



# 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 di emicanali di Cx32  
mediante biosensori basati su Förster Resonance Energy  
Transfer

Relatore  
Prof. Mario Bortolozzi

Laureanda  
Ilaria Urbani

Correlatrice  
Dr.ssa Simona Pisu

Anno Accademico 2018/2019



## SOMMARIO

ABSTRACT .....	2
1 INTRODUZIONE .....	3
1.1 La malattia Charchot-Marie-Tooth e il ruolo della connessina 32 .....	3
1.2 Adenosina trifosfato.....	4
2 OBIETTIVI DELLA TESI .....	6
3 TECNICHE UTILIZZATE.....	6
3.1 <i>Imaging</i> di Fluorescenza e FRET.....	6
4 MATERIALI E METODI .....	9
4.1 Coltura cellulare e trasfezione .....	9
4.2 Apparato sperimentale.....	9
4.3 <i>Imaging</i> e protocollo di acquisizione .....	11
4.4 Analisi dei dati.....	12
5 RISULTATI.....	13
5.1 Side effects.....	13
5.2 Test con la fluoresceina .....	13
5.3 Completamento della curva dose-risposta .....	14
5.4 Esperimenti di controllo .....	16
5.5 Esperimenti con l'istamina su cellule cotrasfettate.....	16
5.5.1 Esperimenti di controllo con soluzione extracellulare .....	17
5.5.2 Esperimenti di controllo su cellule trasfettate con ecAT3.10.....	18
6 DISCUSSIONE.....	20
6.1 Confronto con la calibrazione del produttore .....	20
6.2 Risposta all'istamina.....	20
7 CONCLUSIONI.....	21
8 BIBLIOGRAFIA.....	22

## ABSTRACT

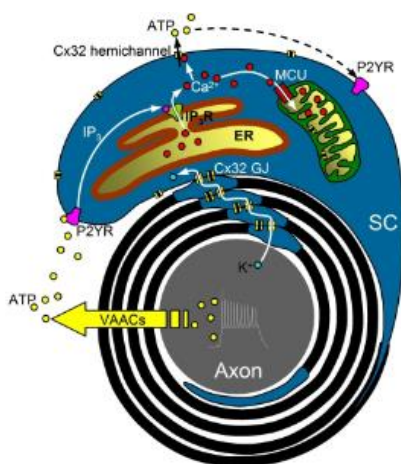
La seconda forma più diffusa della neuropatia di Charcot-Marie-Tooth è la CMTX1. Tale malattia si manifesta con amiotrofia e debolezza muscolare, anomalie sensoriali in particolare alle estremità degli arti, causando difficoltà di deambulazione e dolore che richiedono ausili protesici e farmacologici. Essa è causata da mutazioni genetiche della proteina connessina 32 (Cx32). La Cx32 forma canali di giunzione nella guaina mielinica delle cellule di Schwann ed è stato recentemente ipotizzato che tali canali siano implicati nel processo di mielizzazione mediante il rilascio di adenosina trifosfato (ATP). L'ATP, oltre a svolgere la funzione di mediazione chimica nel metabolismo energetico, è un neurotrasmettitore del sistema nervoso autonomo e funge dunque da messaggero extracellulare. Un'alterazione della segnalazione paracrina, dovuta alla disfunzione degli emicanali di Cx32, potrebbe essere alla base della patogenesi del CMTX1. Il lavoro di tesi si pone l'obiettivo di completare la caratterizzazione della sonda ecAT3.10, un biosensore dell'ATP basato su tecnica FRET (Förster Resonance Energy Transfer) allo scopo di utilizzarlo per misure di rilascio di ATP da parte di emicanali di Cx32, sia sani che con mutazioni CMT1X, espressi in cellule modello HeLa. I risultati sono stati molto positivi per quanto riguarda il completamento della curva dose-risposta di ecAT3.10 che si dimostra in grado di rilevare concentrazioni di ATP estremamente basse, fino a 10 nM. Incoraggianti anche se contraddittori sono stati i test di misura del rilascio di ATP da parte degli emicanali di Cx32 sani. Il segnale di ecAT3.10 dovuto all'eventuale rilascio di ATP appare sovrapporsi ad un secondo segnale di maggior ampiezza attivato dal tipo di stimolazione cellulare usata (istamina). Ulteriori esperimenti saranno quindi necessari per identificare ed escludere tale segnale contaminante.

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 La malattia Charcot-Marie-Tooth e il ruolo della connessina 32

La malattia di Charcot-Marie-Tooth legata al cromosoma X (CMTX) appartiene al gruppo geneticamente eterogeneo delle polineuropatie sensitivo-motorie periferiche di CMT. Si manifesta come un decorso progressivo lento, con atrofia muscolare, debolezza dei muscoli degli arti, perdita sensoriale, perdita dei riflessi tendinei, piedi cavi e, più raramente, scoliosi. Tutte le forme di CMTX sono rare e vengono classificate in base ai sintomi associati: deficit cognitivo (CMTX2, CMTX4), paraplegia spastica (CMTX3), perdita dell'udito (CMTX4, CMTX5, CMTX1) e atrofia ottica (CMTX5) [1].

La CMTX1, scoperta nel 1993, è la seconda forma più diffusa del disturbo e colpisce il 10-12% dei pazienti. Si manifesta con amiotrofia e debolezza muscolare, anomalie sensoriali in particolare alle estremità degli arti, causando difficoltà di deambulazione e dolore che richiedono ausili protesici e farmacologici. La CMTX1 viene associata ad alle mutazioni del gene GJB1 nel cromosoma X, codificante per la proteina connessina-32 (Cx32). Essa si trova principalmente nel fegato, ma è presente anche in molti altri tessuti. Ad esempio, nel sistema nervoso periferico si localizza nei paranodi delle cellule di Schwann, disponendosi in raggruppamenti che vengono definiti canali di giunzione intracellulare (*gap junction, GJ*), formati da esameri di Cx32 (emicanali) che si uniscono fornendo un rapido percorso per lo scambio di ioni e metaboliti tra la regione abassonale e quella adassonale. Attraverso lo studio di questi canali si è giunti all'ipotesi che essi siano fondamentali per il passaggio di ioni  $K^+$  e di molecole messaggere attraverso la guaina mielinica delle cellule di Schwann [2]. La Cx32 appare dunque fondamentale per una corretta formazione e maturazione della mielina, rivestimento isolante dei nervi, che consente il passaggio di ioni e molecole tra i diversi strati. Attualmente non è né chiaro il meccanismo con cui la mutazione si traduca a livello sintomatico, né quale sia l'esatta funzione della Cx32 nella mielinizzazione.



**Figura 1: Possibili funzioni della proteina Cx32 nelle cellule di Schwann mielinizzate:** L'attività assonale stimola il rilascio di ATP da parte dei canali anionici che induce, via recettori purinergici P2Y, aumenti del  $Ca^{2+}$  nel citoplasma e nella matrice mitocondriale delle SC vicine. L'aumento della concentrazione di  $Ca^{2+}$  citosolico dovrebbe essere sufficiente per innescare l'apertura dell'emicanale di Cx32 ed il rilascio di ATP, contribuendo alla propagazione intracellulare e intercellulare del segnale calcio. L'interazione tra emicanale di Cx32 e mitocondri può giocare un ruolo nella bioenergetica cellulare come osservato nel fegato di topi privi di Cx32 che sviluppano una neuropatia periferica progressiva.

### 1.1.1 Mutazione R220X

La mutazione della Cx32 più studiata [3] e causa della CMTX1 è il troncamento del C-terminale della proteina derivante dalla mutazione R220X. Recenti studi [4], basati sulla stimolazione dell'apertura degli emicanali R220X, mediante aumento del  $Ca^{2+}$  intracellulare, hanno dimostrato la loro inibizione dovuta alla mutazione. Invece, i canali di *gap junction wild-type* o R220X hanno rivelato permeabilità simili a ioni, molecole di segnalazione o soluti più grandi. Ciò avvalorerebbe l'ipotesi che l'alterazione della segnalazione paracrina, dovuta alla disfunzione dell'emicanale di Cx32 sia alla base della patogenesi del CMTX1.

## 1.2 Adenosina trifosfato

L'adenosina trifosfato (o ATP) è un ribonucleotide formato da una base azotata (adenina), da uno zucchero pentoso (ribosio) e da tre gruppi fosfato. È uno dei reagenti necessari per la sintesi del RNA, ma la sua funzione principale è la mediazione chimica nel metabolismo energetico di una cellula. Oltre al ruolo chiave di scambio universale dell'energia, l'ATP è un neurotrasmettitore del sistema nervoso autonomo. Le azioni co-trasmittitoriali dell'ATP e dei suoi metaboliti permettono la trasmissione purinergica, in cui essi operano tramite recettori specifici sotto forma di canali ionici (sottotipo P2X) o recettori G protein-accoppiati (sottotipo P2Y), ampiamente espressi nel sistema nervoso centrale. La trasmissione purinergica regola la plasticità sinaptica, la costrizione e il rilassamento dei vasi sanguigni e la mielinizzazione. Recenti studi ipotizzano il coinvolgimento dell'ATP anche nella manifestazione di determinati tumori: numerosi meccanismi immunosoppressori, infatti, operano nell'ambiente della maggior parte tumori, una condizione che rende inefficace l'immunità antitumorale. Uno dei principali fattori immunosoppressori è l'adenosina, che viene generata nel microambiente tumorale a causa della degradazione dell'ATP extracellulare [5]. Negli ultimi anni si è dimostrato che l'ATP è uno dei principali componenti biochimici del microambiente tumorale, dove agisce tramite i recettori P2 espressi su tumore e cellule ospiti.

### 1.2.1 Importanza dell'ATP per la Charcot-Marie-Tooth

Sempre più prove portano alla conclusione che il rilascio di ATP attraverso emicanali Cx32 nelle cellule di Schwann potrebbe essere fondamentale per il processo di mielinizzazione, motivo per il quale una disfunzione potrebbe essere alla base della CMTX1 [4]. Nel sistema nervoso periferico, la stimolazione elettrica dei nervi mielinizzati innesca il rilascio di ATP assonale che induce un incremento di  $Ca^{2+}$  citosolico attraverso l'attivazione del recettore P2Y [6]. È probabile che questo svolga un ruolo importante nella corretta mielinizzazione e che la soppressione del segnale causi ipomielinizzazione. Gli emicanali, dunque, parrebbero contribuire a regolare il processo di mielinizzazione regolando la concentrazione nelle cellule di Schwann degli ioni  $Ca^{2+}$ , tramite un meccanismo di *ATP-induced ATP-release*. Attualmente i determinanti molecolari di questo meccanismo, che è controllato dalle variazioni di concentrazione del  $Ca^{2+}$  citosolico, devono ancora essere identificati e inoltre non è ancora noto se gli emicanali mutanti di CMTX1 presentino un fenomeno anomalo di apertura durante la stimolazione purinergica.

### 1.2.2 Metodi per la rivelazione di ATP in ambiente extracellulare

Dato il ruolo centrale svolto dall'ATP come mediatore del metabolismo e dei segnali intercellulari, è stato necessario sviluppare dei metodi per la sua rilevazione e la sua quantizzazione: cromatografia liquida, colorimetria, fluorescenza, spettrofluorimetria, misure basate su FRET, biosensori e, infine, test di bioluminescenza a base di luciferina e luciferasi [7]. Quest'ultimo è il primo metodo ideato e ancora oggi il più utilizzato data la sua estrema praticità; tuttavia in tempi più recenti si stanno sviluppando nuove tecniche in grado di fornire misure più precise. Sono stati codificati biosensori fluorescenti come le sonde QUEEN, Perceval, e ATeam di cui le prime due sono *excitation ratio sensors*, in cui il legame con l'ATP provoca un cambiamento nello spettro di eccitazione della proteina utilizzata, mentre l'ultima appartiene ai *FRET sensors* [8].

Vengono ora illustrati più approfonditamente la tecnica di bioluminescenza ed il metodo utilizzato nel nostro laboratorio (ecAT3.10).

#### 1.2.2.1 Bioluminescenza

La tecnica di bioluminescenza è basata sulla reazione luminescente dell'ATP tipica delle lucciole: in esse sono presenti due composti chimici, luciferina e luciferasi, che agiscono con l'ATP dell'insetto producendo luce da bioluminescenza. Il contatto tra ATP e il complesso enzimatico luciferina-luciferasi fa in modo che avvenga una rapida emissione di fotoni la cui intensità decade esponenzialmente nel tempo. Poiché per ogni fotone di luce emesso una molecola di ATP viene idrolizzata, l'intensità della luce risulta essere direttamente proporzionale all'ATP contenuto nel campione. L'emissione luminosa (di lunghezza d'onda  $\lambda=560$  nm) viene misurata tramite un luminometro e dalla comparazione tra le letture del campione e quelle ottenute da soluzioni a concentrazione nota di ATP si risale alla concentrazione di ATP nel campione in esame. Il sistema luciferasi-luciferina è in grado di offrire un metodo di monitoraggio dell'ATP a basso *background* e a bassa tossicità; tuttavia, la bassa luminescenza limita la sua applicabilità nell'imaging ATP in *real time*. L'*imaging* a bioluminescenza, infatti, oltre a richiedere lunghi tempi di esposizione, fornisce informazioni soltanto sulla quantità di ATP contenuta nel campione, non sulla sua distribuzione spaziale o temporale [9]. Per informazioni più precise, allora, si sono sviluppati altri metodi di quantificazione dell'ATP.

#### 1.2.2.2 ecAT3.10

Per andare oltre le limitazioni nella risoluzione spaziale e temporale, che impediscono la comprensione precisa dei cambiamenti nei livelli di ATP extracellulari, sono stati sviluppati sensori basati su proteine fluorescenti [10]. Questi includono la famiglia di sensori ATeam, sviluppata da Imamura e dai suoi collaboratori, composta da una subunità  $\epsilon$  di una sintasi batterica FOF1-ATP che viene fusa tra una proteina fluorescente ciano (CFP) e una proteina fluorescente gialla (YFP). Il legame con l'ATP induce un cambiamento conformazionale che aumenta il trasferimento di energia di risonanza di tipo Förster (FRET) tra il donatore di CFP e l'accettore di YFP. A partire da questa famiglia di sonde viene sviluppata l'ecAT3.10, attualmente utilizzata nel nostro laboratorio poiché è in grado di fornire un'ottima risoluzione spazio-

temporale. Tale sonda è un sensore fluorescente raziometrico dell'ATP extracellulare che rappresenta un importante primo passo nella creazione di un nuovo set di strumenti disponibili per studiare la segnalazione purinergica in campioni vivi con risoluzione a singola cellula.

## 2 OBIETTIVI DELLA TESI

Obiettivo della ricerca portata avanti nel laboratorio del prof. Bortolozzi è la comprensione dei meccanismi molecolari alla base della CMT1X al fine di arrestare o quantomeno rallentare la progressione della malattia. La tesi si inserisce all'interno del filone di ricerca volto a dimostrare l'importanza delle disfunzioni del rilascio di ATP da parte degli emicanali di Cx32 nella patogenesi della CMT1X. In particolare, il lavoro di tesi si è focalizzato sulla caratterizzazione del biosensore ecAT3.10 mediante misure di *imaging* necessarie a completare la curva dose-risposta ATP-segnale di fluorescenza del biosensore. Successivamente il biosensore è stato utilizzato nel tentativo di misurare il rilascio di ATP da parte degli emicanali di Cx32 espressi in cellule HeLa.

## 3 TECNICHE UTILIZZATE

### 3.1 *Imaging* di Fluorescenza e FRET

#### 3.1.1 Fluorescenza

Ogni molecola biatomica è caratterizzata da una sequenza di curve di Morse: la prima, chiamata *ground state*  $S_0$ , rappresenta l'energia minima di ciascuna molecola, seguita poi dalle altre ( $S_1$ ,  $S_2$ , etc) che rappresentano gli stati eccitati [11]. Ogni stato elettronico è ulteriormente diviso in livelli di energia vibrazionale e rotazionale associata ai nuclei atomici e orbitali di legame. L'assorbimento di un fotone può portare una molecola dal livello più basso,  $S_0$ , ad uno più alto. Quando un fluoroforo assorbe energia da una sorgente di luce, viene solitamente eccitato ad un livello vibrazionale superiore per poi rapidamente ricadere nel livello con energia minore dello stesso stato eccitato: tale processo viene chiamato *vibrational relaxation* oppure *internal conversion*. L'eccesso di energia del livello vibrazionale eccitato viene convertita in energia cinetica della molecola stessa o delle circostanti e la molecola eccitata rimane nello stato più basso,  $S_1(0)$ , per poi tornare allo stato fondamentale. Il processo di fluorescenza deriva dalla diseccitazione di questo livello: a causa dell'energia persa nell'*internal conversion*, l'energia  $h\nu_{em}$  dei fotoni fluorescenti è minore dell'energia  $h\nu_{exc}$  dei fotoni di eccitazione e dunque le lunghezze d'onda dei fotoni fluorescenti sono shiftate nelle lunghezze d'onda maggiori.

#### 3.1.2 FRET

Il FRET (dall'inglese *Fluorescence Resonance Energy Transfer* o *Förster Resonance Energy Transfer*) è un fenomeno di trasferimento energetico tra fluorofori sfruttato per la determinazione delle strutture di molecole biologiche in rapporto tra loro. Il meccanismo sfrutta la presenza di due molecole fluorescenti, chiamate l'una donatore, l'altra accettore; la prima viene investita da un fascio luminoso della lunghezza d'onda relativa al suo picco di assorbimento e, una volta eccitata, emette fluorescenza secondo il suo tipico spettro di emissione. Se tale spettro si sovrappone



a quello di assorbimento dell'acceptore, ovvero i salti energetici per la diseccitazione del primo e l'eccitazione del secondo sono analoghi, il donatore non emette luce, ma, per risonanza, l'emissione viene prodotta dall'acceptore. Il processo non è di tipo elettromagnetico, dunque non prevede l'emissione di luce del donatore seguita dall'assorbimento dei fotoni emessi da parte dell'acceptore, altrimenti il trasferimento di energia luminosa sarebbe troppo dipendente dalle proprietà ottiche del solvente, rendendo la tecnica di FRET di difficile applicazione. Il donatore, invece, si comporta come un dipolo oscillante che può trasferire energia a un altro dipolo che abbia una simile frequenza di risonanza; il trasferimento di energia, dunque, non sarà sensibile alle proprietà del solvente utilizzato, dato che tale processo dipende esclusivamente dalla mutua distanza delle molecole e non dal mezzo da attraversare. Il requisito principale affinché la tecnica di FRET sia efficiente è la sufficiente sovrapposizione dello spettro di emissione del donatore con quello di assorbimento dell'acceptore. Se, da un lato, la sovrapposizione dei due spettri deve essere più ampia possibile, è anche però necessario che i due spettri di emissione non siano sovrapponibili: nel caso in cui ciò accadesse, la rilevazione dell'emissione dell'acceptore presenterebbe un elevato rumore di fondo relativo alla contemporanea emissione del donatore. È inoltre fondamentale che i due spettri del donatore non siano sovrapponibili, per evitare fenomeni di auto-trasferimento di energia tra diverse molecole di donatore presenti in soluzione.

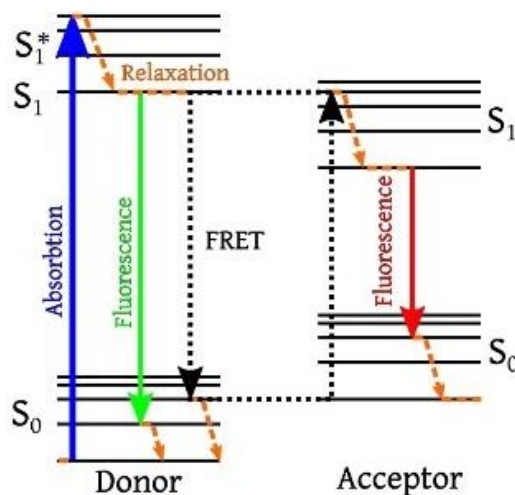


Figura 2: Rappresentazione grafica del fenomeno della fluorescenza e del fenomeno di FRET

### 3.1.3 Applicazioni della tecnica FRET

Le applicazioni primarie della FRET consistono essenzialmente nell'utilizzo dei due fluorofori come etichette per l'individuazione e lo studio di due molecole di interesse ed in particolare la misura della spaziatura intermolecolare per un range compreso tra 1-10 nm; tale misura risulta essere molto utile per eventi cellulari come il ripiegamento delle proteine, le interazioni del substrato, la cinetica degli enzimi e le molecole-segnale intercellulari [12]. L'esistenza di una vasta gamma di proteine fluorescenti dalle quali costruire *FRET reporters* ha permesso di condurre a un'enorme varietà di studi di FRET su cellule vive.

### 3.1.4 Problematiche e possibili risoluzioni

La tecnica di FRET ha diverse limitazioni inerenti al processo fisico e alle tecnologie utilizzate per la misura: le proteine fluorescenti, ad esempio, sono sensibili ai cambiamenti nell'ambiente locale, come variazioni del pH, concentrazioni ioniche, variazioni di temperatura e indice di rifrazione [12]. Più volte, nell'esecuzione degli esperimenti per questa tesi, sono state riscontrate questo tipo di problematiche. Il limite più grande delle misure di FRET risulta essere il basso rapporto segnale-rumore (SNR) associato all'imaging. Sebbene si siano sviluppate molte tecnologie, tutte soffrono di SNR scarso rispetto all'*imaging* di una singola etichetta fluorescente. I motivi principali per cui ciò avviene sono la diminuzione della fluorescenza dovuta alla degradazione fotochimica del fluoroforo (*photobleaching*), l'autofluorescenza (dovuta alla fluorescenza già presente, seppur in basse quantità, del campione preso in esame) e il fatto che, nonostante i due spettri non si sovrappongano per la maggior parte, accade sempre che entrambe le molecole contribuiscano al segnale. Per ovviare a queste problematiche, il prossimo passo sarà lo sviluppo di nuovi approcci per la microscopia FRET che consentano misurazione più accurate. In primo luogo, sono necessarie innovazioni biologiche quali la creazione di migliori etichette fluorescenti; in secondo luogo, sono fondamentali innovazioni tecnologiche quali lo sviluppo delle nuove modalità di imaging, rivelatori di imaging più sensibili e percorsi di trasmissione ottica più efficienti; in terzo luogo, risulta utile l'affinamento dei processi di analisi matematica e statistica, facendo un uso migliore dei dati acquisiti.

### 3.1.5 Fluoroforo utilizzato: GFP

I fluorofori più usati per FRET sono quelli della famiglia della GFP (*Green Fluorescent Protein*), molecole proteiche molto più maneggevoli dei fluorofori organici. La GFP è una proteina espressa nella medusa *Aequorea victoria* che grazie alla sua proprietà di fluorescenza, alle sue modeste dimensioni e alla possibilità di modificarne le caratteristiche spettroscopiche, è diventata negli ultimi decenni un diffuso strumento per esperimenti e tecniche di biologia molecolare [13]. La sua struttura, nel complesso, è molto compatta, in modo da proteggere il fluoroforo da reazioni con altre molecole che potrebbero inattivarlo. L'assorbimento della cosiddetta GFP *wild-type*, che fa parte della prima classe di queste proteine, ha un picco alla lunghezza d'onda di 475 nm, dunque per l'eccitazione si può utilizzare sia una radiazione nel visibile; l'emissione ha un picco massimo intorno a 505 nm e dunque la GFP *wild-type* emette una radiazione di colore verde. Esistono altre sei classi distinte in base al tipo di mutazione rispetto alla *wild-type* e alle conseguenti diverse caratteristiche nello spettro di emissione e assorbimento. In laboratorio sono state utilizzate la YFP (*Yellow Fluorescein Protein*) che fluoresce nel giallo, facente parte della IV classe, e la CFP (*Cyan Fluorescein Protein*) che emette con color azzurro-grigio, appartenente alle V classe.

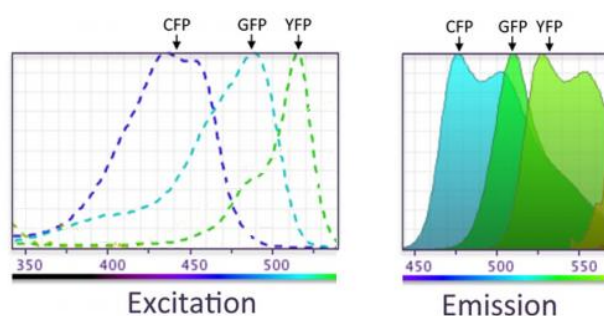


Figura 3: Spettri di eccitazione ed emissione per i fluorofori utilizzati: YFP, GFP, CFP. Un LED ad una lunghezza d'onda di 427 nm eccita quasi esclusivamente la CFP, mentre uno a 460 nm eccita principalmente la GFP.

## 4 MATERIALI E METODI

### 4.1 Coltura cellulare e trasfezione

Per gli esperimenti sono state utilizzate cellule HeLa provenienti da *Città della Speranza*, conservate in incubatore a 37°C con 5% di CO<sub>2</sub> in un bagno di DMEM/F-12 con l'aggiunta di L-Glutammina (Gibco 11320-074), 10% FBS (Gibco 10082147) e 1% penicillina-streptomina (Gibco 15140-122). Giunte a confluenza, sono state staccate utilizzando il TryPLE™ Express senza rosso fenolo (Gibco 12604-021) e seminate su vetrini da 12mm di diametro ad una concentrazione tale da raggiungere il 50% di confluenza a 72h dalla semina, vale a dire al momento dell'*imaging*.

Le cellule HeLa vengono trasfettate con ecAT3.10 oppure cotrasfettate con Cx32-EGFP, che consente l'espressione degli emicanali da parte delle cellule di cui normalmente non sono dotate, e con ecAT3.10 che consente la misura del rilascio di ATP di questi ultimi. Per la trasfezione di due vetrini si è utilizzata la seguente procedura: il giorno successivo alla semina delle cellule si preparano due fiale con 50 µL di OptiMEM (Gibco: 31985062) ciascuna, in una vi si pone 1,4 µL di *Lipofectamine® 3000 Reagent*, nell'altra 1,6 µL di *P 3000® Reagent* e 1,7 µg di DNA plasmidico dell'ecAT3.10 (densità 1245 ng/µL), corrispondente a 1,4 µL nel caso degli esperimenti con cellule trasfettate con solamente la sonda; nel caso degli ultimi esperimenti, ovvero quelli per la verifica dell'apertura degli emicanali, 0,2 µL del vettore pIRES-EGFP codificante Cx32-WT e 1 µL di DNA plasmidico dell'ecAT3.10. Il contenuto delle fiale viene centrifugato per pochi secondi in modo da aiutare la miscela di OptiMEM e agenti trasfettanti, viene poi unito il contenuto della seconda fiala con quello della prima e incubato a temperatura ambiente per 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 in punti diversi del vetrino per favorire una distribuzione omogenea. La *well* con i vetrini viene incubata per 4h, dopo le quali si sostituisce il *medium* con il terreno sopra citato.

### 4.2 Apparato sperimentale

L'apparato sperimentale è composto da un microscopio diritto Olympus BX51WI con obiettivo Olympus LUMPlanFLN di immersione 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. Tale 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  $\lambda=427$  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  $\lambda =570/10$  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 535/43nm per la YFP. Infine la luce viene raccolta da una videocamera sCMOS (PCO Edge 5.5).

L'intero apparato del microscopio, esclusa la regolazione della messa a fuoco che è manuale per la maggior parte, viene controllato da un computer che dialoga con un *controller* (Olympus BX-UCB) per la regolazione di filtri di assorbimento e dicroici, con l'alimentatore dei LED, con il monocromatore e con la camera; per la creazione dei protocolli di stimolazione e contemporanea acquisizione illustrati al Paragrafo 4.3 è stato utilizzato il software Roboscope, sviluppato al VIMM.

La cameretta su cui si posiziona il vetrino con le cellule è montata su un supporto che si può muovere nel piano XY grazie ad un *controller*, in modo da permettere lo spostamento del vetrino per la selezione delle cellule su cui procedere con l'esperimento; un *controller* analogo viene utilizzato per muovere un *micro manipulator* per pipette da patch clamp (Axon instruments, CV-7B) che sostiene la micropipetta in cui viene inserita la soluzione contenente ATP o istamina; tale supporto è dotato di un elettrodo che va inserito all'interno della pipetta stessa, a contatto con la soluzione, per misure di elettrofisiologia.

Le micropipette utilizzate per il *puff* sono state ricavate da capillari di vetro borosilicato di lunghezza 10 cm, diametro esterno 1.5 mm e diametro interno 1.16 mm (Warner Instrument, Model No: G85150T-4), tirate in due *step* a due diverse temperature; inoltre per regolare la pressione di uscita della soluzione dalla pipetta è stato utilizzato un *puffer* Pneumatic PicoPump PV820 (WPI).

Durante l'*imaging* dei primi esperimenti, le cellule sono state mantenute a temperatura ambiente in una soluzione extracellulare composta da 150 mM di NaCl, 5 mM di KCl, 2 mM di CaCl<sub>2</sub>, 1 mM di MgCl<sub>2</sub> esaidrato, 2 mM di Piruvato di Sodio, 10 mM di HEPES e 5 mM di glucosio, con pH 7.4 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.

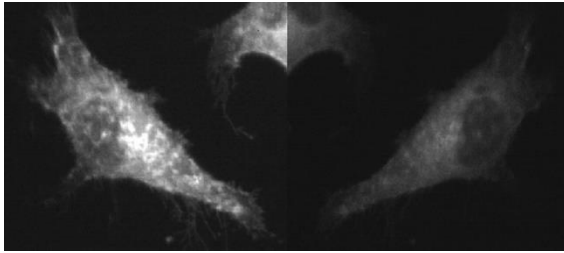
Nel caso degli ultimi esperimenti, le cellule sono state mantenute a temperatura ambiente in una soluzione extracellulare composta da 148 mM di NaCl, 5 mM di KCl,

2 mM di CaCl<sub>2</sub>, 2 mM di Piruvato di Sodio, 10 mM di HEPES e 5 mM di glucosio, con pH 7,4 grazie all'aggiunta finale di NaOH. Prima del *puff* viene perfusa per 3 minuti a velocità 1mL/min una soluzione extracellulare composta da 140 mM di NaCl, 5 mM di KCl, 0.5 mM di CaCl<sub>2</sub>, 2 mM di Piruvato di Sodio, 10 mM di HEPES e 5 mM di glucosio, e i bloccanti per i canali calcio: 4 mM di cloruro di tetraetilammonio (TEA-Cl), 4 mM CsCl, 2 mM di 4-amminopiridina (4-AP), 2 μM di TRAM-34, 400 nM di UCL-1684; la soluzione presenta un pH 7.4 grazie all'aggiunta finale di NaOH. La soluzione per il *puff* di istamina (*Histamine*, Sigma-Aldrich H7125-1G) è stata ottenuta aggiungendo quest'ultima alla soluzione contenente 0.5 mM di CaCl<sub>2</sub>, ricalibrando nuovamente il pH e subito congelandola per evitare la degradazione termica del nucleotide; per l'utilizzo nell'esperimento è stata scongelata a ghiaccio e mantenuta 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 Instruments, MultiClamp 700B) e ad un *digitizer* (Axon Instruments, 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.

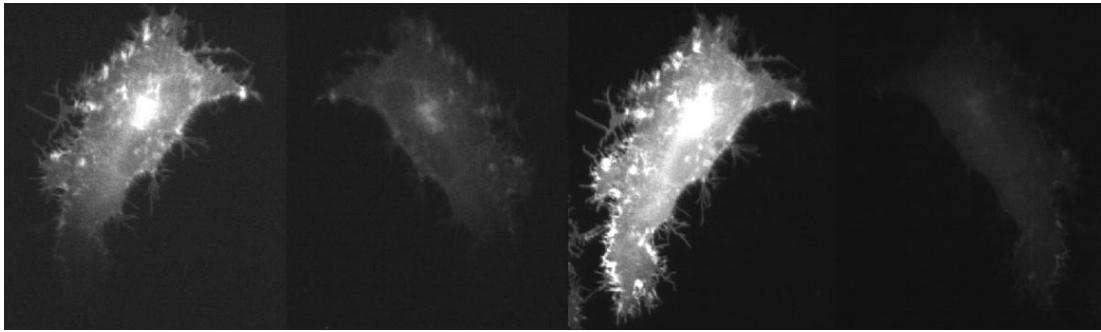
### 4.3 *Imaging* e protocollo di acquisizione

L'*imaging* a fluorescenza è stato effettuato a 48 h di incubazione (37°C, 5% di CO<sub>2</sub>) dalla trasfezione. Il software Roboscope permette la gestione diretta dell'apparato sperimentale e l'esecuzione di protocolli di acquisizione. Per le operazioni preliminari alla presa dati, ovvero la messa a fuoco del piano occupato dalle cellule e il posizionamento della pipetta, si è preferito, per questioni di praticità e di campo visivo più ampio, procedere con la diretta visione agli oculari con illuminazione continua a 570 nm tramite il monocromatore; analogamente, per la selezione della cellula su cui operare si sono utilizzati gli oculari con il monocromatore acceso ad una lunghezza d'onda di 485 nm e il LED a 427 nm di lunghezza d'onda. Per la presa dati viene utilizzato 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 della YFP sufficientemente elevato (almeno 500 unità) rispetto al segnale di fondo e che sia ben isolata in modo da non incorrere in quelli che sono stati definiti *side effects* (cfr Paragrafo 5.1); per il secondo esperimento si verifica inoltre che la cellula sia cotrasfettata illuminandola con il led 460 nm per verificare l'eccitazione della GFP. Dal confronto delle immagini in Figura 4 si vede che la fluorescenza cambia a seconda della trasfezione, in quanto la cellula cotrasfettata presenta un *pattern* di fluorescenza simile (anche se ad intensità diverse) nei due canali se illuminata con il LED a 427 nm, mentre se illuminata con il LED a 460 nm il segnale è molto debole ed omogeneo nel canale della CFP in quanto si tratta di fluorescenza dovuta quasi esclusivamente a GFP, come si vede in Figura 4.



**Figura 4.** In alto: cellula trasfettata con ecAT3.10, illuminata con il led a 427 nm. In basso, a sinistra: cellula cotrasfettata con Cx32-EFGP ed ecAT3.10, illuminata con il led a 427 nm. In basso, a destra: cellula cotrasfettata con Cx32 ed ecaAT3.10, illuminata con il led a 460 nm.



Selezionata la cellula-bersaglio, si inserisce nella pipetta la soluzione, precedentemente filtrata, contenente ATP o istamina, tramite l'utilizzo di una siringa tenuta a ghiaccio, si facilita la risalita di bolle d'aria colpendola lievemente con il dito e la si fissa all'*holder* controllando che l'elettrodo sia bagnato dalla soluzione stessa: questo espediente serve per verificare che la pipetta non sia ostruita né prima né durante l'esperimento per effetto di bolle d'aria o di sporcizie presenti nella soluzione extracellulare, poiché tramite l'apparato di elettrofisiologia si vedrebbe un aumento della resistenza elettrica della pipetta dal range di 3-7 M $\Omega$  a valori nettamente superiori. Si posiziona, dunque, la punta della pipetta nel piano in cui giace la sommità della cellula, alla distanza di circa 25-30  $\mu\text{m}$  da essa. In tal modo si è sicuri che il *puff* investa completamente la superficie della cellula, ma allo stesso tempo non inneschi degli artefatti dovuti alla variazione di pressione. Il posizionamento ottimale della pipetta è stato trovato tramite esperimenti con fluoresceina e con soluzione extracellulare (come spiegato ai Paragrafi 5.1 e 5.2).

Per l'acquisizione del segnale di fluorescenza è stato utilizzato il protocollo descritto sopra, registrando, per il primo esperimento, il segnale dei primi 60 frame senza 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. Per il secondo esperimento, invece, sono stati registrati i primi 15 frame senza stimolo, dal 15° al 30° frame viene spruzzata istamina, dal 30° al 70° frame si attende che il segnale torni a basale; per quanto riguarda l'ATP si sono registrati 15 frame di basale, dal 15° al 65° frame avviene il *puff* e successivamente inizia il *wash-out* per sostituire la soluzione 0.5 mM CaCl<sub>2</sub> con quella 2 mM CaCl<sub>2</sub>.

#### 4.4 Analisi dei dati

I dati ricavati dagli esperimenti sono costituiti da una sequenza di immagini in cui ciascun fotogramma è diviso a metà per effetto del *beam splitter*, presentando quindi

la stessa immagine vista in maniera speculare nei due canali, quello relativo alla YFP e quello relativo alla CFP. L'analisi è stata compiuta utilizzando il software *Vimaging*, 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 speculari nei due canali in ciascun fotogramma. Una volta eseguita la corrispondenza tra i due canali, si disegnano delle regioni di interesse (ROI) sulla cellula, si seleziona l'area o il valore di *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, a cui viene sottratto il *background* e dunque vengono plottati i segnali nei due canali, il *ratio* R dato dalla frazione YFP/CFP e il *ratio* normalizzato  $\Delta R/R_0$ . In seguito, i dati prodotti da *Vimaging* sono stati elaborati da *CompareGroups*, un software su supporto MATLAB, su cui vengono raccolti e organizzati i dati delle misure alle diverse concentrazioni di ATP, e per ciascuno viene eseguito un fit esponenziale; successivamente viene calcolata la media dei segnali e viene plottata la curva dose-risposta.

## 5 RISULTATI

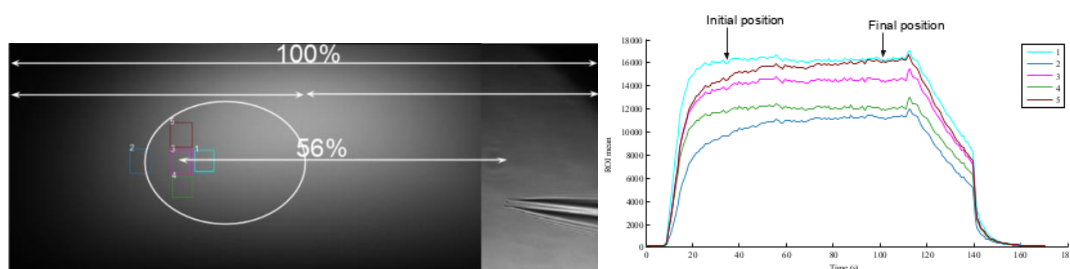
### 5.1 Side effects

Nello svolgimento degli esperimenti si sono riscontrate diverse problematiche tra cui la risposta, del tutto inaspettata, ad una concentrazione pari a 0 M ATP (la pipetta era stata riempita di soluzione extracellulare). Il motivo di tale effetto viene attribuito all'apertura degli *stretch activated channels*, che, a seguito del puff, si aprono nella cellula stessa e nelle cellule vicine, inducendo un rilascio di ATP. Dato che l'ATP è un anione, è ragionevole pensare che il suo flusso venga facilitato, ed inoltre, la sua massa pari a 507.18 Da risulta essere comparabile con quella delle molecole (376 Da) che i TRP *channels* fanno passare. Esperimenti su cellule uroteliali di topi hanno mostrato un aumento delle concentrazioni citosoliche di  $Ca^{2+}$  in risposta a stimoli di stiramento meccanico, portando a un rilascio di ATP compreso in un range tra i 0 nM e i 10  $\mu$ M, a sostegno della nostra ipotesi [14]. Questa problematica è stata risolta utilizzando cellule isolate su cui compiere l'esperimento, in maniera tale da non stimolare un rilascio di ATP da parte delle cellule vicine al bersaglio, e mantenendo una distanza sufficientemente elevata, in modo da non stimolare un'apertura dei canali *stretch activated* della cellula stessa.

### 5.2 Test con la fluoresceina

A seguito degli accorgimenti per il rilascio di ATP dei canali *stretch activated* è stato necessario eseguire un test per la verifica che la concentrazione nominale, la massima, raggiungesse la cellula bersaglio anche ad una distanza elevata. Il test è stato eseguito con la 5(6)-Carbossil Fluoresceina (Sigma Aldrich 447293-1G) che emette una intensa fluorescenza di lunghezza d'onda circa pari a 520-530 nm (di colore giallo-verde) quando viene eccitata nella gamma del blu (465-490 nm). L'esperimento viene eseguito partendo da una posizione che viene registrata in transilluminazione e, con il protocollo di acquisizione utilizzato per gli esperimenti con l'ATP, la pipetta viene mossa in 7 diverse posizioni lungo l'asse x, mantenendo

invariata la posizione lungo l'asse y; alla fine viene registrata in transilluminazione l'ultima posizione. Utilizzando le ROI rettangolari, viene osservata la variazione di concentrazione a seguito del movimento della pipetta, in varie posizioni, per stimare quale sia la posizione ideale per la cellula-bersaglio. Analizzando il gradiente di concentrazione, si giunge alla conclusione che la concentrazione nominale arriva alla ROI rosa già dalla prima posizione della pipetta, mentre in altre ROI, come la blu e rossa, la concentrazione nominale, ovvero la massima, viene raggiunta a seguito di movimenti della pipetta stessa. Viene allora stimata la distanza ideale dal centro della cellula all'estremità della pipetta, tenendo in considerazione l'inclinazione di  $20^\circ$  tra la pipetta e il piattino del microscopio, che risulta essere pari a  $28 \mu\text{m}$  (56% dello schermo).



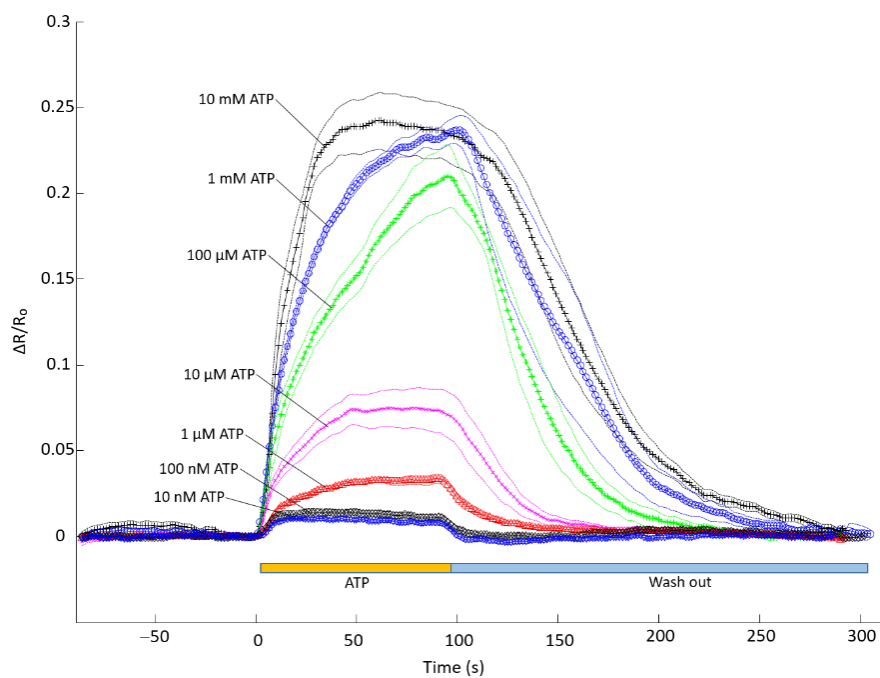
**Figura 5.** **A sinistra:** Posizione iniziale della pipetta registrata in transilluminazione, sovrapposta all'immagine registrata con il LED a 427 nm. **A destra:** andamento dell'intensità media di ciascuna ROI al variare della posizione della pipetta.

### 5.3 Completamento della curva dose-risposta

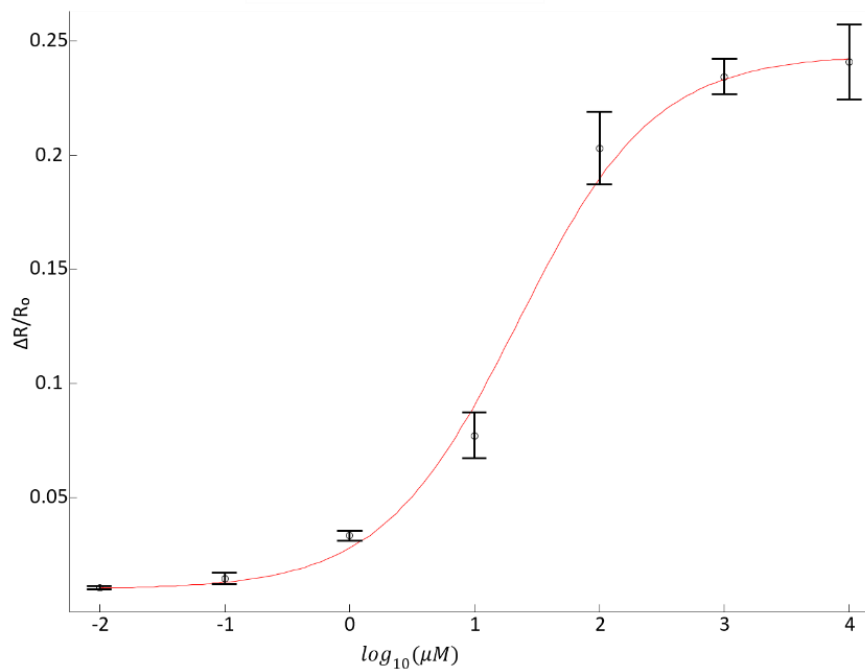
Attraverso il protocollo descritto al Paragrafo 4.3, è stata misurata la risposta dell'ecAT3.10 alle concentrazioni di ATP 10 mM e 10 nM per completare la curva dose-risposta del laboratorio del prof. Bortolozzi su cui erano già presenti i dati relativi alle concentrazioni di ATP di 100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM. A partire da questi dati si è trovato il massimo della variazione del segnale  $\Delta R/R_0$  di ogni curva, tramite il software *CompareGroups*. In Figura 6 viene riportato l'andamento delle tracce mediate sul numero di esperimenti alle diverse concentrazioni, dopo aver effettuato un *detrend* esponenziale su ciascuna di esse per compensare il *photobleaching* residuo; l'intervallo di confidenza viene calcolato sulla base dell'errore sulla media ( $\sigma/\sqrt{N}$ ).

Dopo l'identificazione del massimo, viene eseguita la media per ogni concentrazione e infine si costruisce la curva dose-risposta in Figura 7 in cui sulle ascisse viene posta la concentrazione di ATP, mentre sulle ordinate il massimo in scala logaritmica (base 10).





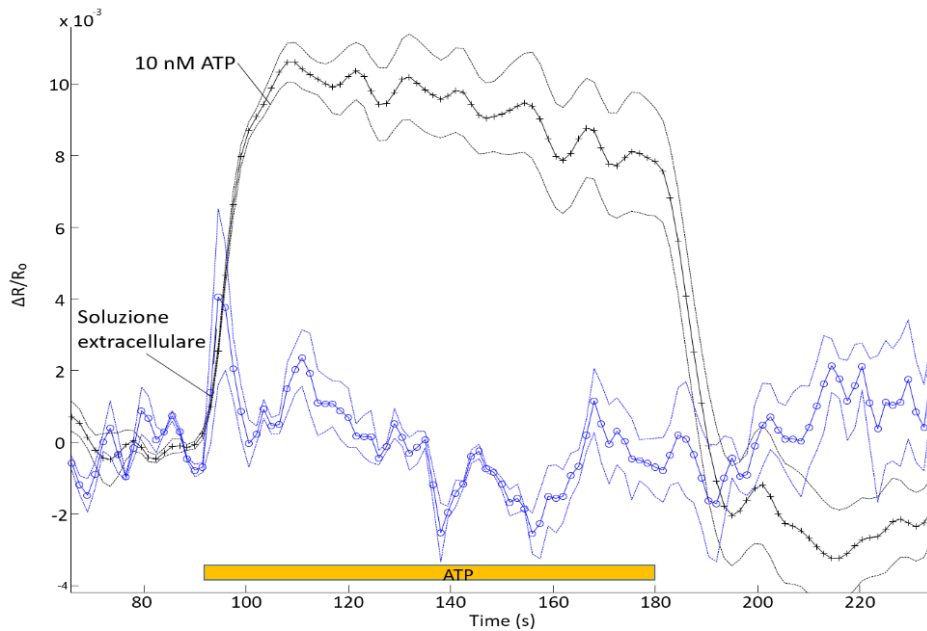
**Figura 6:** Curve rappresentanti  $\Delta R/R_0$  alle diverse concentrazioni di ATP, a seguito della traslazione dell'inizio del puff al tempo zero. La linea tratteggiata rappresenta l'intervallo di confidenza (N=6 per 10 mM ATP, 1 mM ATP, 100  $\mu$ M ATP, 10 nM ATP; N=7 per 10  $\mu$ M ATP; N=5 per 100nM ATP).



**Figura 7:** Curva dose-risposta della sonda ecAT3.10 al *puff* di ATP.

#### 5.4 Esperimenti di controllo

Per verificare che il metodo del *puff* non alteri le risposte del biosensore, causando degli artefatti di movimento dovuti alla pressione, sono stati eseguiti degli esperimenti di controllo spruzzando soluzione extracellulare priva di ATP su cellule trasfettate; in Figura 8 viene riportato il grafico della media dei segnali di fluorescenza di misure a 0 mM di ATP, sui quali è stato operato un detrend esponenziale per compensare l'effetto del *photobleaching*. Confrontando tale andamento con la media dei segnali ottenuti dagli esperimenti a 10 nM di ATP viene confermato il fatto che questa concentrazione rientra nel range di sensibilità della sonda.



**Figura 8:** Confronto tra la risposta della sonda ad una concentrazione di 10 nM ATP e gli esperimenti di controllo (N=6 per 10 nM ATP, N=3 per soluzione extracellulare).

#### 5.5 Esperimenti con l'istamina su cellule cotrasfettate

In cellule cotrasfettate con Cx32 ed ecAT3.10, tramite il *puff* di istamina, si stimola un transiente  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare che attiva l'apertura degli emicanali di Cx32 ed il conseguente rilascio di ATP che viene misurato e quantificato mediante la sonda ecAT3.10 (Figura 10).

Per verificare che la trasfezione con l'ecAT3.10 sia andata a buon fine si eseguono degli esperimenti di verifica spruzzando ATP 1 mM e controllandone la risposta. Nel caso in cui il segnale sia compatibile con quello derivante dalla calibrazione della sonda, si considera valido l'esperimento. Si riporta la risposta al *puff* 1 mM ATP in Figura 9, che risulta leggermente minore rispetto a quella presente nella curva dose-risposta.

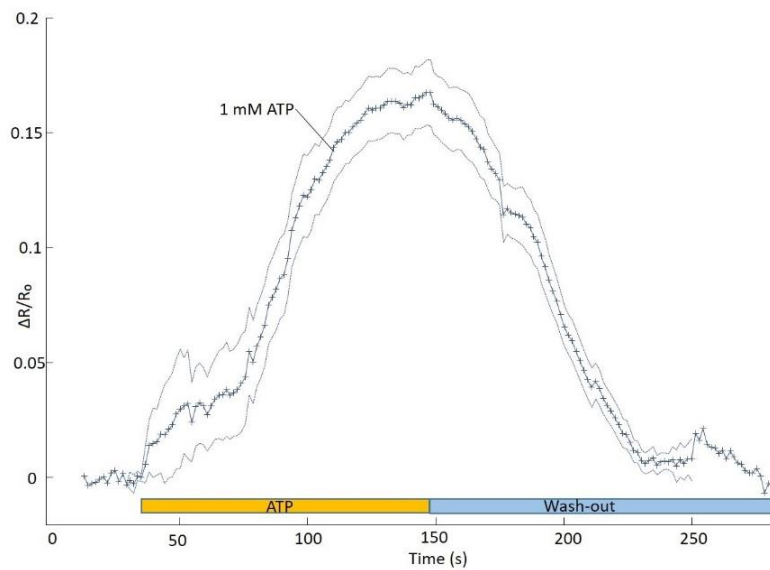


Figura 9: Risposta delle cellule cotrasfettate con ecAT3.10 e Cx32 al *puff* di ATP 1mM (N=9).

### 5.5.1 Esperimenti di controllo con soluzione extracellulare

In analogia con quanto eseguito per la calibrazione dell'ecAT3.10, si eseguono gli esperimenti di controllo per verificare che il segnale dovuto al *puff* di istamina non sia dovuto ad artefatti meccanici. Con il medesimo protocollo, descritto al Paragrafo 4.3, si spruzza soluzione extracellulare controllando che la variazione di pressione non evochi alcun segnale. In Figura 10 viene riportato il grafico della media dei segnali di fluorescenza di misure con soluzione extracellulare, sui quali è stato operato un detrend esponenziale per compensare l'effetto del *photobleaching*. Confrontando tale andamento con la media dei segnali ottenuti dagli esperimenti con l'istamina viene confermato il fatto che la risposta evocata è correlata alla presenza di istamina ed è infatti distinguibile da artefatti sperimentali.

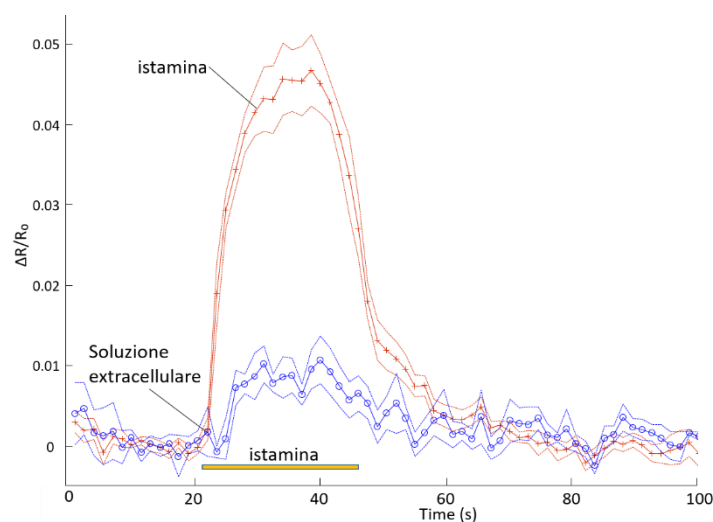
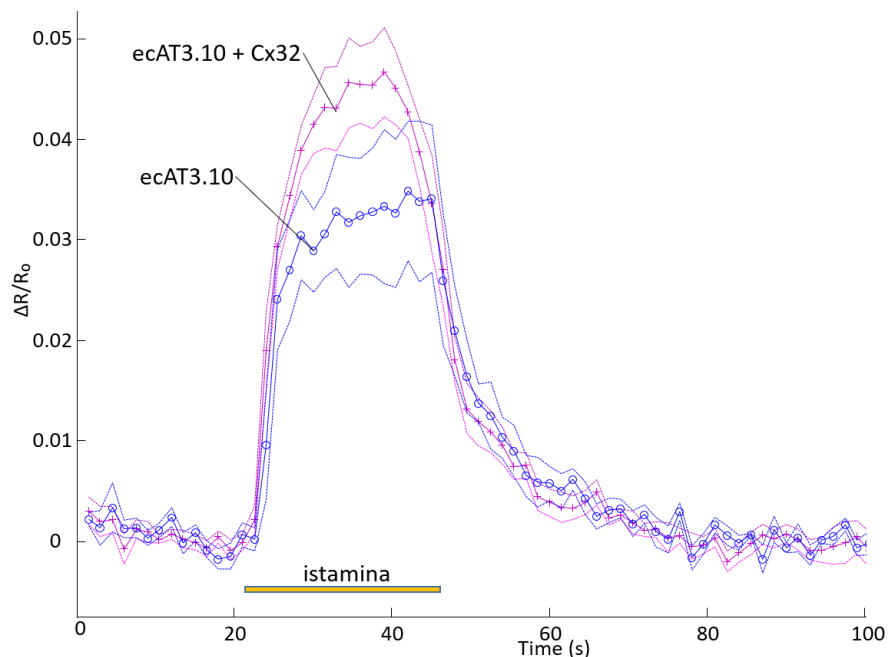


Figura 10: Confronto tra la risposta al puff di istamina 250  $\mu$ M e la risposta al puff di soluzione extracellulare (N=9 per istamina, N=4 per soluzione extracellulare).

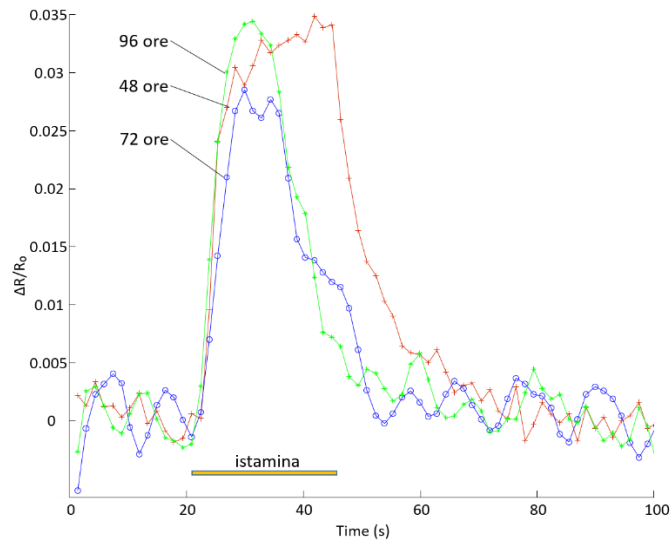
### 5.5.2 Esperimenti di controllo su cellule trasfettate con ecAT3.10

Per controllare se la concentrazione di ATP misurata a seguito del *puff* di istamina derivasse dall'apertura degli emicanali o da altri effetti, sono stati eseguiti esperimenti su cellule prive di questi ultimi. Nel caso in cui non si fosse riscontrata risposta, si sarebbe potuto confermare che l'ATP fosse fuoriuscito dagli emicanali stimolati, in caso contrario, invece, la risposta non poteva essere soltanto ricondotta ad una loro apertura. Tali esperimenti hanno evidenziato solamente un segnale lievemente minore di cellule trasfettate con solo ecAT3.10 rispetto a cellule cotrasfettate, facendo dunque emergere che una gran parte della risposta misurata al Paragrafo 5.5 non deriva dalla semplice apertura degli emicanali. Sembrerebbe quindi che un rilascio di ATP dovuto agli emicanali sia presente, ma difficilmente identificabile da queste misure.



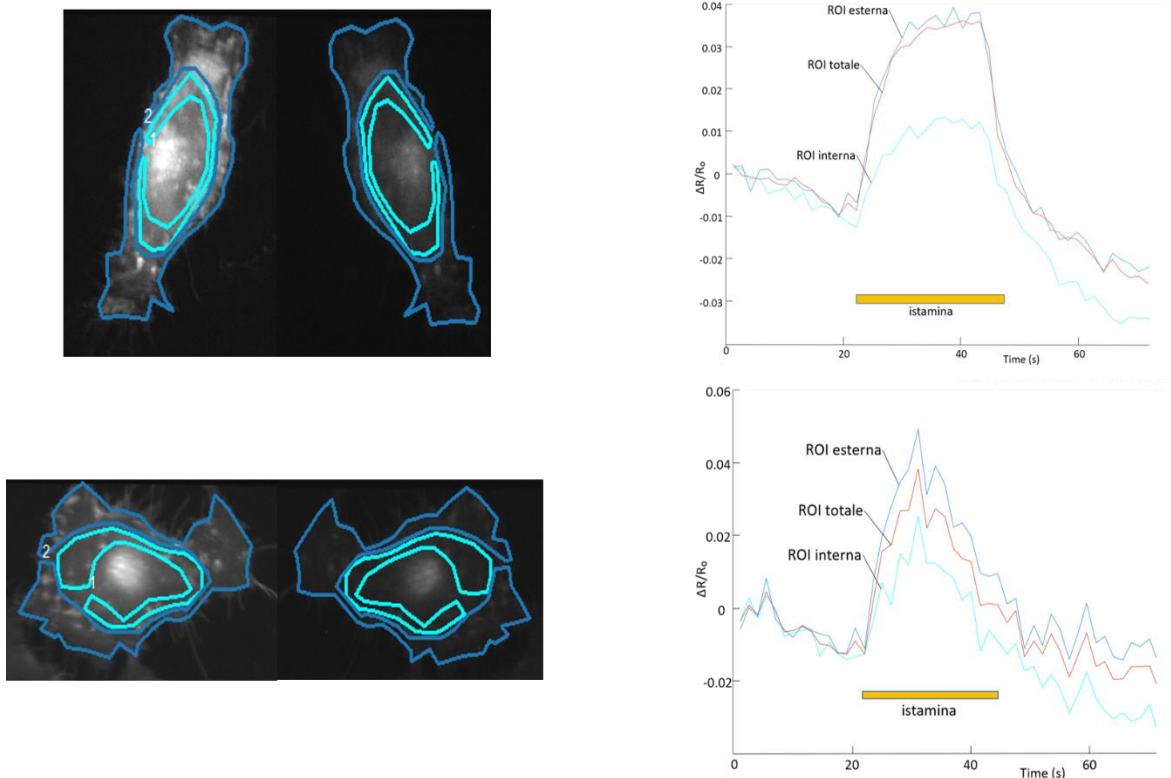
**Figura 11:** Confronto tra il puff di istamina 250  $\mu$ M su cellule cotrasfettate con Cx32 ed ecAT3.10 e cellule trasfettate con ecAT3.10 a 48 ore dalla trasfezione (N=9 per ecAT3.10+Cx32, N=5 per ecAT3.10).

Per verificare che la risposta non fosse dovuta a una variazione di ATP intracellulare misurata dalla frazione di sonda presente all'interno, si sono eseguiti degli esperimenti su cellule trasfettate con ecAT3.10 dopo 72 e 96 ore dalla trasfezione, dato che al passare del tempo la sonda si concentra sulla membrana. In **Figura 12** viene riportato il confronto tra le risposte al *puff* di istamina, dove si vede che i massimi delle risposte sono analoghi anche al passare del tempo. Ciò conferma il fatto che il segnale misurato deriva principalmente dalla membrana.



**Figura 12:** Risposta delle cellule trasfettate con ecAT3.10 al *puff* di istamina 250  $\mu$ M (N=5 per 48 ore, N=1 per 72 ore, N=96 ore).

Tale tesi è sostenuta anche dall'analisi di immagine in **Figura 13**, dove emerge che la quasi totalità del segnale misurato nelle ROI considerate proviene dalla parte esterna e non da quella interna.

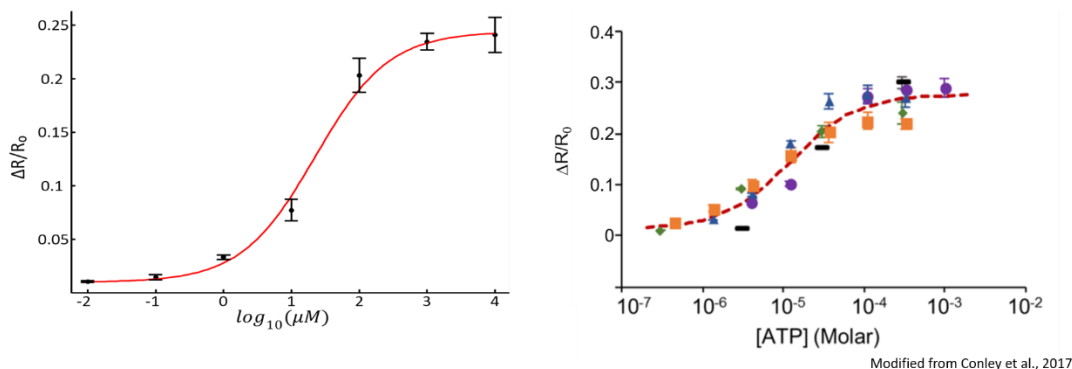


**Figura 13:** Confronto tra il segnale rilevato nella ROI esterna, ROI interna e ROI totale, composta dalla somma tra ROI interna ed esterna.

## 6 DISCUSSIONE

### 6.1 Confronto con la calibrazione del produttore

Mathew Tantama dell'università di Purdue (Indiana, USA) ha sviluppato e testato la sonda ecAT3.10 su cellule Neuro2A [10], verificandone la risposta a diverse concentrazioni di ATP. Nel nostro laboratorio è stata invece eseguita la misura della risposta a diverse concentrazioni di ATP su cellule HeLa, in condizioni sperimentali adatte ai nostri scopi e fino alla concentrazione di 10 nM che non è presente in [10]. È possibile eseguire un confronto tra le due curve dose-risposta (Figura 14) e verificare la concordanza dei due grafici.



**Figura 14: Confronto tra la calibrazione del produttore e la calibrazione eseguita in laboratorio.** L'andamento sigmoidale risulta essere il medesimo in entrambe le calibrazioni, ciò conferma dunque la riuscita della taratura della sonda ecAT3.10.

La curva dose-risposta ottenuta evidenzia l'ottima sensibilità e range dinamico di questa sonda che quindi, in linea di principio, sarebbe in grado di misurare il rilascio di ATP da parte degli emicanali di Cx32. Anche nel caso di cellule cotrasfettate, la sonda si è dimostrata in grado di misurare correttamente la concentrazione di ATP (1 mM). Tuttavia tale risposta è risultata minore rispetto a quella presente nella curva dose-risposta, dove la diminuzione del segnale potrebbe essere ascrivibile al *photobleaching* della sonda (già discusso precedentemente) dato che il puff di ATP viene eseguito dopo che la cellula è stata illuminata per 105 secondi. Inoltre il *background* sottratto al segnale della telecamera è una media tra i segnali di fluorescenza di cellule trasfettate con solo Cx32, per cui ci potrebbe essere una componente dovuta alla difficile discriminazione del *background* della GFP.

### 6.2 Risposta all'istamina

Gli esperimenti su cellule cotrasfettate hanno evidenziato una risposta della sonda allo stimolo di istamina, che, contrariamente alla rapida dinamica di apertura e chiusura degli emicanali di Cx32 [4], perdura per tutta la durata del puff di istamina. Questo effetto è connesso alla risposta osservata anche in cellule che non esprimono Cx32 (Paragrafo 5.5.2). Non è stato dunque possibile discriminare il rilascio di ATP da parte degli emicanali nelle cellule cotrasfettate. Si è deciso allora di investigare la natura della risposta in cellule che non esprimono la Cx32, supponendo inizialmente che il segnale misurato non provenisse soltanto dalla frazione di sonda presente sulla membrana plasmatica ma anche da quella presente intracellularmente. Variazioni di

ATP intracellulari sono state osservate recentemente in cellule HeLa [15] in risposta ad una variazione della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatico. Tuttavia, ammettendo che la frazione di sonda intracellulare sia localizzata nel reticolo, ci si aspetterebbe che un aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatico diminuisse il relativo segnale a seguito di un diminuito trasferimento di ATP dai mitocondri al reticolo. Si è deciso comunque di condurre un'analisi di immagine degli esperimenti già fatti e nuovi esperimenti *ad hoc* per verificare se la risposta ad istamina in cellule senza Cx32 fosse ascrivibile alla componente intracellulare della sonda (Paragrafo 5.5.2).

Sono stati eseguiti esperimenti dopo 48, 72 e 96 ore dalla trasfezione, considerando che con il passare del tempo l'accumulo di proteina (i.e. la nostra sonda) diminuisce lungo il *pathway* di trasduzione (reticolo e Golgi) per concentrarsi sulla membrana target (citoplasmatica). Confrontando i segnali della sonda ottenuti durante stimolazione con istamina a 72 e 96 ore dalla trasfezione con quelli a 48 ore non si è trovata una differenza significativa. Inoltre, dall'analisi di immagine è emerso che la variazione di segnale della sonda proviene soprattutto dalla regione della membrana plasmatica, mentre una minor variazione proviene da compartimenti intracellulari. Si è allora concluso che il segnale proviene per la maggior parte della membrana.

Sono state quindi avanzate altre due ipotesi: le cellule HeLa rilasciano ATP oppure l'istamina si lega alla sonda ecAT3.10 generando un segnale artefattuale.

Per verificare la prima supposizione, peraltro non supportata dalla letteratura corrente, è ragionevole verificare che si tratti di un meccanismo calcio-mediato. Possibili esperimenti di stimolazione dell'aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare non dipendente da istamina possono essere realizzati mediante flash photolysis di NP-EGTA e caged-IP3 oppure mediante patch-clamp iniettando BAPTA ad alta concentrazione (e.g. 4 mM, controllo negativo) oppure  $\text{Ca}^{2+}$  a 500-1000 nM (controllo positivo).

Per quanto riguarda la seconda ipotesi, si potrebbero utilizzare analoghi dell'istamina (agonisti del recettore H1) per stimolare la cellula verificando che la sonda non risponda direttamente a tali molecole.

## 7 CONCLUSIONI

Le misure effettuate in questo lavoro di tesi sono state certamente coronate da successo in merito al completamento della curva dose-risposta della sonda ecAT3.10. Per quanto riguarda l'utilizzo della sonda allo scopo di misurare il rilascio di ATP da parte degli emicanali di Cx32 in cellule HeLa, gli esperimenti hanno evidenziato la presenza di un elemento di disturbo della misura ascrivibile al rilascio di ATP da altri canali o ad un effetto artefattuale della sonda stimolato da istamina. Gli esperimenti futuri saranno volti a identificare il meccanismo responsabile di tale problema al fine di bloccarlo e poter così discriminare il contributo di rilascio di ATP da parte degli emicanali di Cx32. Una volta messa a punto questa tecnica di misura, lo studio si concentrerà sul rilascio di ATP da parte di emicanali sani e con mutazioni di interesse patologico (R220X, V63I, H73L) disponibili in laboratorio. In particolare, ci si aspetta che la mutazione R220X blocchi il rilascio di ATP come suggerito in un precedente lavoro del laboratorio del prof. Bortolozzi [4].

## 8 BIBLIOGRAFIA

1. Morena, J., A. Gupta, and J.C. Hoyle, *Charcot-Marie-Tooth: From Molecules to Therapy*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(14).
2. Bortolozzi, M., *What's the Function of Connexin 32 in the Peripheral Nervous System?* Front Mol Neurosci, 2018. **11**: p. 227.
3. Fairweather, N., et al., *Mutations in the connexin 32 gene in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1)*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(1): p. 29-34.
4. Carrer, A., et al., *Cx32 hemichannel opening by cytosolic Ca<sup>2+</sup> is inhibited by the R220X mutation that causes Charcot-Marie-Tooth disease*. Hum Mol Genet, 2018. **27**(1): p. 80-94.
5. Di Virgilio, F., et al., *Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(10): p. 601-618.
6. Nualart-Marti, A., et al., *Role of connexin 32 hemichannels in the release of ATP from peripheral nerves*. Glia, 2013. **61**(12): p. 1976-89.
7. Lin, J., et al., *Time-resolved ATP measurements during vesicle respiration*. Talanta, 2019. **205**: p. 120083.
8. Lobas, M.A., et al., *A genetically encoded single-wavelength sensor for imaging cytosolic and cell surface ATP*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 711.
9. Rajendran, M., et al., *Imaging Adenosine Triphosphate (ATP)*. Biol Bull, 2016. **231**(1): p. 73-84.
10. Conley, J.M., et al., *Imaging extracellular ATP with a genetically-encoded, ratiometric fluorescent sensor*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0187481.
11. Borghesani, A.F., *Istituzioni di fisica della materia*. Vol. 1. 2017, Padua: Progetto Libreria. 250.
12. Leavesley, S.J. and T.C. Rich, *Overcoming limitations of FRET measurements*. Cytometry A, 2016. **89**(4): p. 325-7.
13. Shimomura, O., *The discovery of aequorin and green fluorescent protein*. J Microsc, 2005. **217**(Pt 1): p. 1-15.
14. Miyamoto, T., et al., *Functional role for Piezo1 in stretch-evoked Ca<sup>2+</sup>(+) influx and ATP release in urothelial cell cultures*. J Biol Chem, 2014. **289**(23): p. 16565-75.
15. Yong, J., et al., *Mitochondria supply ATP to the ER through a mechanism antagonized by cytosolic Ca<sup>2+</sup>*. Elife, 2019. **8**.