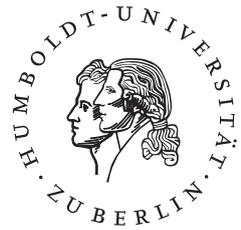


HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



Praktikumsskript Versuch 1

Calcium Imaging mittels Fura-2

von: F. Schneider und J. Vierock

Wintersemester 2022/2023

Dr. Thomas Korte

(AG Zelluläre Biophysik; thomas.korte@rz.hu-berlin.de)

Dr. Peter Müller

(AG Biophysikalische Chemie; peter.mueller.3@rz.hu-berlin.de)

1 Einleitung

Kalzium ist als intrazellulärer Botenstoff an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Dabei spielt es nicht nur eine entscheidende Rolle bei der Kontraktion von Muskelzellen, der Sekretion von Neurotransmittern in Synapsen oder der Regulation der Genexpression sondern begleitet als zentraler Botenstoff den Organismus in seiner gesamten Entwicklung. Während beispielsweise auf der einen Seite Kalziumwellen nach der Befruchtung einer Säugetiereizelle den Abschluss der Meiose der Eizelle und der Fusion des weiblichen und männlichen Zellkerns bewirken, kontrollieren Kalziumsignalwege auf der anderen Seite die Expression von Proteinen die zur Auslösung des gerichteten Zelltodes führen [Berridge, et al., 2000].

Während somit vor allem die Vielseitigkeit dieses Second Messengers bezüglich seiner zellulären Antworten überrascht, verwundert es nicht, dass eine Störung der Kalziumregulation eine Vielzahl pathologischer Konsequenzen hat. Beispielsweise konnte in CMF-7 Brustkrebszellen ein Kalziumeinfluss beobachtet werden, dessen gezielte Inhibierung zur Einstellung der Proliferation der Krebszellen führte. Eine Behandlung mit dem gleichen Inhibitor hemmte ebenfalls das Wachstum von Prostatakrebszellen [Robinson, et al., 2004]. Es ist somit offensichtlich dass eine räumlich und zeitlich hochaufgelöste Untersuchung von intrazellulären Kalziumkonzentrationen nicht nur von wissenschaftlichem sondern auch von medizinischem Interesse ist.

Die Untersuchung von intrazellulären Kalziumkonzentrationen erfordert dabei hochsensitive Messmethoden, da für die Bedeutung von Kalzium als intrazellulärer Botenstoff extrem niedrigen zytoplasmatische Konzentrationen erforderlich werden. Mittels einer Vielzahl von Kalziumpumpen sowie bestimmter Kalziumbindender Proteine wird dabei die Konzentration freien zytoplasmatischen Kalziums im nanomolaren Bereich 10 000 mal niedriger gehalten als die der extrazellulären Flüssigkeit [Thomas, 2008]. Als sehr erfolgreich hat sich die Messung der Kalziumkonzentrationen über kalziumsensitive Fluoreszenzindikatoren erwiesen. Bei diesen handelt es sich um Moleküle, die bei der Bindung von Kalzium ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern, was sich im Fluoreszenzspektrometer oder unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachten lässt.

2 Fluoreszenzspektroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Unter Fluoreszenz versteht man die Emission von Licht beim Übergang aus dem ersten angeregten Singulettzustand in den elektronischen Grundzustand. Das emittierte Licht ist auf Grund von Schwingungsrelaxationen bezüglich des Anregungslichtes energieärmer und entsprechend rotverschoben. Die Vorgänge der Fluoreszenz können innerhalb eines Jablonski-Diagramms schematisiert werden. Die experimentelle Untersuchung

und Charakterisierung fluoreszierender Moleküle erfolgt dabei in erster Linie mit einem Fluoreszenzspektrometer. Dieses erlaubt es die Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge anzuregen und anschließend die Intensität des emittierten Lichtes einer anderen Wellenlänge zu messen. Da die Emission des Fluoreszenzlichtes bei freibeweglichen Fluorophoren in alle Raumrichtungen erfolgt, kann dabei die Fluoreszenzintensität senkrecht zum Anregungsstrahl detektiert werden, was Störeffekte des Anregungslichtes auf den Photomultiplier zur Fluoreszenzmessung minimiert. Die verschiedenen Wellenlängen des Anregungslichtes oder des Fluoreszenzlichtes werden in Monochromatoren eingestellt. In diesen wird Licht durch ein optisches Gitter oder ein Prisma in seine spektralen Bestandteile aufgefächert und über einen Spiegel derart umgelenkt, dass nur ein bestimmter spektraler Bereich einen kleinen Spalt passieren kann, um auf die Probe beziehungsweise den Photomultiplier zu treffen. Generell kann zwischen zwei verschiedenen Messverfahren unterschieden werden. Während bei der Aufnahme von Emissionsspektren die Emissionswellenlänge konstant gehalten und die Wellenlänge des Anregungslichtes variiert.

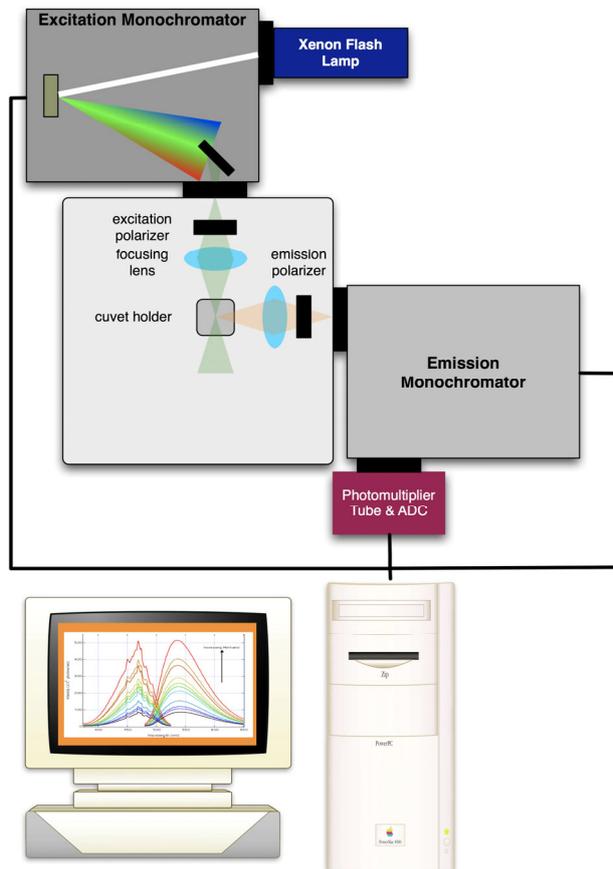


Abbildung 2 Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzspektrometers

Die Probe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Wellenlängen gemessen wird, wird bei der Aufnahme von Exzitationsspektren die Emissionswellenlänge konstant gehalten und die Wellenlänge des Anregungslichtes variiert.

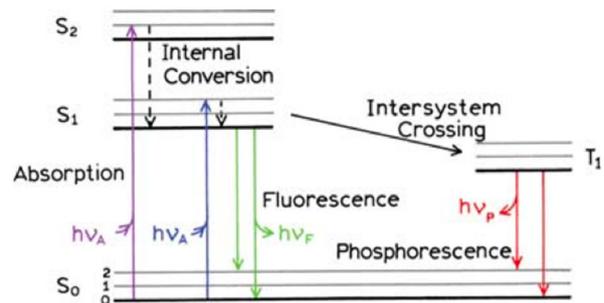


Abbildung 1 Einfache Darstellung eines Jablonski-Diagramms

Generell kann zwischen zwei verschiedenen Messverfahren unterschieden werden. Während bei der Aufnahme von Emissionsspektren die Emissionswellenlänge konstant gehalten und die Wellenlänge des Anregungslichtes variiert.

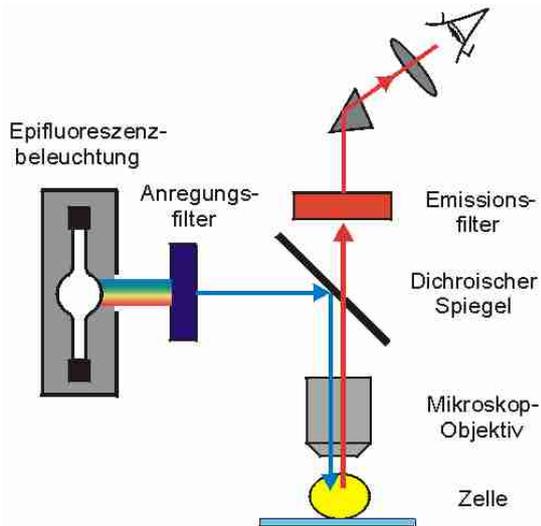


Abbildung 3 Schematische Darstellung eines Fluoreszenzmikroskopes

Oft ist es jedoch von Vorteil sich auch ein genaues Bild von der Verteilung des Fluorophors innerhalb des Präparates zu machen. In diesem Fall stellen Fluoreszenzmikroskope das Messgerät der Wahl dar. Bei diesen handelt es sich in der Regel um erweiterte Transmissionsmikroskope. Das zum Anregen des Fluorophors benötigte Licht wird über einen Anregungsfilter aus einer Polychromatischen Lichtquelle selektiert und über einen dichroischen oder auch dichroitischen Spiegel auf das Präparat reflektiert. Der dichroitische Spiegel stellt dabei das Herzstück des Fluoreszenzmikroskops dar. Er besitzt eine kritische Wellenlänge, sodass Licht mit einer kürzeren Wellenlänge reflektiert und Licht einer längeren Wellenlänge transmittiert wird. Entsprechend lässt der dichroitische Spiegel nur das von der Probe emittierte Licht passieren welches einen weiteren an das Fluorophor anzupassenden Filter passieren muss um schließlich durch das Okular beobachtet werden zu können [Lakowicz, 2006].

3 Fluoreszierende Kalziumindikatoren

Im Allgemeinen lassen sich zwei Klassen von fluoreszierenden Kalziumindikatoren unterscheiden: genetisch kodierbare Kalziumsensoren und chemisch entwickelte Kalziumsensoren. Bei den genetisch kodierbaren Kalziumsensoren handelt es sich beispielsweise um Aequorin aus der Qualle *A.victoria*, ein Protein, das nach dem Binden von Kalzium luminesziert. Während sich genetische Kalziumindikatoren vor allem durch die Möglichkeit auszeichnen bestimmte Kompartimente gezielt zu markieren, ist der Vorteil chemisch entwickelter Fluoreszenzfarbstoff vor allem ihre leichte und schnelle Handhabung bei der Beladung von Zellen sowie die Vielzahl ihrer Varianten.

Unter den chemischen Kalziumindikatoren unterscheidet man weiterhin zwischen Einzelwellenlängenkalziumindikatoren und ratiometrischen Kalziumindikatoren. Im Gegensatz zu Einzelwellenlängenindikatoren kommt es bei ratiometrischen Kalziumindikatoren nach der Bindung von Kalzium nicht nur zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität sondern vor allem zu einer Verschiebung der bevorzugten Anregungs- oder Fluoreszenzwellenlänge [Paredes, et al., 2008]. Einen der ersten und am weitesten Verbreiteten ratiometrischen Kalziumindikatoren stellt Fura-2 dar, welches bereits 1985 von R. Tsien (Nobelpreis für Chemie 2008 für seine Arbeiten am GFP) entwickelt wurde [Grynkiewicz, et al., 1985].

Das vom Kalziumchelator EGTA abgeleitete Fura-2 lässt sich dabei in seiner kalziumgebunden Form bei 340 nm und in seiner kalziumfreien Form bei 380 nm anregen. Aus einem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten nach einer Anregung bei 340 nm und bei 380 nm kann somit unabhängig von der absoluten Fluoreszenzintensität auf die freie Kalziumkonzentration in der Umgebung des Fura-2 geschlussfolgert werden.

Sei hierfür $I_{340,b}$ die Fluoreszenzintensität des kalziumgebundenen Fura-2 bei 340 nm, $I_{380,b}$ des kalziumgebundenen bei 380 nm, $I_{340,f}$ des kalziumfreien bei 340 nm und $I_{380,f}$ des kalziumfreien bei 380 nm. Nun gilt für die Fluoreszenzintensität bei 340 nm (I_{340}) sowie 380 nm (I_{380}) einer gemischten Population von Fura-2 mit der Konzentration des kalziumgebundenen Fura-2 c_b sowie dem freien Fura-2 c_f :

$$I_{340} = I_{340,f} * \frac{c_f}{c_{total}} + I_{340,b} * \frac{c_b}{c_{total}}$$

$$I_{380} = I_{380,f} * \frac{c_f}{c_{total}} + I_{380,b} * \frac{c_b}{c_{total}}$$

Gleichzeitig gilt für die Dissoziationskonstante K_d von Fura-2 und Ca^{2+} mit der freien Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]$:

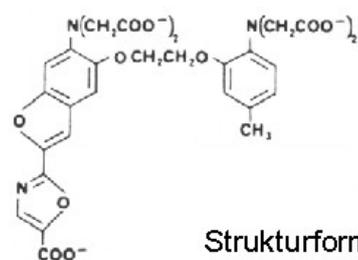
$$K_d = \frac{c_f * [Ca^{2+}]}{c_b} \Leftrightarrow c_b = \frac{c_f * [Ca^{2+}]}{K_d} \quad (1)$$

Für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten nach einer Anregung bei 340 nm und einer Anregung bei 380 nm gilt somit:

$$R = \frac{I_{340}}{I_{380}} = \frac{I_{340,f} * \frac{c_f}{c_{total}} + I_{340,b} * \frac{c_b}{c_{total}}}{I_{380,f} * \frac{c_f}{c_{total}} + I_{380,b} * \frac{c_b}{c_{total}}} = \frac{I_{340,f} + I_{340,b} * \frac{[Ca^{2+}]}{K_d}}{I_{380,f} + I_{380,b} * \frac{[Ca^{2+}]}{K_d}}$$

Umstellen dieser Gleichung nach der freien Kalziumkonzentration ergibt dann:

$$[Ca^{2+}] = K_d * \left(\frac{R - \left(\frac{I_{340,f}}{I_{380,f}} \right)}{\left(\frac{I_{340,b}}{I_{380,b}} \right) - R} \right) \left(\frac{I_{380,f}}{I_{380,b}} \right)$$



Strukturformel von fura-2

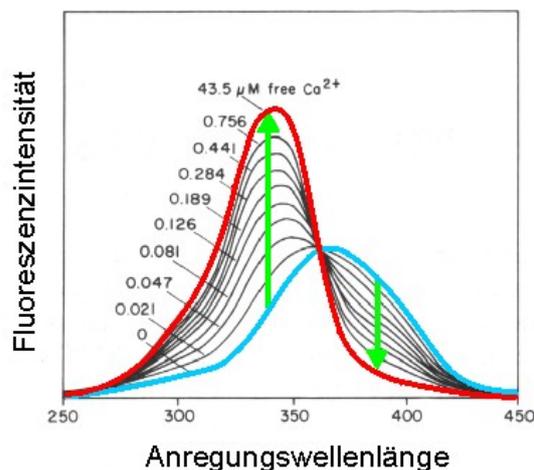


Abbildung 4 Strukturformel von Fura-2 und Exzitationspektren bei verschiedenen freien Kalziumkonzentration zwischen 0 (blau) und 43,5 μM (rot)

Sei nun R_{min} der Fluoreszenzratio bei minimaler Kalziumkonzentration und R_{max} bei maximaler Kalziumkonzentration, so gilt entsprechend:

$$[Ca^{2+}] = K_d * \left(\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \right) \left(\frac{I_{380,f}}{I_{380,b}} \right) \quad (2)$$

Aus Abbildung 4 ist schließlich weiterhin ersichtlich, dass die Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei einer Anregung an dessen isosbestischem Punkt bei ungefähr 360 nm unabhängig von der vorliegenden freien Kalziumkonzentration ist.

4 Beladen von Zellen mit Fura-2

Im vorliegenden Praktikumsversuch soll der intrazelluläre Kalziumgehalt von HEK 293 Krebszellen bestimmt werden. Bei HEK 293 Zellen handelt es sich um eine in den 70iger Jahren aus der Niere eines humanen Fötus gewonnenen Zelllinie, die mit Adenovirus DNA-Fragmenten transfiziert und immortalisiert wurde [Graham, et al., 1977]. HEK-Zellen sind Epithelzellen die adhären an ihren Kultivierungsgefäßen wachsen. Von wissenschaftlicher Bedeutung sind HEK-Zellen vor allem als humanes Expressionssystem zur Untersuchung von verschiedenen Fremdproteinen oder als Wirtssysteme in der Virologie.

Die Fähigkeit von Fura-2 Kalzium zu binden beruht auf den vier negativ geladenen Carboxylgruppen, zwischen denen sich gemäß seiner Größe bevorzugt ein Kalziumion einlagert und damit die spektralen Eigenschaften des Fura-2 beeinflusst. In seiner gelösten Form liegt Fura-2 somit als fünffach geladenes Anion vor, welches trotz seiner ausgedehnten aromatischen Strukturen aufgrund seiner Ladung und Polarität die Membran einer Zelle nicht durchqueren kann. Werden jedoch die Carboxylgruppen mit fünf Acetoxymethylgruppen verestert, so erhält man ein ungeladenes kalziuminsensitives Fura-2-Derivat, das die Zellmembran gut permeieren kann. Innerhalb der Zelle spalten anschließend unspezifische Esterasen die Acetoxymethylgruppen ab und erzeugen damit das kalziumempfindliche Fura-2. Der Abbau des Fura-2-AM innerhalb der Zellen führt schließlich dazu, dass immer mehr Fura-2-AM-Moleküle in die Zelle diffundieren während die Fura-2-Anionen auf Grund ihrer Ladung in der Zellen eingeschlossen bleiben, womit es zu einer Akkumulation von Fura-2 in den Zellen kommt [Invitrogen, 2005].

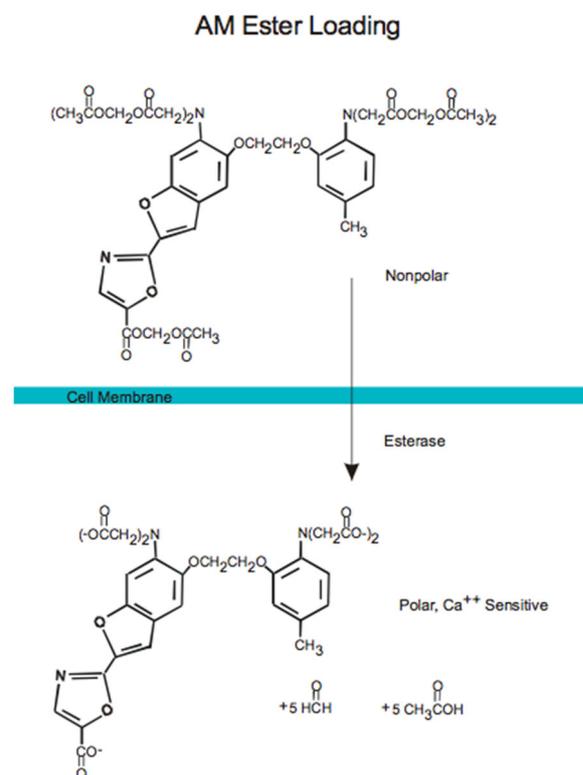


Abbildung 5 Beladung von Zellen mit Fura-2-Acetoxy-methylestern (Fura-2-AM)

5 In vitro Kalibrierung von Fura-2 und Herstellung nanomolarer Kalziumpuffer

Zur Kalibrierung von Fura-2 muss dessen Dissoziationskonstante K_d aus Gleichung (2) in einer den intrazellulären Bedingungen nachempfundenen Umgebung bestimmt werden. Dabei ist besonders auf eine ähnliche Temperatur, Ionenstärke sowie einen vergleichbaren pH-Wert zu achten.

Bei PBS (phosphate buffered saline) handelt es sich um eine phosphatgepufferte Salzlösung, die in ihrer Osmolarität und Ionenstärke mit der menschlicher Zellen übereinstimmt und die im physiologischen Bereich eines pH-Werts von 7,2-7,4 gut gepuffert ist, weshalb sie bei Arbeiten mit Zellkulturen breite Verwendung findet und auch für die Kalibrierung von Fura-2 für Messungen in menschlichen Zellen geeignet ist.

Für die Kalibrierung von Fura-2 müssen nun in PBS dem intrazellulären freien Kalzium nachempfundene Kalziumkonzentrationen von 0 nM – 1000 nM eingestellt werden. Das Einstellen nanomolarer freier Kalziumkonzentrationen erweist sich jedoch als schwierig in Anbetracht dessen, das bereits in laborüblichen Quellen destillierten Wassers noch Kalziumverunreinigungen von 300 nM bis 3 μ M zu finden sind. Zum Erreichen nanomolarer freier Kalziumkonzentrationen werden somit spezielle Kalziumchelatoren als Kalziumpuffer gebraucht. Im Bereich zwischen 10 nM und 1 μ M wird dabei oft EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) verwendet, dessen Kalziumdissoziationskonstante stark pH-abhängig ist (siehe Abbildung 6). Ein genau und exakt eingestellter pH-Wert ist somit entscheidend in Ca^{2+} -EGTA-Puffern. Zur Bestimmung wie viel Kalziumchlorid nun einer EGTA gepufferten Lösung hinzugegeben werden muss, um eine be-

stimmte Konzentration freien Kalziums herzustellen ist eine kleine theoretische Überlegung notwendig.

Allgemein gilt für die Kalziumassoziationskonstante mit $[Ca^{2+}]$ als der Konzentration freien Kalziums:

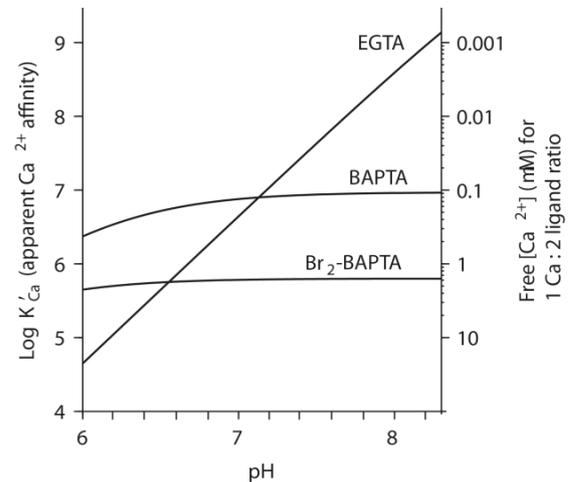
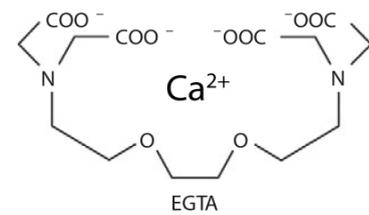


Abbildung 6 Strukturformel von EGTA mit gebundenem Kalziumion und pH-Abhängigkeit der Kalziumassoziationskonstante [Bers et al. verändert]

Tabelle 1 Pufferzusammensetzung PBS

Substanz	Konzentration [mmol/l]	Konzentration [g/l]
NaCl	137	8.00
KCl	2.7	0.20
Na ₂ HPO ₄	10	1.44
KH ₂ PO ₄	1.76	0.24
pH	7.4	(Mit HCl und KOH)

$$K_{Ca} = \frac{[CaEGTA^{2-}]}{[Ca^{2+}] * [EGTA^{4-}]} \quad (3)$$

Da *EGTA* an allen vier Carboxylgruppen protoniert werden kann hängt das Vorkommen deprotonierten *EGTA* stark vom äußeren pH-Wert ab und es gilt für die Menge Kalzium ungebundenen *EGTA*:

$$[EGTA_{total}] - [CaEGTA^{2-}] = [EGTA^{4-}] + [HEGTA^{3-}] + [H_2EGTA^{2-}] + [H_3EGTA^{-}] + [H_4EGTA]$$

Da jedoch nur die Gesamtkonzentration des *EGTA* und nicht die Konzentration des $EGTA^{4-}$ bekannt ist, lohnt es sich für einen bestimmten pH-Wert eine apparente Assoziationskonstante $K_{Ca}^{\#}$ einzuführen. Diese berücksichtigt bei gegebenem pH-Wert den Anteil von $EGTA^{4-}$ am gesamten kalziumgebundenen *EGTA*:

$$\begin{aligned} K_{Ca}^{\#} &= K_{Ca} * \frac{[EGTA^{4-}]}{[EGTA^{4-}] + [HEGTA^{3-}] + [H_2EGTA^{2-}] + [H_3EGTA^{-}] + [H_4EGTA]} \\ &= \frac{[CaEGTA^{2-}]}{[Ca^{2+}] * [EGTA^{4-}]} * \frac{[EGTA^{4-}]}{[EGTA_{total}] - [CaEGTA^{2-}]} \end{aligned}$$

Dies lässt sich zum Scatchard-Plot linearisieren:

$$\frac{[CaEGTA^{2-}]}{[Ca^{2+}]} = K_{Ca}^{\#} [EGTA_{total}] - K_{Ca}^{\#} [CaEGTA^{2-}] \quad (4)$$

Für die Menge an gebundenen Ca^{2+} gilt zusätzlich:

$$[CaEGTA^{2-}] = [Ca^{2+}_{total}] - [Ca^{2+}]$$

Einsetzen in (4) liefert:

$$\frac{[Ca^{2+}_{total}] - [Ca^{2+}]}{[Ca^{2+}]} = K_{Ca}^{\#} [EGTA_{total}] - K_{Ca}^{\#} ([Ca^{2+}_{total}] - [Ca^{2+}])$$

Umstellen liefert schließlich die dem Medium zuzufügende Konzentration an Ca^{2+}_{total} um bei einer vorher eingewogenen *EGTA*-Konzentration eine bestimmte Konzentration freien Kalziums zu erhalten:

$$[Ca^{2+}_{total}] = \frac{[Ca^{2+}] * [EGTA_{total}] + [Ca^{2+}]^2}{[Ca^{2+}] + \frac{1}{K_{Ca}^{\#}}}$$

Oder mit der apparenten Dissoziationskonstante $K_d^{\#}$:

$$[Ca^{2+}_{total}] = \frac{[Ca^{2+}] * [EGTA_{total}] + [Ca^{2+}]^2}{[Ca^{2+}] + K_d^{\#}} \quad (5)$$

Bei einer Temperatur von 23°C, einer Ionenstärke des Puffers von 0,15 M sowie einem pH-Wert von 7,2 ist dabei in der Literatur eine apparente Dissoziationskonstante von 0,1572 μ M gegeben [Bers, et al., 1994]. Diese müsste für genaue Messungen gemäß den während des Experiments vorliegenden Bedingungen korrigiert werden (Bei Interesse siehe Bers *et al.*).

6 Versuchsziel

Ziel des Praktikumsversuches ist es, den kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 in vitro zu kalibrieren. Die dafür notwendigen Kalziumpuffer sollen selbstständig hergestellt werden. Des Weiteren sollen HEK293-Zellen mit Fura-2 beladen werden sowie die Beladungseffizienz über Aufnahmen der Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop abgeschätzt werden. Abschließend soll die zytosolische Konzentration freien Kalziums in HEK-Zellen mit dem Fluoreszenzspektrometer bestimmt werden.

7 Versuchsanleitung

7.1 Herstellen von nanomolaren Kalziumpuffern

Zur Herstellung der Kalziumpuffer stellen wir Ihnen einfach konzentriertes PBS mit 5 mM gelöstem EGTA (pH 7,2) und 100 mM CaCl₂-Lösung zur Verfügung.

- Stellen Sie durch Zugabe des entsprechenden Volumens der CaCl₂-Lösung folgende Konzentrationen freien Kalziums in 50 ml (PBS + 5mM EGTA) in sechs verschiedenen Falcontubes her. Berechnen Sie hierzu die Werte in der Tabelle mit Hilfe von Gleichung (5). **Im Interesse eines zügigen Praktikumsfortschritts empfehlen wir Ihnen, die Werte bereits vorher zu berechnen.**

Zielkonzentration freien Ca ²⁺ [nM]	Notwendige Konzentration [Ca ²⁺ _{total}] [mM]	Menge an CaCl ₂ für 50ml [mmol]	Volumen von 100 mM CaCl ₂ -Lösung [ml]
0			
40			
100			
300			
500			
1000			

- Messen Sie erneut den pH-Wert der verschiedenen PBS-EGTA-CaCl₂-Puffer und **notieren Sie sich die pH-Wert Änderungen.**
- Stellen Sie nun erneut den pH-Wert der jeweiligen Lösungen genau auf 7,20 ein.

Hinweis: Probieren Sie während des Arbeitens mit EGTA-Kalziumpuffern das Verwenden von Glasgefäßen zu vermeiden.

7.2 In vitro Kalibrieren von Fura-2

Für die in vitro Kalibrierung von Fura-2 muss die Kalziumdissoziationskonstante des Fura-2 bestimmt werden, um anschließend mittels Gleichung (2) die innere Kalziumkonzentration der HEK293-Zellen bestimmen zu können. Zur Vermeidung von Photobleaching des Fura-2 müsste eigentlich im Halbdunklen bei Rotlicht gearbeitet werden, was im Praktikumsraum nicht zu realisieren ist. Probieren Sie jedoch die Fura-2 enthaltenden Proben möglichst kaum intensiverem Licht aussetzen.

- Hüllen Sie sieben Fluoreszenzküvetten zur Abdunkelung in Aluminiumfolie ein und füllen Sie in jedes 1,5 ml der unter 7.1 angesetzten Kalziumpuffer.
- Stellen Sie in jeder Küvette eine 1 μ M Fura-2 Konzentration ein durch Zugabe der entsprechenden Menge einer 0,1 mM Fura-2-Kaliumsalzlösung. Stellen Sie auch eine Referenzprobe ohne Fura-2 her.
- Messen Sie für jede der angesetzten Fura2-Kalzium-PBS-Lösungen am Fluoreszenzspektrometer ein **Exzitationspektrum** zwischen 250 nm und 500 nm bei einer **Emissionswellenlänge von 510 nm** und speichern Sie diese unter Ihnen einprägsamen Namen. Als weitere Parameter wählen Sie als Aufnahmegeschwindigkeit medium, für den Emissionsspalt 5 nm und für den Exzitationsspalt 1,5 nm.
- Nehmen Sie für die Lösung mit **minimaler sowie mit maximaler Kalziumkonzentration ebenfalls ein Emissionsspektrum auf**, um die Kalziumabhängigkeit der Lage des Emissionsspektrums abschätzen zu können. Überlegen Sie sich die jeweils geeigneten Anregungswellenlängen. Welche Parameter sollten noch verändert werden?
- Exportieren Sie ihre gespeicherten Messdaten als ASCII-Datei und speichern Sie diese auf einem USB-Stick.

7.3 Beladen der HEK 293 Zellen mit Fura-2-AM

Allgemeine Hinweise: *Da mit Krebszellen (S1) gearbeitet wird, sollten während des gesamten Versuchs Handschuhe getragen werden. Sämtliche Lösungen und Behälter, die mit den Zellen in Kontakt gekommen sind, werden separat gesammelt.*

Jede Gruppe erhält drei Petrischalen, in der adhären (am Untergrund haftend) Fibroblasten wachsen. Eine der drei Petrischalen hat ein Deckgläschen als Boden für die Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop. Alle Petrischalen mit Zellen sind bei 37°C im Tischinkubator aufzubewahren. Alle Lösungen, die auf die Zellen gegeben werden, sollten auf 37°C vorgewärmt werden.

- Zunächst wird das Wachstumsmedium mit einer Pipette vorsichtig (!) abgenommen. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass möglichst keine Zellen abgelöst werden.
- In eine Petrischale sowie die Petrischale mit dem Glasboden werden 2 ml vorgewärmtes Medium, welche jeweils 4 μ l 1 mM Fura-AM enthalten, pipettiert. Die erste Schale dient der späteren fluoreszenzspektroskopischen Messung, und die zweite der

fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung. In die dritte Petrischale werden nur 2 ml vorgewärmtes Medium gegeben. Diese Zellen dienen als Kontrolle bzw. Hintergrund für die spektroskopischen Messungen. Deshalb werde diese, bis auf die Zugabe von Fura-2, genauso behandelt wie die beladenen Zellen.

- Die Zellen werden im Tischinkubator für 30 min bei 37°C inkubiert.
- Das Medium aus der Petrischale mit dem Glasboden wird vorsichtig entnommen, und es werden 1,5 ml PBS zugegeben. Anschließend wird die Schale bis zur mikroskopischen Untersuchung in den Inkubator gestellt.
- Die Zellen in den anderen Petrischalen werden durch Auf- und Ab-Pipettieren vom Untergrund gelöst und in ein Falconröhrchen überführt.
- Die Zellen werden bei 500 g für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.
- Zum Waschen der Zellen wird das Zellpellet in 5ml PBS resuspendiert und erneut für 3 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet in 1,5 ml PBS aufgenommen und in Fluoreszenzküvetten überführt.

7.4 Fluoreszenzmessungen an den Fura-2 beladenen HEK-Zellen

- Zur Bestimmung des zytosolischen Kalziumgehalts wird je ein Exzitationsspektrum für die mit Fura-2 beladenen Zellen und ein Spektrum als Hintergrund für die unbeladenen Zellen bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm aufgenommen. Vor der Messung werden die Zellen noch einmal mit einer Pipette gemischt um deren Sedimentation zu verhindern.
- Zur Abschätzung der Beladungseffizienz wird das Petrischale mit dem Glasboden in eine Messkammer gegeben und die Fluoreszenz am Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Zur Ermittlung der Hintergrundfluoreszenz wird eine Probe ohne Vorinkubation mit Fura-AM unter gleichen Beleuchtungsbedingungen genutzt. Die Beladungseffizienz wird über die Anzahl beladener Zellen pro Gesamtzellzahl abgeschätzt.
- Die Messdaten werden wiederum auf einem USB Stick gespeichert.

8 Hinweise zur Auswertung und zum Protokoll

- Protokollieren Sie tabellarisch die Zusammensetzung der zur Kalibrierung des Fura-2 verwendeten Kalziumpuffers. Gehen Sie in ihrer Diskussion auf potentielle Fehlerquellen ein. (0.5 P)
- Tragen Sie graphisch die nach der Kalziumzugabe beobachteten pH-Wertänderungen gegen die molare Menge zugegebenen Kalziums auf und versuchen sie qualitativ die zu beobachtenden pH-Wertänderungen zu erklären. (0.5 P)
- Berechnen Sie aus den Exzitationsspektren der Kalziumpuffer die Fluoreszenzratios R und tragen sie mit diesen den Term $\left(\frac{R-R_{min}}{R_{max}-R}\right)\left(\frac{I_{380,f}}{I_{380,b}}\right)$ aus Gleichung (2) gegen die freie Kalziumkonzentration der angesetzten Puffer auf. Bestimmen Sie durch Einfügen einer Regressionsgeraden die Kalziumdissoziationskonstante des Fura-2. Gehen Sie davon aus, dass Fura-2 mit 2 μM Kalzium bereits gesättigt ist. Begründen Sie in Ihrer Diskussion, ob die ermittelte Dissoziationskonstante der für einen fluoreszenten Kalziumfarbstoff zur Bestimmung intrazellulärer Kalziumkonzentrationen erforderlichen Größenordnung entspricht. (1,5 P)
- Korrigieren Sie das Exzitationsspektren der mit Fura-2 beladenen HEK293-Zellen durch Subtraktion des Exzitationsspektrums der unbeladenen Zellen und bestimmen Sie mit Gleichung (2) sowie der ermittelten Kalziumdissoziationskonstante die intrazelluläre Kalziumkonzentration der HEK293 Zellen. Warum ist der Wert unabhängig von der Menge an Zellen? (1 P)
- Schätzen Sie anhand des Fotos aus dem Fluoreszenzmikroskop die Beladungseffizienz der HEK-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff ab. Zur Abschätzung der Hintergrundfluoreszenz wird Ihnen eine weitere Petrischale mit unmarkierten Zellen zur Verfügung gestellt. Wie ist es möglich, dass die intrazelluläre Fura-2-Konzentration höher ist, als die extrazelluläre Konzentration des Fura-Esters? (0.5P)
- Bemühen Sie sich um ein übersichtliches und gut strukturiertes Protokoll! Im Abschnitt „Durchführung und Methoden“ kann auf das Praktikumsskript verwiesen werden. (1 P)

Bei Fragen zur Anfertigung sowie zur Bewertung des Protokolls stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Wir wünschen Ihnen viel Erfolg beim Praktikumsversuch und viele leuchtende Zellen!

Literatur

- Berridge, M. J.; Lipp, P. und Bootman, M. D. (2000): The versatility and universality of calcium signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 1), Nr. 1, Seite 11-21.
- Bers, D. M.; Patton, C. W. und Nuccitelli, R. (1994): A practical guide to the preparation of Ca²⁺ buffers, *Methods Cell Biol* (Band 40), Seite 3-29.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C. und Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol* (Band 36), Nr. 1, Seite 59-74.
- Grynkiewicz, G.; Poenie, M. und Tsien, R. Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J Biol Chem* (Band 260), Nr. 6, Seite 3440-50.
- Invitrogen, *Molecular Probes* (2005): Manual Fura and Indo Ratiometric Calcium Indicatoren.
- Lakowicz, Joseph R. (2006): Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd. Auflage, Springer, New York, ISBN: 9780387312781.
- Paredes, R. M.; Etzler, J. C.; Watts, L. T.; Zheng, W. und Lechleiter, J. D. (2008): Chemical calcium indicators, *Methods* (Band 46), Nr. 3, Seite 143-51.
- Robinson, J. A.; Jenkins, N. S.; Holman, N. A.; Roberts-Thomson, S. J. und Monteith, G. R. (2004): Ratiometric and nonratiometric Ca²⁺ indicators for the assessment of intracellular free Ca²⁺ in a breast cancer cell line using a fluorescence microplate reader, *J Biochem Biophys Methods* (Band 58), Nr. 3, Seite 227-37.
- Thomas, A. P. (2008): Optical methods in calcium signaling, *Methods* (Band 46), Nr. 3, Seite 141-2.