

# Misura della concentrazione intracellulare di ioni calcio con tecniche di video-imaging

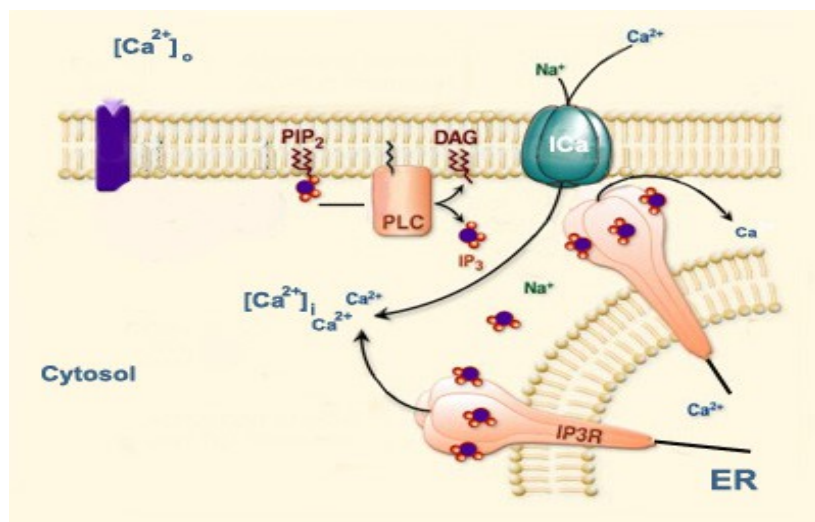
Lo ione Calcio è il catione più abbondante nel corpo umano

La concentrazione intracellulare di Calcio è bassa (100 nM) rispetto a quella extracellulare (2-2.5 mM). Il calcio è conservato in compartimenti specifici (reticolo endoplasmico, sarcoplasmico, apparato di Golgi ecc.). In presenza di stimolazione (segnale elettrico, ligando extracellulare ecc.) gli ioni calcio diffondono dall'interno dei compartimenti nei quali sono conservati nel citoplasma per attivare meccanismi intracellulari.

La concentrazione citosolica di calcio è strettamente controllata da complesse interazioni tra trasportatori, pompe, canali.

Molti studi hanno dimostrato che il calcio è il più comune secondo messaggero delle cellule eucariotiche.

La mobilizzazione del calcio tra i vari compartimenti intracellulari è critica non solo per le risposte fisiologiche ma anche per quelle patologiche.



Per misurare la concentrazione intracellulare di calcio si fa uso di molecole fluorescenti sensibili. La fluorescenza è il risultato di un processo a tre stadi che avviene in alcune molecole (generalmente poli aromatiche eterocicliche) chiamate fluorofori: 1) eccitazione; 2) stato eccitato; 3) emissione di fluorescenza.

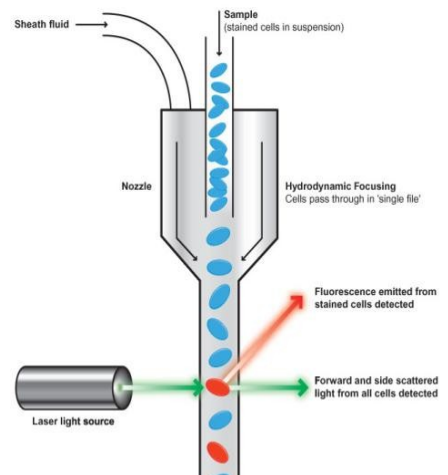
Gli elementi essenziali per una misura di fluorescenza sono: 1) sorgente di eccitazione; 2) fluoroforo; 3) detector; 4) eventualmente software e computer

Strumenti dedicati all'analisi in fluorescenza:

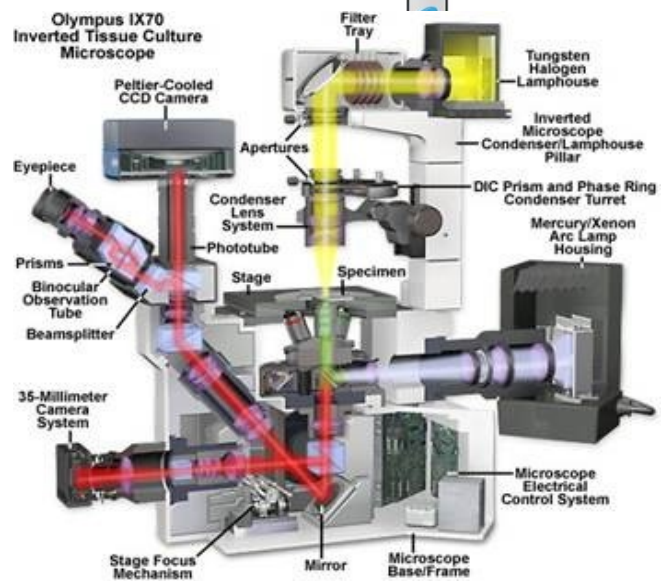
1- spettrofluorimetri che misurano la fluorescenza media in cuvette;



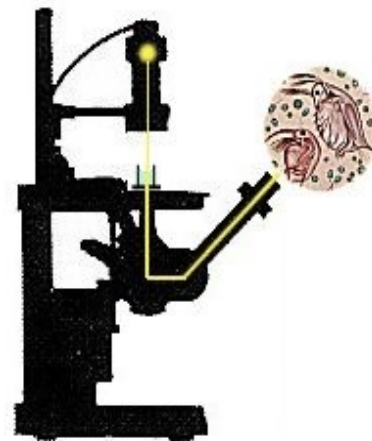
2 – citometri a flusso che misurano la fluorescenza in ogni singola cellula che fluisce all'interno di un capillare di vetro



3 - microscopi a fluorescenza che risolvono la fluorescenza in funzione di coordinate spaziali;



normale

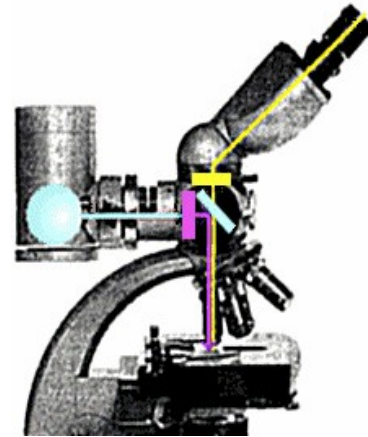


invertito

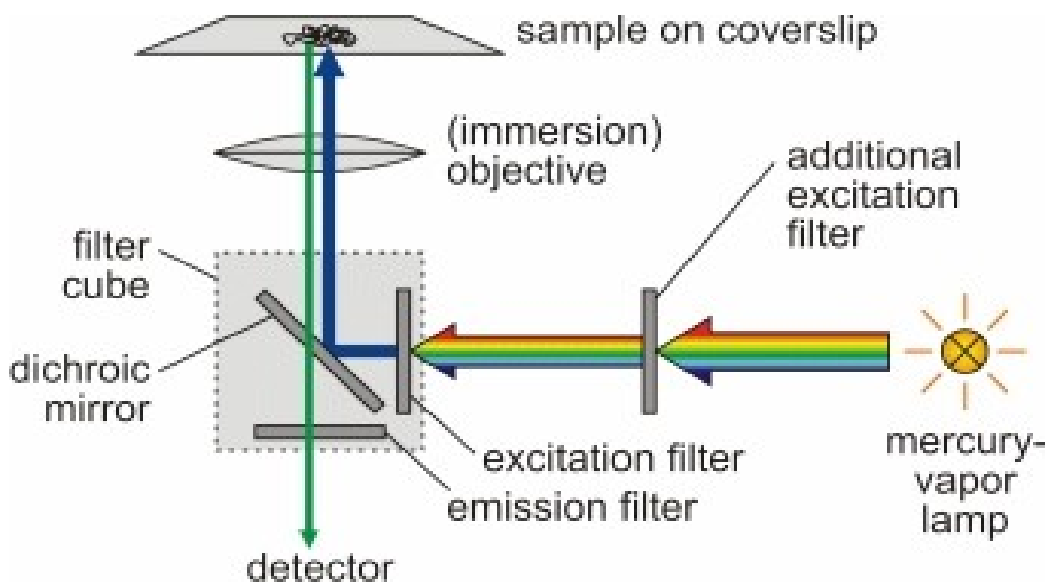
Nel microscopio convenzionale la luce arriva al preparato da sotto, lo

attraversa e, passando attraverso le lenti, genera l'immagine dell'oggetto. Nel microscopio ad epifluorescenza il preparato è illuminato da sopra (o da sotto in un microscopio invertito) da un fascio di luce che, deviato da un apposito specchio dicroico, attraversa l'obiettivo.

Un filtro interposto tra la sorgente di luce ed il sistema ottico provvede a selezionare la lunghezza d'onda opportuna (ultravioletto) per eccitare la fluorescenza del preparato. Questa è di lunghezza d'onda superiore a quella della luce di eccitazione; attraversa lo specchio dicroico senza esserne deviata e può raggiungere l'oculare per generare l'immagine. Un filtro di emissione seleziona solo la lunghezza d'onda desiderata che arriverà al rivelatore (telecamera, macchina fotografica, occhio dell'osservatore).



Il microscopio illustrato nella figura a lato è un microscopio normale, nella misura in laboratorio si farà uso di un microscopio invertito



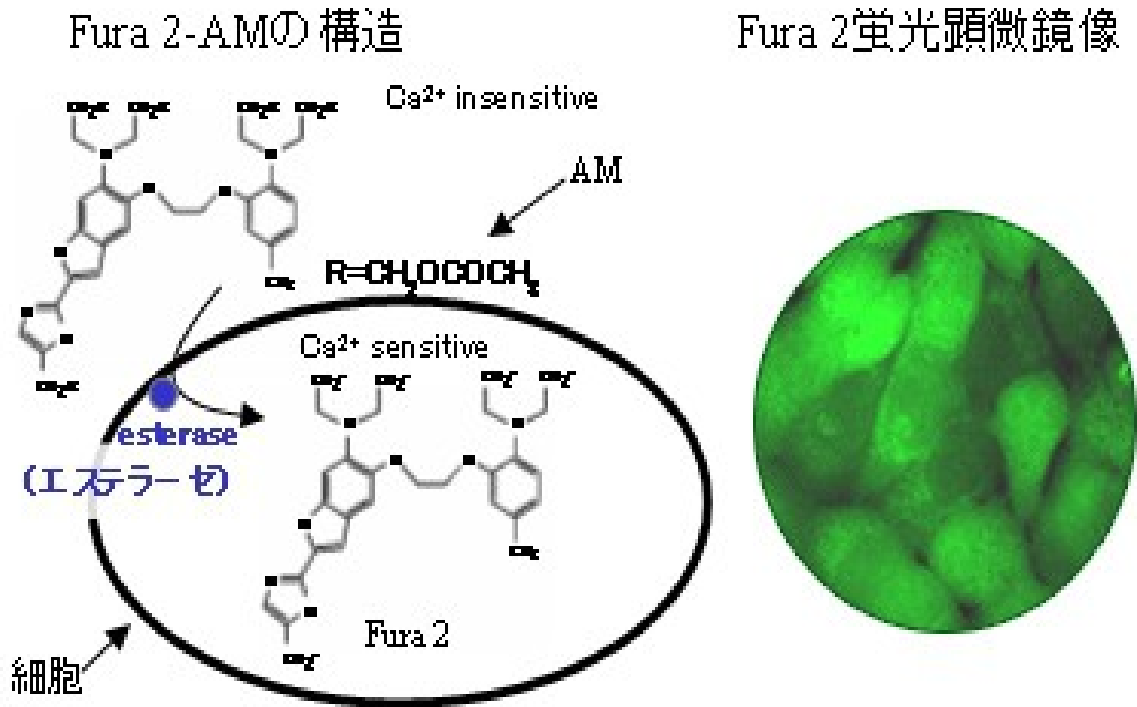
La sostanza fluorescente più usata per le misure di concentrazione di ioni calcio all'interno delle cellule è Fura-2.

Lo spettro di **eccitazione** di Fura-2 è sensibile all'intervallo di concentrazioni di ioni calcio solitamente presenti all'interno delle cellule.

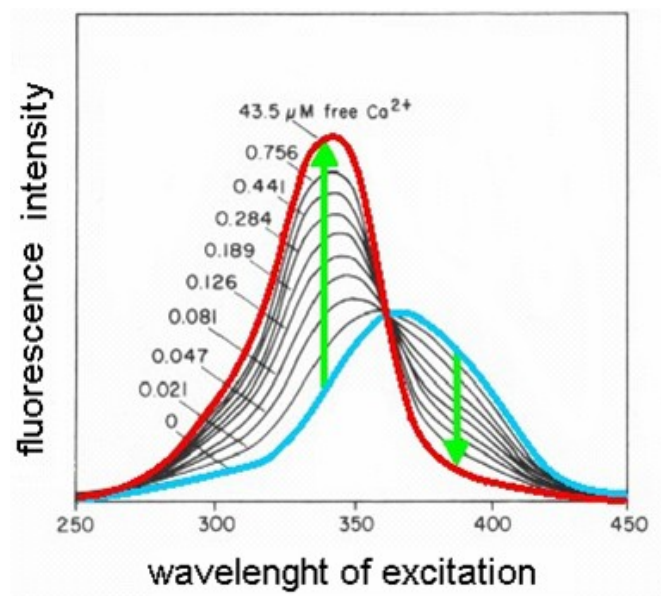
Il primo problema è introdurre Fura-2 all'interno delle cellule. A questo scopo solitamente si aggiunge al mezzo di coltura delle cellule Fura-2

acetossimetilestere (6.7  $\mu\text{M}$ ). Il Fura-2 acetossimetilestere (Fura-2 AM) è permeabile attraverso la membrana plasmatica.

All'interno delle cellule, esterasi intracellulari liberano la specie Fura-2 che è abbastanza impermeabile e rimane intrappolata all'interno della cellula. Dopo 30 minuti di incubazione con Fura-2 AM, all'interno delle cellule è presente una quantità della specie Fura-2 (non AM) la fluorescenza della quale è sensibile alla concentrazione di ioni calcio.



In condizioni di  $[\text{Ca}^{2+}] > 10 \mu\text{M}$ , lo spettro presenta un massimo di eccitazione a 340 nm, invece in assenza di  $\text{Ca}^{2+}$  presenta un massimo di eccitazione a 380 nm. La fluorescenza del Fura-2 avviene a lunghezza d'onda maggiore di 510 nm. Il campione è quindi il fluorocromo viene alternativamente eccitato da luce a 340 e 380 nm. I valori misurati di emissione variano in base alla concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$ , e di conseguenza varia il rapporto (ratio) tra i valori dell'intensità di fluorescenza di emissione a 510 nm registrate dopo eccitazione a 340 e 380 nm.



La concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  si ricava dalla seguente formula:

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = K_d * \beta * [R - R_{\text{min}}] / [R_{\text{max}} - R]$$

ove,  $K_d$  è la costante di dissociazione calcolata a valori noti di  $[\text{Ca}^{2+}]$ ;  $\beta$  è il rapporto tra il valore di fluorescenza in assenza di  $\text{Ca}^{2+}$  e quello in condizione di saturazione registrati dopo emissione a 380 nm;  $R$  è il rapporto tra il valore di emissione di fluorescenza misurato a 510 nm dopo eccitazione a 340 nm e quello dopo eccitazione a 380 nm.;  $R_{\text{min}}$  è il Ratio misurato in assenza di calcio;  $R_{\text{max}}$  è il Ratio misurato in presenza di  $\text{Ca}^{2+}$  [10  $\mu\text{M}$ ].

Solitamente la conversione di valori di fluorescenza (rapporto dei valori di emissione,  $R$ ) a valori di concentrazione non è necessaria, perché scopo della ricerca è l'osservazione della variazione della concentrazione di calcio più che la determinazione dei valori assoluti. Generalmente quindi i grafico riportano valori di  $R$  in funzione del tempo.

### **Protocollo**

Per poter sfruttare il fenomeno della fluorescenza è necessario caricare i vetrini contenenti cellule SK-N-SH con la nostra sonda fluorescente: si aggiunge quindi una soluzione tampone HEPES contenente Fura-2 AM 6.7  $\mu\text{M}$  e si pone nell'incubatore per 30 minuti a 37°C. La soluzione HEPES è costituita da NaCl 120.0 mM, HEPES 25.0 mM, Glucosio 11.0 mM, KCl 5.4 mM,  $\text{MgCl}_2$  1.6 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.8 mM ad un pH 7.4.

Si lava il vetrino in una nuova soluzione HEPES (senza Fura-2 AM).

Successivamente si monta il vetrino nella cameretta per osservarlo al microscopio in una stanza priva di luce.

Per osservare il rilascio di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  si registra l'emissione di fluorescenza a 510 nm con una videocamera digitale opportunamente collegata ad un sistema di visualizzazione e registrazione delle immagini, che poi vengono archiviate ed eventualmente elaborate successivamente.

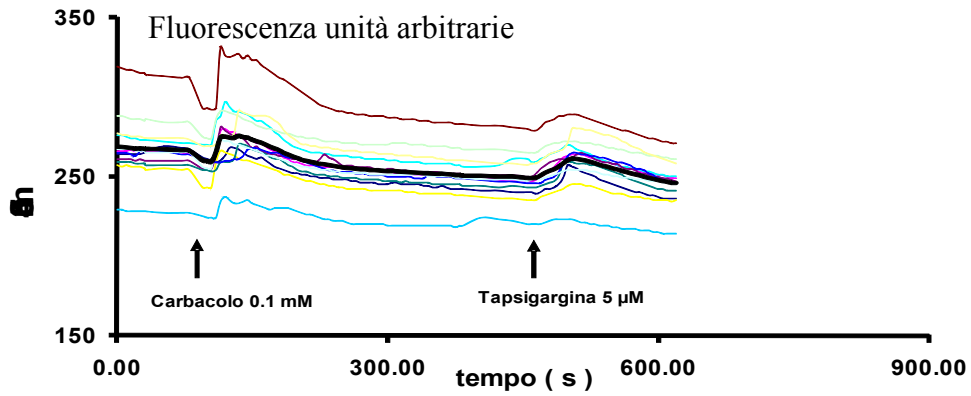
Viene utilizzato un software adeguato (Workbench 2.2 Axon) che ha la capacità di pilotare la sorgente luminosa, la telecamera e quantificare i valori di fluorescenza.

I dati vengono successivamente rielaborati con un foglio elettronico di calcolo.

Nelle figure che seguono, ogni 5 s è stata effettuata una misura di fluorescenza. Ogni linea indica il tracciato registrato in una cellula.

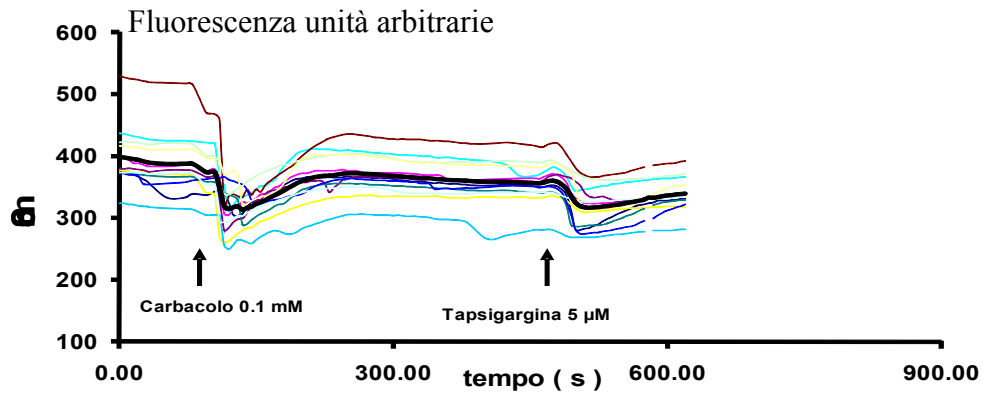
Valori di emissione a 510 nm con eccitazione a 345 nm.

fig.1A 24/03/2011



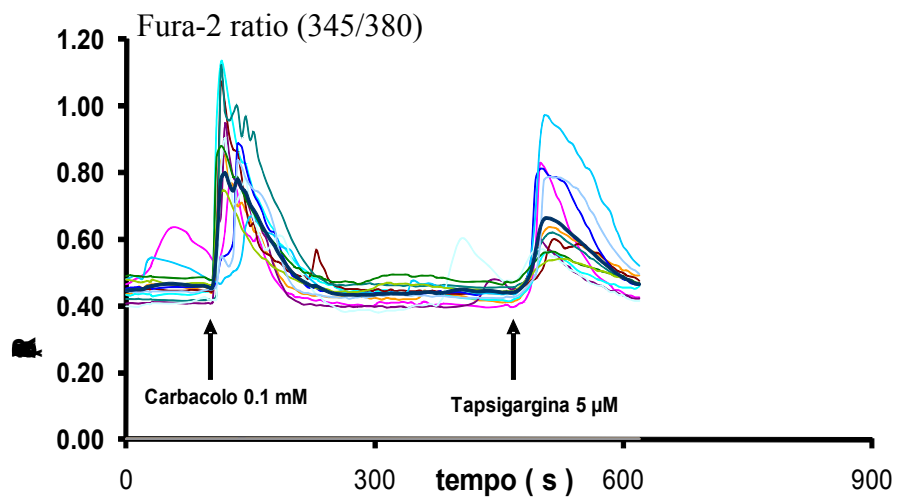
Valori di emissione a 510 nm con eccitazione a 380 nm.

fig.1B 24/03/2011



Rapporto dei punti ottenuti a 345 diviso quelli ottenuti a 380

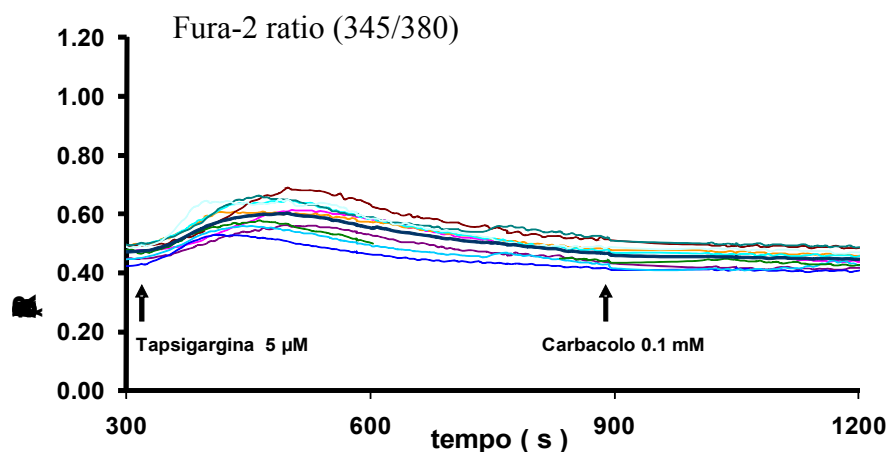
fig. 1C 24/03/2011



Nei grafici precedenti, ottenuti il 24 Marzo 2011, abbiamo osservato che l'aggiunta di carbacolo (agonista di sintesi dei recettori muscarinici) provoca aumento del rapporto di fluorescenza e quindi aumento della concentrazione intracellulare di ioni calcio.

La tapsigargina è un inibitore della  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi. In presenza di inibizione della  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasi, viene visualizzato un incremento della concentrazione intracellulare di calcio per svuotamento del reticolo endoplasmico. La figura 1 dimostra che dopo l'aggiunta di carbacolo, la concentrazione torna valori di base che hanno preceduto la stimolazione con carbacolo. Il carbacolo è sempre presente nel mezzo extracellulare. L'aumento della concentrazione intracellulare di calcio osservato dopo trattamento con tapsigargina mostra che le riserve intracellulari contengono ioni calcio che non vengono mobilizzate dal carbacolo. Evidentemente qualcuna delle tappe tra stimolazione con carbacolo e aumento della concentrazione di calcio viene inibita dalla continua presenza dell'agonista carbacolo (desensitization, desensibilizzazione).

fig. 2 24/03/2011



Nella figura 2, dopo trattamento con tapsigargina, il carbacolo non ha effetto sulla concentrazione intracellulare di ioni calcio. La tapsigargina 5  $\mu\text{M}$  mobilizza ioni calcio dal reticolo endoplasmico e impedisce che il carbacolo faccia aumentare la concentrazione di ioni calcio. La conclusione è che il carbacolo mobilizza ioni calcio dalle riserve site nel reticolo endoplasmico che sono sensibili a tapsigargina.