quello relativo alla YFP e quello relativo alla CFP. L'analisi è stata compiuta utilizzando il software Vimmaging, realizzato nel laboratorio su supporto MATLAB. Tale programma consente di creare lo *split* dell'immagine, vale a dire una mappatura che mette in corrispondenza i punti analoghi nei due canali per ciascun fotogramma. Una volta fatto ciò si disegnano delle regioni di interesse (ROI, *region of interest*) sulla cellula, si seleziona l'area dove misurare il *background* rispetto al quale calcolare il segnale e il software provvede a riprodurre le stesse ROI sull'altro canale. All'avvio dell'elaborazione dei dati, viene calcolata la media del segnale sui pixel interni a ciascuna ROI, si sottrae il *background* e sono plottati i segnali nei due canali e il *ratio* R dato dalla frazione YFP/CFP.

In seguito i dati prodotti da Vimmaging sono stati elaborati da CompareGroups, un software su supporto MATLAB sviluppato nel laboratorio, che colleziona i dati delle varie misure alle diverse concentrazioni di ATP, e per ciascuno di essi esegue un fit esponenziale del segnale basale pre-stimolo e post-*washout*, in modo tale da realizzare un *detrend* dell'andamento esponenziale decrescente dovuto all'effetto di *photobleaching* dei fluorofori; successivamente calcola la media dei segnali e, una volta indicatogli l'intervallo in cui le tracce raggiungono il segnale massimo, elabora e plotta la curva dose-risposta.

3 RISULTATI

3.1 Ottimizzazione del protocollo di acquisizione delle immagini

3.1.1 Verifica dell'espressione, localizzazione e risposta del biosensore eCAT

Il segnale di fluorescenza indica l'avvenuta espressione dell'eCAT, che risulta localizzato a livello della membrana ed evidentemente accumulato anche a livello del reticolo endoplasmatico, effetto già noto nella letteratura di altri biosensori a fluorescenza; tuttavia, essendo la frazione delle proteine accumulate nel reticolo endoplasmatico interna alla cellula, esse non partecipano alla risposta in seguito al *puff* di ATP. Inoltre sono presenti dei punti più luminosi, interpretabili come vescicole adibite al trasporto della proteina verso la superficie della cellula.

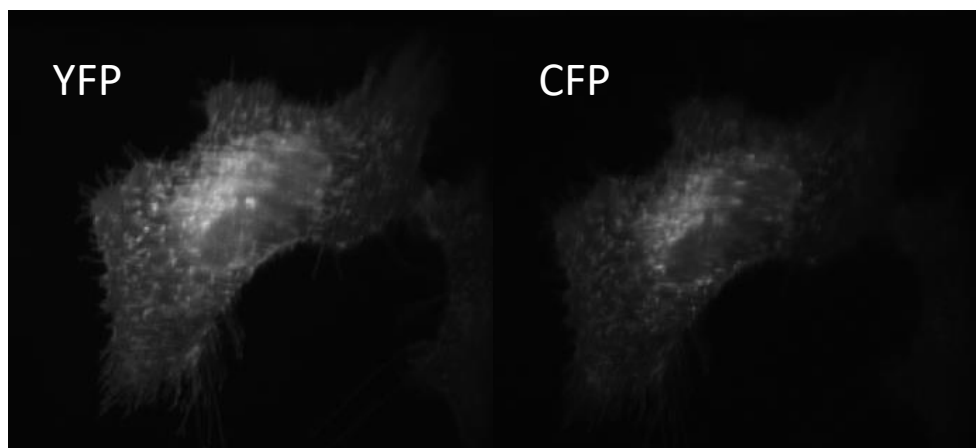


Figura 3.1. Segnale di fluorescenza di una cellula HeLa che esprime il biosensore eCAT3.10 nei due canali di acquisizione, a sinistra quello relativo alla YFP, a destra quello relativo alla CFP; la sonda risulta espressa su tutta la superficie cellulare e appare anche concentrata nel reticolo endoplasmatico; sono inoltre visibili degli accumuli puntiformi, probabilmente costituiti da vescicole che trasportano la sonda sulla superficie cellulare.

I primi esperimenti per verificare il funzionamento del biosensore sono stati condotti con *puff* di soluzione di ATP alla concentrazione di 1mM, che in base ai test del produttore corrisponde ad una concentrazione nel range di saturazione dell'eCAT; il protocollo di acquisizione prevedeva un'esposizione di 300 ms e un

tempo di pausa pari a 1 s. Una volta analizzati i dati è emerso un *ratio* con un *photobleaching* marcato e una variazione del segnale di fluorescenza dovuto al FRET molto modesta, diversamente da quanto atteso per una concentrazione a saturazione. Il segnale di fluorescenza della CFP, inoltre, presentava un andamento anomalo con una risalita iniziale, come se a seguito dell'eccitazione ci fosse un calo del trasferimento di energia per risonanza con conseguente aumento dell'energia a disposizione della CFP che quindi la rimetteva in fluorescenza; questo effetto risultava molto superiore al *bleaching* del fluoroforo stesso, del tutto trascurabile.

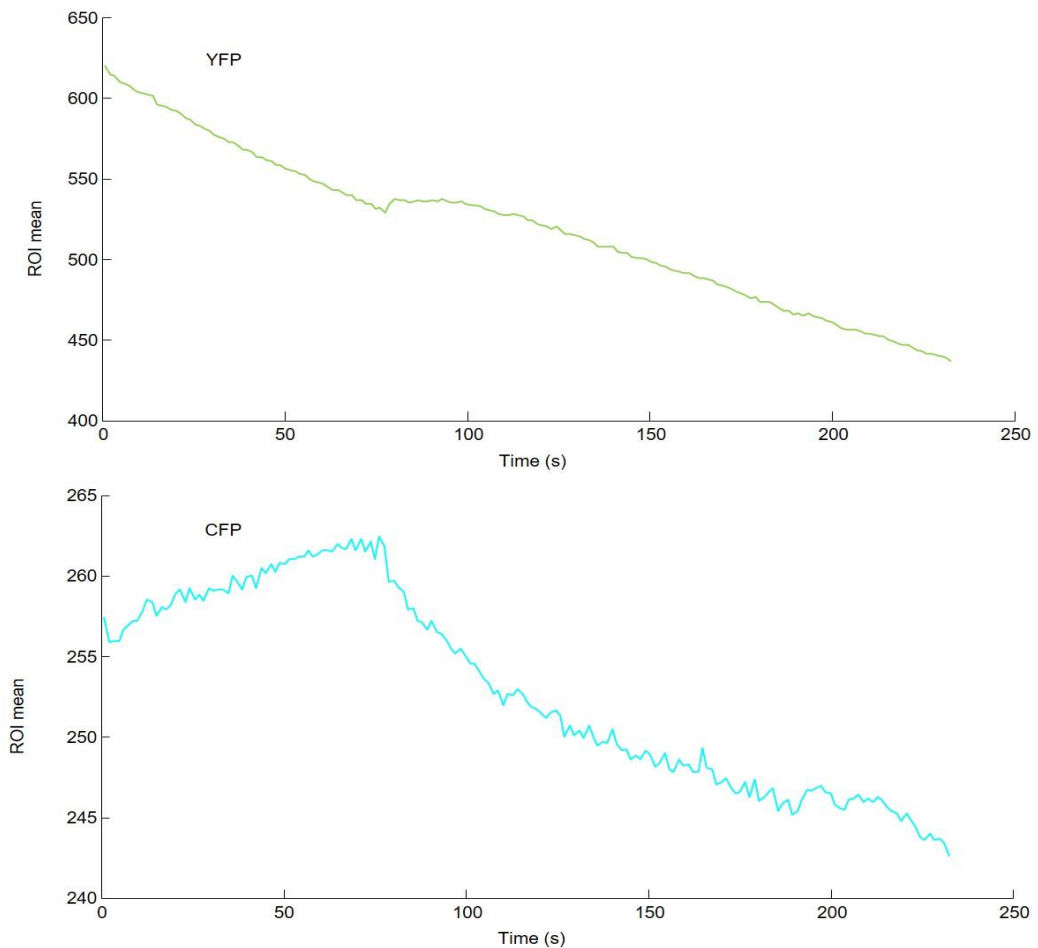


Figura 3.2. Traccia del segnale di fluorescenza dei due fluorofori dell'eCAT3.10, in alto la YFP e in basso la CFP, in una misura relativa al puff di ATP 1mM con protocollo di acquisizione iniziale (300 ms di illuminazione ed esposizione, 1 s di pausa). La YFP presenta un *bleaching* molto marcato ed un incremento di emissione per FRET modesto; la traccia della CFP presenta un anomalo comportamento di risalita iniziale.

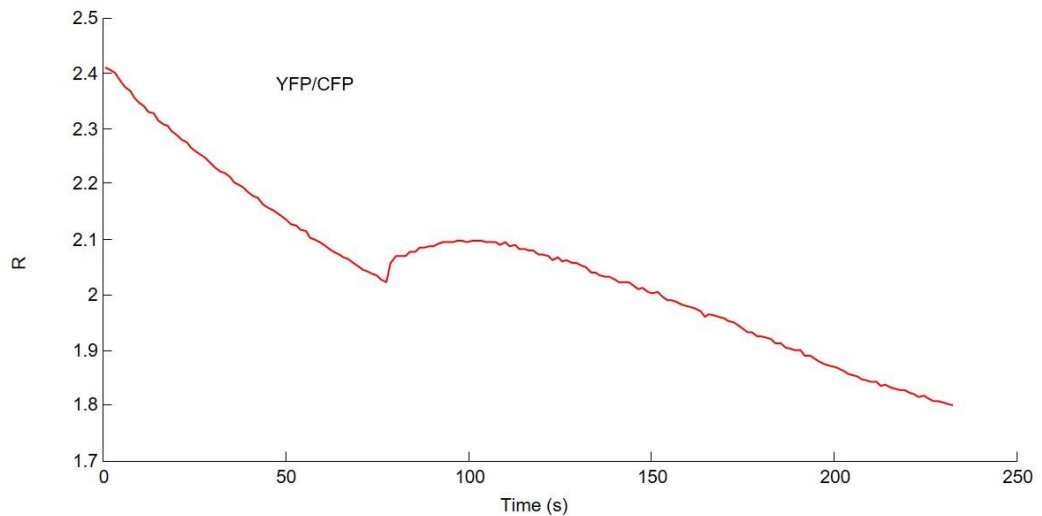


Figura 3.3. Ratio dei segnali YFP/CFP relativo allo stesso esperimento di figura 3.2; l'effetto del bleaching non è stato compensato dal ratio per l'anomalo andamento della CFP; la variazione del segnale dovuta allo stimolo risulta molto contenuta (cfr. figura 3.5, analogo esperimento con protocollo di acquisizione ottimizzato)

In seguito si è cercato di riprodurre il metodo di stimolazione dichiarato nell'articolo del produttore, dunque il *puff* è stato sostituito da uno stimolo tramite perfusione mantenendo invariato il protocollo di acquisizione. Nemmeno questo tentativo ha prodotto risultati comparabili con quelli attesi, tuttavia ha perlomeno messo in luce il minor tempo di risposta del biosensore nel caso venga stimolato attraverso il *puff*, poiché lo stimolo tramite perfusione richiede molto tempo affinché tutta la camera sia svuotata dalla soluzione extracellulare e al contempo riempita di soluzione con ATP.

3.1.2 Variazione delle pause tra i frame dell'acquisizione

Si è deciso dunque di inserire delle pause da 30 s tra ciascun frame, ripristinando lo stimolo tramite *puff* e mantenendo inalterato il tempo di esposizione; le tempistiche di questi esperimenti prevedevano 5 min di acquisizione senza stimolo, 3 min durante lo stimolo e altri 5 min durante il *washout*. Il segnale risultante manifesta la scomparsa del comportamento anomalo della CFP e presenta un

bleaching molto contenuto, dato che l'eccitazione cui sono stati sottoposti i fluorofori è stata di 300 ms ogni 30 s; il *ratio* presenta l'andamento atteso con *baseline* piatta e segnale evidente.

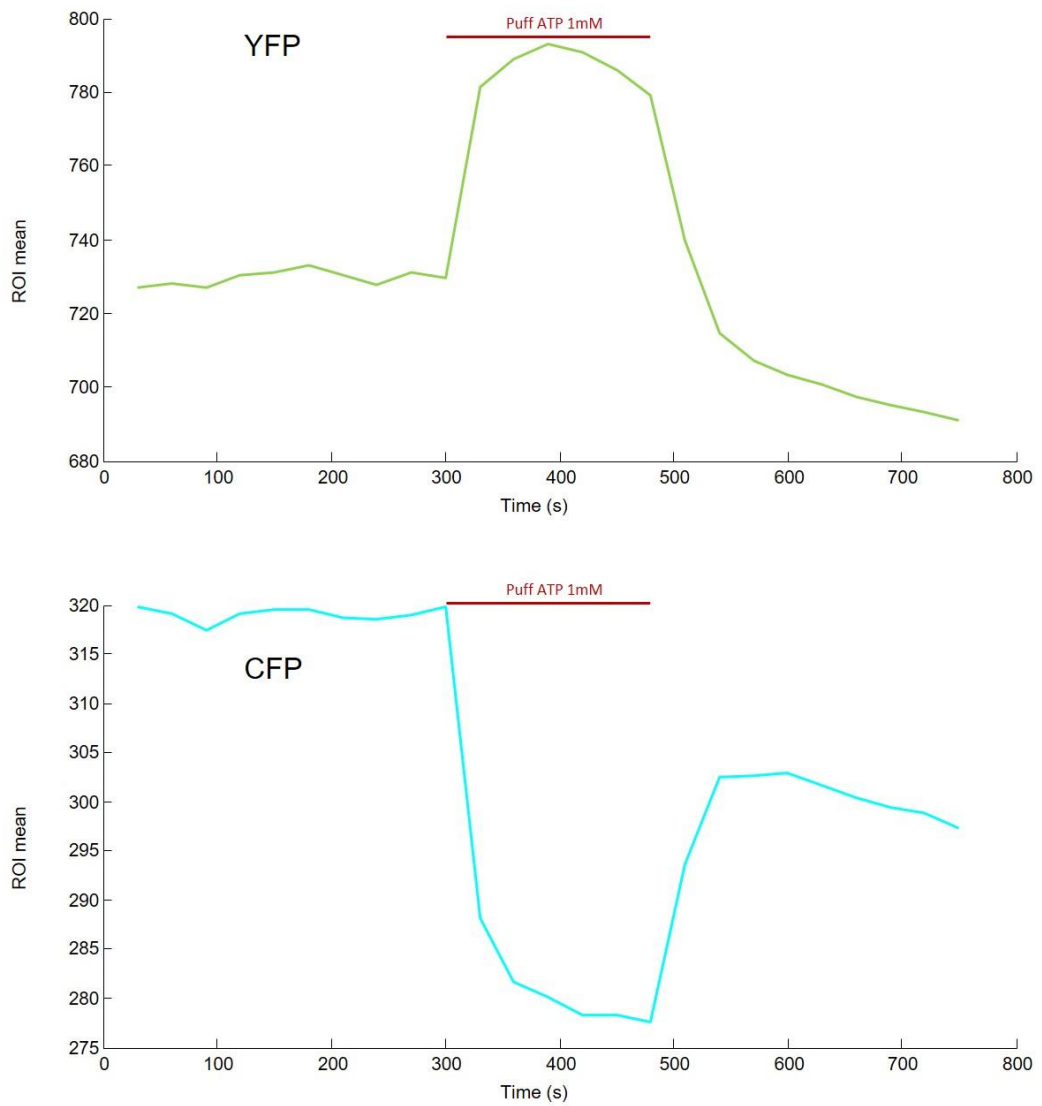


Figura 3.4. Traccia del segnale di fluorescenza in esperimento con puff di ATP 1mM con 30 s di pausa tra ciascun frame di acquisizione; il comportamento anomalo della CFP visto in precedenza è scomparso; nel complesso le variazioni dei segnali di fluorescenza dovuti al trasferimento di energia per risonanza sono più marcate, mentre il fotodanneggiamento è molto contenuto.

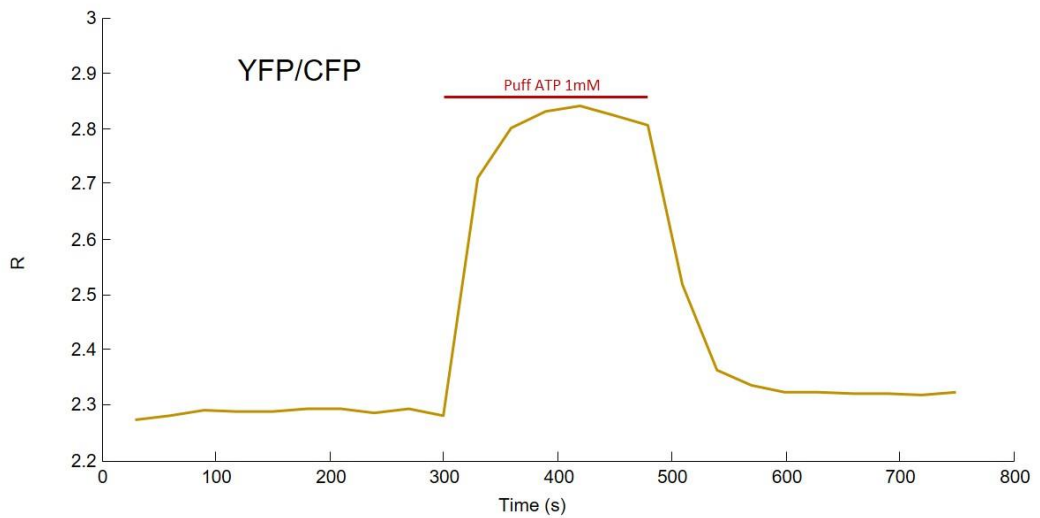


Figura 3.5. *Ratio dei segnali YFP/CFP* relativo allo stesso esperimento di figura 3.4; l'effetto del photobleaching risulta compensato dal ratio; la variazione del segnale di fluorescenza durante lo stimolo è rilevante, come atteso in un esperimento con concentrazione di ATP pari a 1mM, prossima alla saturazione della risposta dell'eCAT3.10.

Provando a mediare tra le tempistiche di quest'ultimo esperimento e l'esigenza di testare la risposta del biosensore in intervalli di tempo più brevi, sono state eseguite altre due acquisizioni con le stesse tempistiche (5 min pre stimolo, 3 min di stimolo e 5 min di *washout*) ponendo gli intervalli di pausa a 10 s e 5 s; l'immagine di seguito mette a confronto i ΔR , vale a dire la variazione del *ratio* dei segnali YFP/CFP rispetto all'istante iniziale. Si nota come al diminuire della durata delle pause l'andamento torna ad essere anomalo, con variazioni del segnale ΔR durante lo stimolo ridotte e andamento decrescente della baseline.

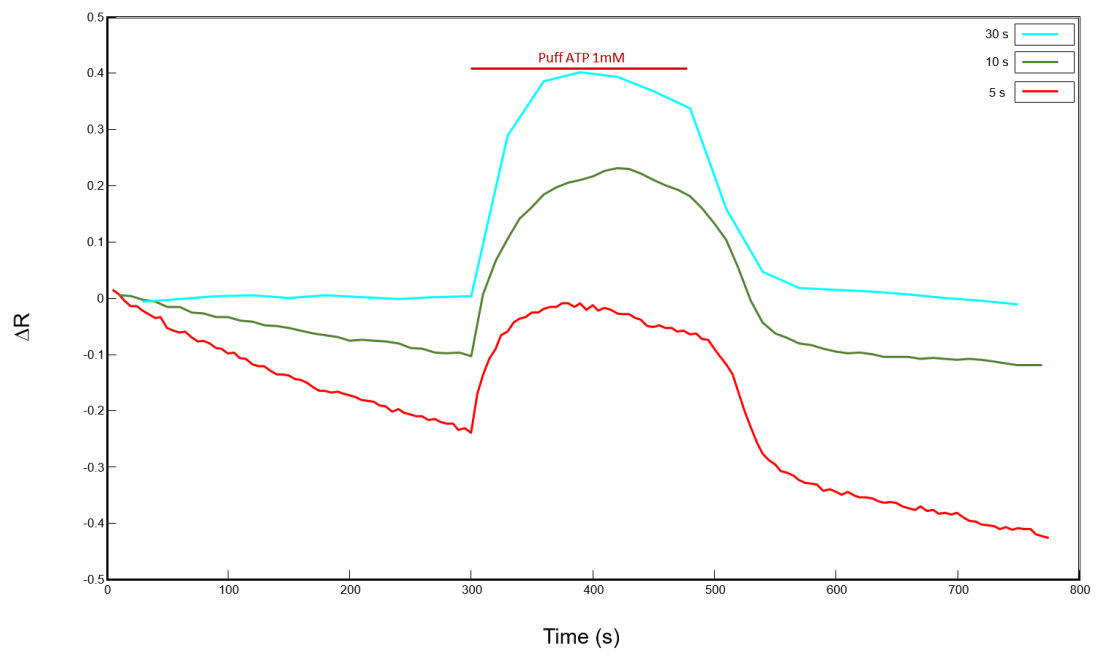
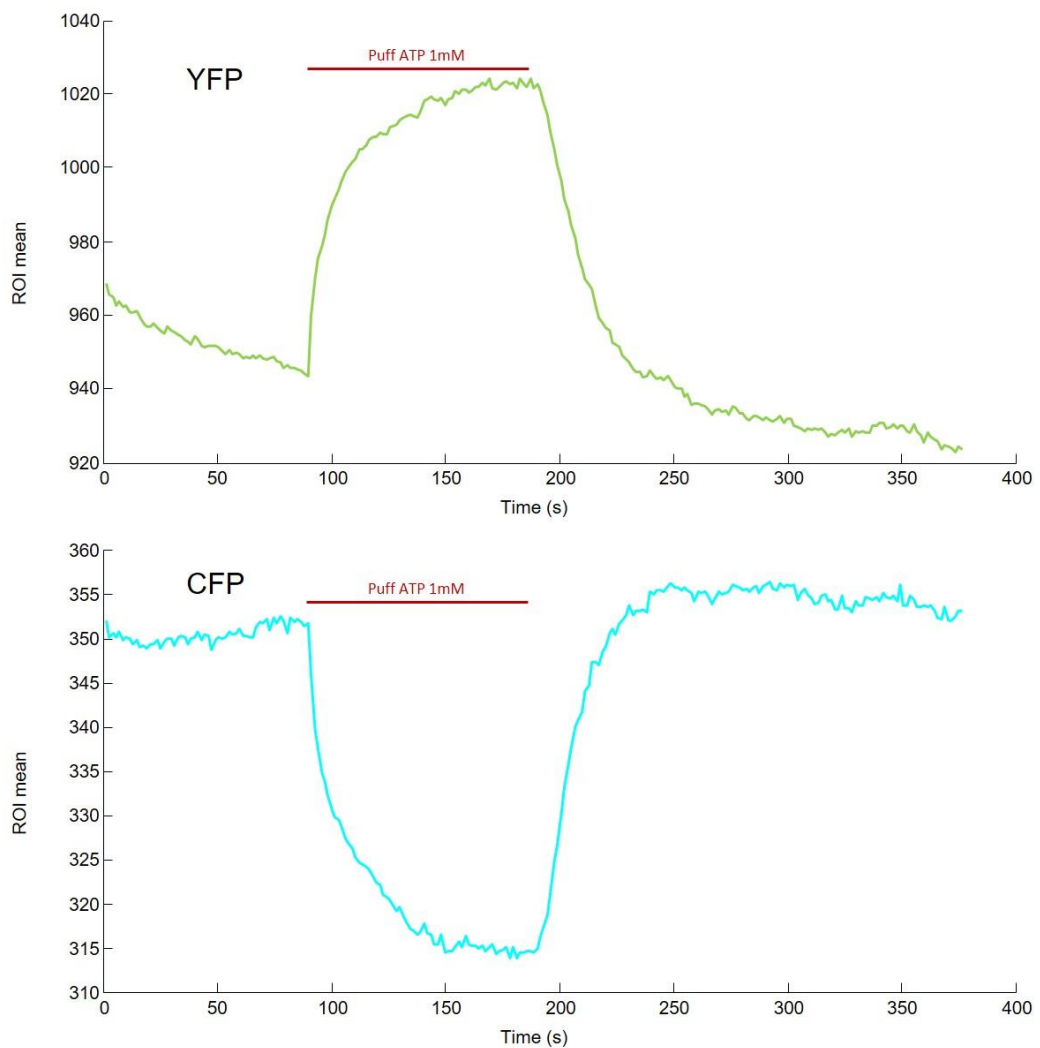


Figura 3.5. Confronto delle tracce ottenute a parità di esposizione con intervalli di pausa diversi nell'acquisizione, rispettivamente a 30 s per la traccia azzurra, 10 s per la traccia verde e 5 s per la traccia rossa; al diminuire degli intervalli di pausa l'andamento della baseline torna ad essere marcatamente decrescente e al contempo la variazione dei segnali durante lo stimolo si riduce.

3.2 Risultati con protocollo di acquisizione veloce ottimizzato

Sulla base dei precedenti risultati provvisori, si è deciso di sfocare il LED in maniera da ridurre l'intensità (vedi par. 4.2 nella sezione Discussione); il protocollo di acquisizione ottimizzato prevede 1 s di esposizione ed eccitazione seguito da 500ms di pausa per ciascun frame. Con queste modalità è stata misurata la risposta dell'eCAT3.10 alle concentrazioni di ATP 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M e 0.1 μ M, acquisendo 60 frame (pari a 90 s) prima dello stimolo, 60 frame durante lo stimolo, 80 frame (corrispondenti a 120 s) durante il *washout* e infine 50 frame (75 s) al termine dello stesso.



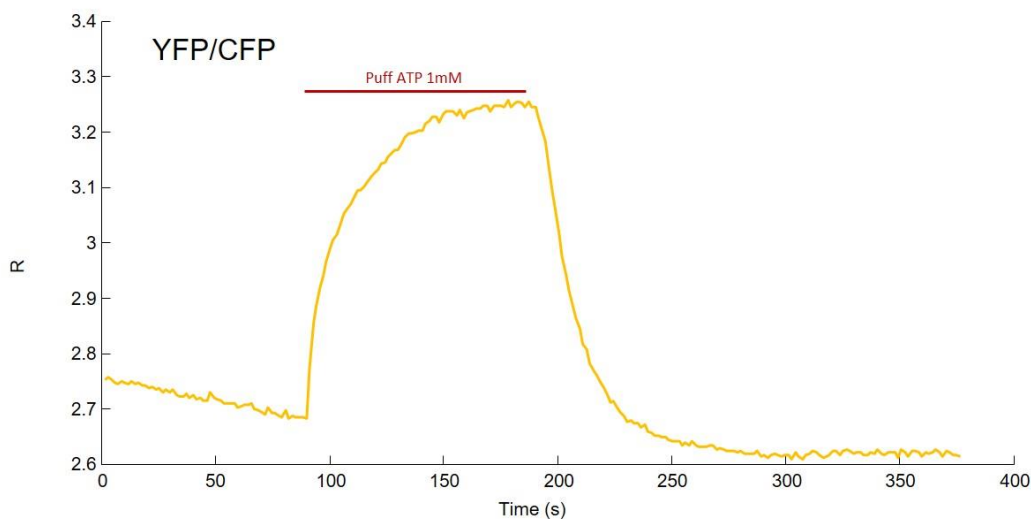


Figura 3.5. Traccia del segnale di fluorescenza in esperimento con puff di ATP 1mM con protocollo sperimentale ottimizzato (1 s di esposizione e illuminazione con led sfocato, 500 ms di pausa) rispettivamente nel canale della YFP, della CFP e andamento del ratio YFP/CFP. La variazione del segnale di fluorescenza durante lo stimolo appare elevata, si nota la ricomparsa di una leggera diminuzione della baseline nel corso dell'esperimento, indice di un effetto di bleaching residuo.

Qui di seguito il grafico che illustra l'andamento delle tracce mediate sul numero degli esperimenti alle diverse concentrazioni, dopo aver operato un *detrend* esponenziale su ciascuna di esse per compensare il fotodanneggiamento residuo; l'intervallo di confidenza è stato calcolato sulla base dell'errore della media. Per ultima è illustrata la curva dose-risposta calcolata dal software CompareGroups; in ascissa compaiono le diverse concentrazioni di ATP in scala logaritmica, in ordinata il massimo della variazione di segnale $\Delta R/R_0$ della media delle misure.

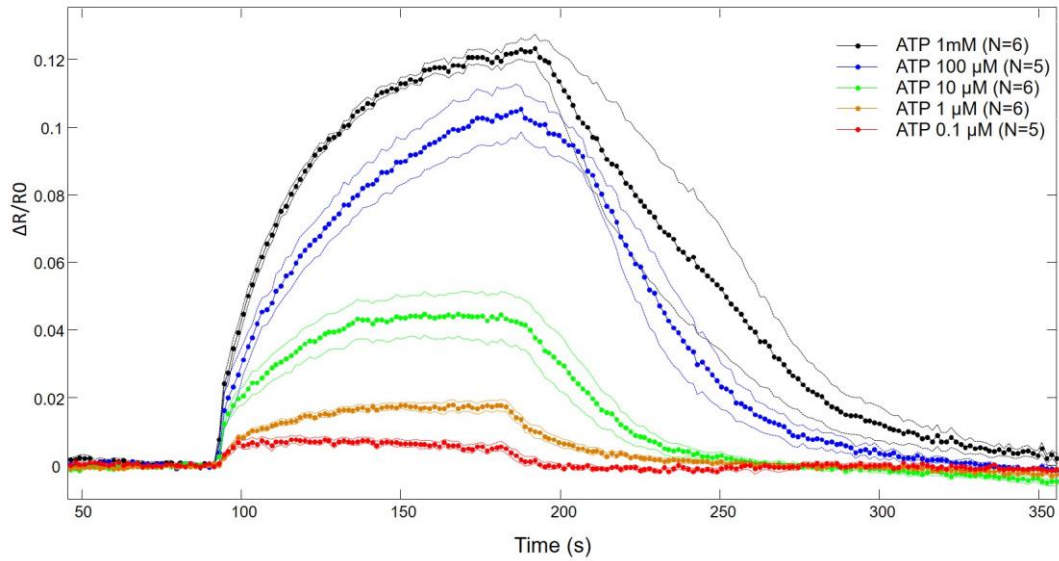


Figura 3.6. Andamento medio delle variazioni di segnale $\Delta R/R_0$ in misure a diverse concentrazioni di ATP (in legenda il numero di esperimenti per ciascuna concentrazione); la variazione ΔR del segnale di fluorescenza dell'eCAT3.10 è stata normalizzata rispetto a R_0 , intensità del ratio YFP/CFP subito prima dello stimolo. Gli intervalli di confidenza sono stati calcolati sulla base dell'errore della media.

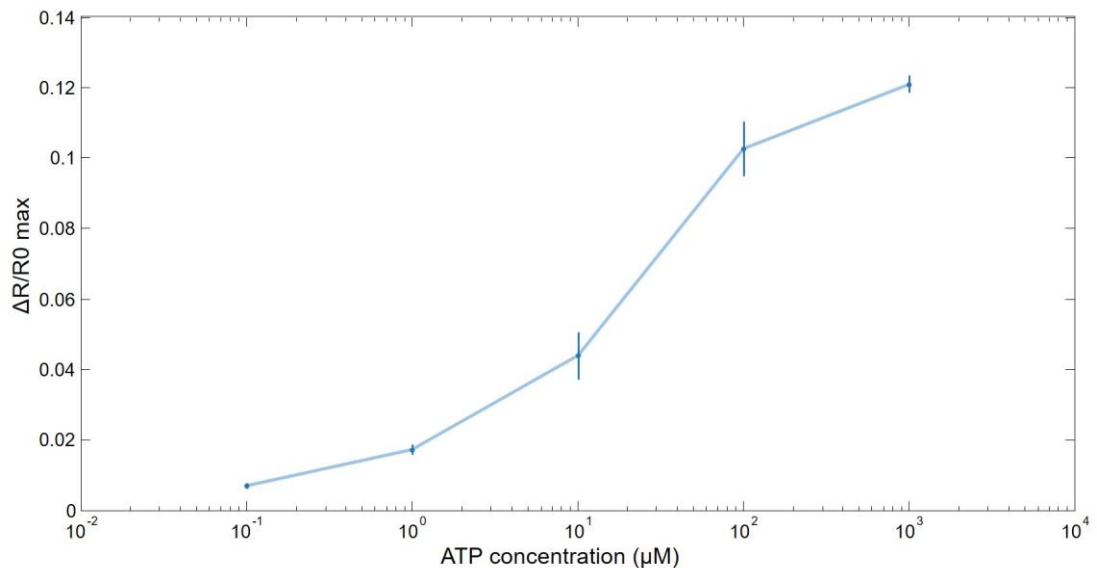


Figura 3.7. Curva dose-risposta costruita sulla base delle massime variazioni di segnale $\Delta R/R_0$ nelle medie delle tracce dei vari esperimenti in Figura 3.6; le barre di errore indicano l'errore della media. Risulta evidente l'andamento a sigmoide tipico delle curve dose-risposta.

4 DISCUSSIONE

Nel complesso, i risultati ottenuti col protocollo di acquisizione sviluppato nel laboratorio del prof. Bortolozzi sono stati molto positivi. Emerge spontaneo e necessario un confronto tra le due diverse modalità di stimolazione dell'eCAT3.10, quella utilizzata nelle acquisizioni del lavoro di tesi mediante *puff* e quella adoperata dal produttore, la perfusione; quest'ultimo metodo certamente garantisce che l'ATP giunga ad attivare uniformemente la risposta del sensore, e fornisce la possibilità di misurare contemporaneamente il segnale di un maggior numero di cellule trasfettate. Il grande svantaggio di questo metodo consiste nella dilatazione dei tempi necessari alla presa dati, fattore che, col marcato fotodanneggiamento cui incorre l'eCAT, porterebbe a compromettere le misure o ad allungare a tal punto le tempistiche delle stesse da vanificare l'obiettivo di questo studio, vale a dire la futura applicazione del sensore per la misura di variazioni della concentrazione di ATP in intervalli di tempo dell'ordine dei secondi.

Per assicurarsi che il metodo del *puff* avesse la stessa efficacia della perfusione, seppur in un'area di indagine più ristretta, sono stati eseguiti dei test spruzzando 5(6)-Carbossil Fluoresceina (Sigma Aldrich 447293-1G) 1 mM, eccitandola col LED a 427 nm; analizzando le immagini così ottenute è stato possibile visualizzare il gradiente di concentrazione della soluzione in uscita dalla pipetta e stimare l'area in cui tale concentrazione rimane prossima al valore nominale.

Come ci si attende data la vicinanza alla quale viene posta la micropipetta rispetto alla cellula bersaglio, i tempi di risposta del biosensore sono molto corti, entro 2 s dall'inizio del *puff*; tuttavia si nota come, a parità di durata dello stimolo, negli esperimenti ad alte concentrazioni di ATP (100 μ M e soprattutto 1 mM) la variazione del segnale di FRET sembra impiegare più tempo a raggiungere il massimo (cfr. figura 3.6); si ipotizza che questo andamento sia dovuto al fatto che a tali concentrazioni, prossime alla saturazione della sonda, al raggiungimento del segnale massimale debbano contribuire anche unità che per fattori sterici non risultano subito pronte a fare FRET.

Per verificare che il metodo del *puff* non alterasse le risposte del biosensore causando degli artefatti di movimento sono stati eseguiti degli esperimenti di controllo *spruzzando* soluzione extracellulare priva di ATP su cellule trasfettate; qui di seguito è riportato il grafico della media dei segnali di fluorescenza di tali misure, sui quali è stato operato un *detrend* a singolo esponenziale per compensare l'effetto del *photobleaching*. Confrontando tale andamento con la media dei segnali ottenuti da esperimenti a 0.1 μM di ATP è confermato il fatto che questa concentrazione rientri nel range di sensibilità della sonda.

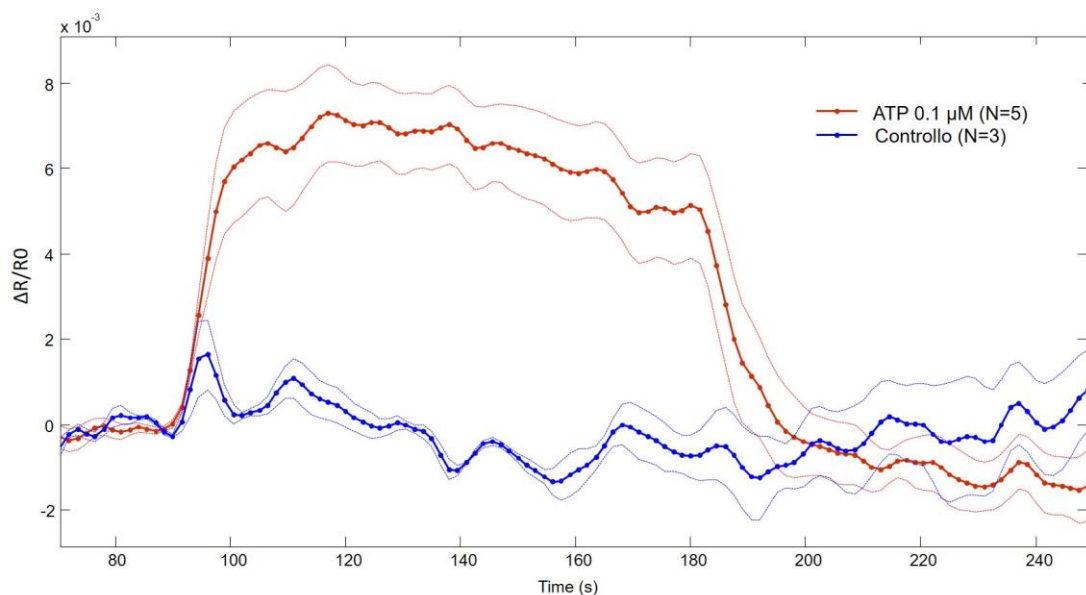


Figura 4.1. Confronto tra la media delle tracce delle misure a 0.1 μM (in rosso) e gli esperimenti di controllo (in blu) realizzati spruzzando soluzione extracellulare priva di ATP su cellule trasfettate; l'invarianza del segnale di fluorescenza negli esperimenti di controllo conferma l'assenza di motion artifact dovuti al puff stesso e l'effettiva sensibilità della sonda alla concentrazione di ATP 0.1 μM .

Fin dai primi esperimenti operati sul biosensore eCAT3.10 è risultato evidente il marcato effetto di fotodanneggiamento in cui esso incorre durante l'eccitazione necessaria alla presa dati, pari ad una diminuzione del segnale del 30% in 4 min di esperimento con il protocollo di acquisizione non ottimizzato. Come già spiegato nei risultati, per minimizzare tale effetto è stato intenzionalmente sfocato il LED in modo tale da ridurre l'intensità, allungando di conseguenza i tempi di esposizione e

l'intervallo temporale tra ciascun frame, arrivando a delineare il protocollo descritto nella sezione Materiali e Metodi (1 s di eccitazione ed esposizione, 500 ms di pausa). Questo ha determinato riduzioni del segnale di fluorescenza più contenute, pari a circa il 7% in oltre 6 min di acquisizione, ma anche una riduzione dall'area sufficientemente illuminata, rallentando le operazioni di ricerca di cellule trasfettate su cui effettuare le misure. La potenza luminosa effettiva del LED sfocato è stata misurata con un *power meter* (Thorlabs, PM100D), utilizzando un sensore circolare con diametro di 1.2 cm. La soglia di sensibilità dello strumento è di 0.1 mW e il risultato della misura a valle di tutto il cammino ottico è pari a 0.3 mW; da qui è possibile calcolare l'irradianza della sorgente luminosa, che risulta pari a 0.7 W/m². L'andamento anomalo del segnale di fluorescenza della CFP misurato nei primi esperimenti col protocollo non ottimizzato, caratterizzato da una strana salita del segnale prima dello stimolo, è sicuramente collegato alla brusca discesa del segnale della YFP dovuta al fotodanneggiamento; infatti, se il fluoroforo accettore si danneggia irreversibilmente, il donatore non potendogli più trasmettere energia per risonanza si trova ad avere maggior energia a disposizione per l'emissione del segnale di fluorescenza. Questo porta a ipotizzare che il *photobleaching* avvenga principalmente sul campione di fluorofori YFP che sta già facendo FRET all'inizio della presa dati, magari per fluttuazioni del singolo sensore favorite dall'agitazione termica, oppure per interazione con proteine CFP di altri sensori prossimi.

Confrontando la curva dose-risposta ricavata dai nostri esperimenti e presentata nella sezione Risultati con quella riportata dal produttore dell'eCAT3.10 si nota un andamento simile a parità di concentrazioni di ATP utilizzate per lo stimolo; i valori numerici che quantificano la variazione del segnale di fluorescenza in risposta allo stimolo differiscono leggermente, poiché essi dipendono strettamente dal metodo di acquisizione e dagli strumenti utilizzati (intensità e lunghezza d'onda della sorgente d'illuminazione, filtri utilizzati, ecc.).

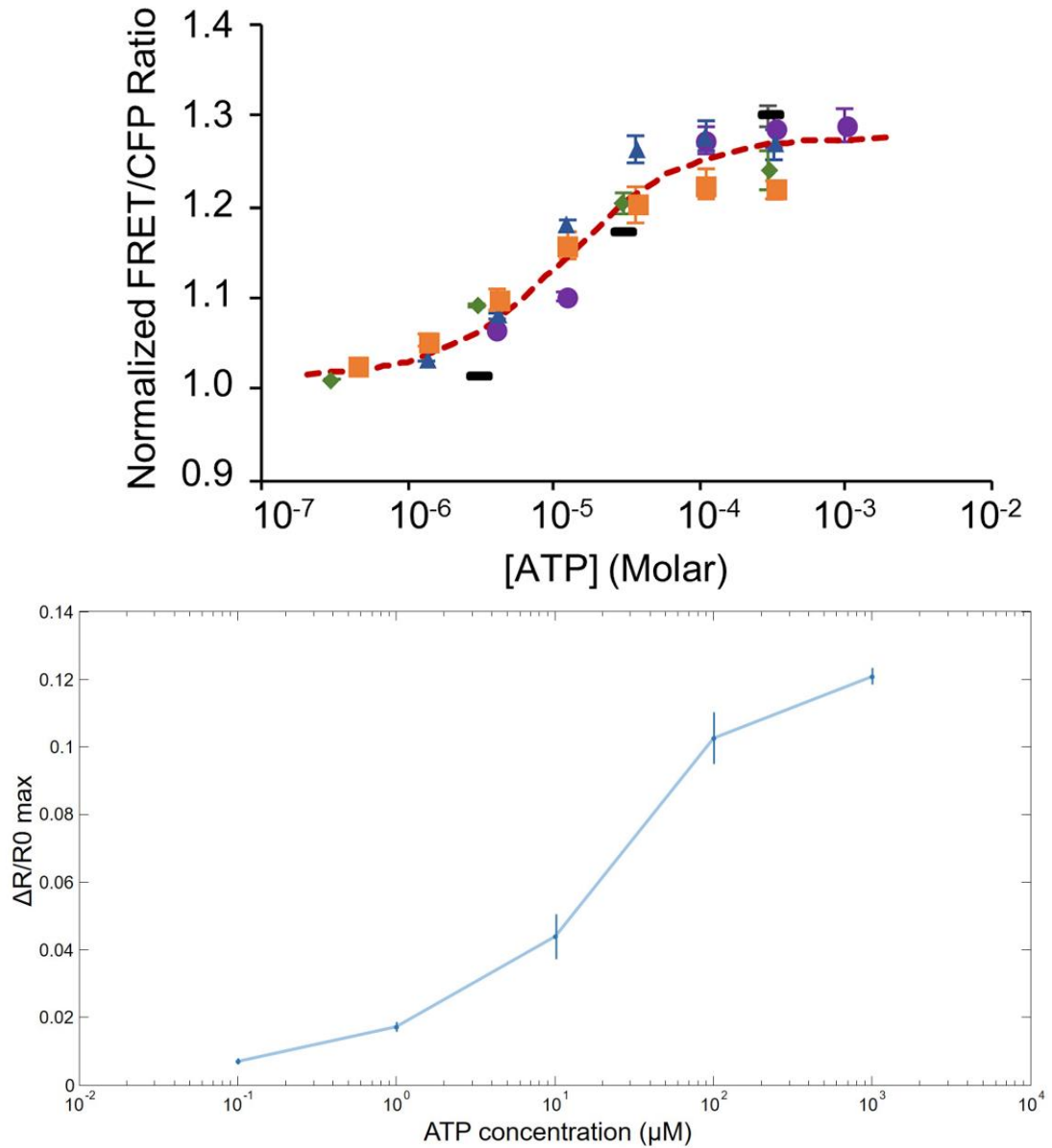


Figura 4.2. Confronto tra la curva dose-risposta fornita dal produttore del biosensore eCAT3.10 [2] (R/R_0 in alto) e l'analoga curva prodotta dai risultati delle misure realizzate in laboratorio (R/R_0-1 , in basso); la scala delle concentrazioni in ascissa dei due grafici presenta diverse unità di misura. L'andamento delle curve risulta simile, pur essendo i valori differenti in quanto strettamente dipendenti dagli strumenti utilizzati. Nella curva del produttore ogni simbolo corrisponde ad un diverso esperimento, condotto eccitando la CFP con una radiazione filtrata a 438/29 nm e raccogliendo il segnale di fluorescenza attraverso filtri a 470/24 nm per la CFP e 540/30 nm per la YFP.

5 CONCLUSIONI

Alla luce dei positivi risultati ottenuti e del grado di accordo con i risultati pubblicati dal produttore di eCAT3.10, riteniamo la sonda un valido strumento per la misura della concentrazione di ATP extracellulare in cellule HeLa.

Il protocollo di acquisizione del segnale di FRET ottimizzato in questo progetto di tesi potrà essere utilizzato in futuri studi che mirino a identificare difetti nel rilascio di ATP da parte dei canali di Cx32 recanti mutazioni di interesse patologico. Gli esperimenti si baseranno su un protocollo di doppia trasfezione che permetta l'espressione in membrana plasmatica di eCAT3.10 ed emicanali di Cx32; tramite *puff* di istamina si stimolerà un transiente Ca^{2+} intracellulare che attiverà l'apertura degli emicanali di Cx32 ed il conseguente rilascio di ATP che potrà essere misurato e quantificato mediante la sonda eCAT3.10. La prima mutazione che verrà studiata sarà la R220X dato che, in una recente pubblicazione del prof. Bortolozzi [4], è stato visto che il meccanismo di apertura dipendente da Ca^{2+} è inibito dalla mutazione e può essere ripristinato mediante la somministrazione del peptide GAP24.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Bortolozzi, M., *What's the function of connexin 32 in the peripheral nervous system?* Frontiers in Molecular Neuroscience, 2018. **In press**.
2. Conley, J.M., et al., *Imaging extracellular ATP with a genetically-encoded, ratiometric fluorescent sensor*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0187481.
3. Kleopa, K.A. and S.S. Scherer, *Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease*. Neuromolecular Med, 2006. **8**(1-2): p. 107-22.
4. Carrer, A., et al., *Cx32 hemichannel opening by cytosolic Ca²⁺ is inhibited by the R220X mutation that causes Charcot-Marie-Tooth disease*. Hum Mol Genet, 2018. **27**(1): p. 80-94.
5. Imamura, H., et al., *Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15651-6.
6. Yaginuma, H., et al., *Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging*. Scientific Reports, 2014. **4**: p. 6522.
7. Berg, J., Y.P. Hung, and G. Yellen, *A genetically encoded fluorescent reporter of ATP:ADP ratio*. Nature methods, 2009. **6**(2): p. 161-166.
8. Tantama, M., et al., *Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio*. Nature communications, 2013. **4**: p. 2550-2550.
9. Chalfie, M., *GREEN FLUORESCENT PROTEIN*. Photochemistry and Photobiology, 1995. **62**(4): p. 651-656.
10. Remington, S.J., *Green fluorescent protein: a perspective*. Protein science : a publication of the Protein Society, 2011. **20**(9): p. 1509-1519.