

Navorsings- en oorsigartikels

Lokalisering van intrasellulêre kalsium in die neutrofiel deur selektiewe presipitering met die antimonaat

A.M. Koorts*, A.N. Hall en M. Viljoen

Departement Fisiologie, Fakulteit Geneeskunde, Laboratorium vir Mikroskopie en Mikro-analise, Universiteit van Pretoria, Posbus 2034, Pretoria, 0001

E-pos: akoorts@medic.up.ac.za

Ontvang 28 Augustus 2000; aanvaar 13 Oktober 2000

UITTREKSEL

Die antimonaat is vir die eerste keer in 1962 deur Komnick gebruik om intrasellulêre natrium te presipiteer, maar sedertdien is daar aangetoon dat die antimonaat ook vir die presipitering van ander katione gebruik kan word. Tans word die antimonaat merendeels gebruik vir die presipitering van intrasellulêre kalsium in kalsiumlokaliseringsstudies. Die grootste probleem wat egter ondervind word met die gebruik van die antimonaat in kalsiumlokaliseringsstudies, is die selektiwiteit van die antimonaat vir kalsium in die teenwoordigheid van die ander intrasellulêre katione. Met verskeie x-straalanalises en keleringsstudies is daar aangetoon dat die antimonaat-presipiteringsreaksie onder bepaalde reaksiekondisies, tog spesifiek kan wees vir kalsium. 'n Transmissie-elektronmikroskopie-metode vir die selektiewe lokalisering van intrasellulêre kalsium in die neutrofiel deur die antimonaat word bespreek. Daar word aangetoon dat kalsium wel selektief gepresipiteer kan word deur die antimonaat onder bepaalde eksperimentele toestande.

ABSTRACT

Localisation of intracellular calcium in the neutrophil through the selective precipitation with the antimonate ion

The antimonate ion was used for the first time in 1962 by Komnick for the precipitation of intracellular sodium ions. The antimonate ion can, however, also precipitate other cations and can be employed in subcellular calcium localisation studies. The greatest difficulty encountered with such subcellular calcium localisation studies is the selectivity of the antimonate ion for calcium in the presence of the other intracellular cations. Various x-ray analyses and chelation studies have shown that the antimonate precipitation reaction can be specific for calcium under appropriate conditions. A transmission electron microscopy method for the selective localisation of intracellular calcium in the neutrophil with the antimonate ion is discussed. It is indicated that the antimonate ion can specifically precipitate calcium in the presence of the other intracellular cations.

INLEIDING

Die bepaling van die verspreiding van kalsium tussen die verskillende intrasellulêre kompartemente word oor die algemeen as problematies beskou. Dit is bekend dat die antimonaat verskeie intrasellulêre katione kan presipiteer. Die ioon is vir die eerste keer in 1962 deur Komnick¹ gebruik as presipiteringsagent vir natriumione. In die sewentigerjare is die antimonaat egter ook begin gebruik vir die lokalisering van intrasellulêre kalsium. Weens die onsekerheid oor die geldigheid van hierdie metode vir kalsiumlokaliserings, is daar egter nog teenstand teen die gebruik daarvan. Die grootste probleem wat ervaar word met die gebruik van die antimonaat in intrasellulêrekalsium-lokaliseringsstudies, is die selektiwiteit van antimonaat vir kalsium in die teenwoordigheid van al die ander katione in die sel. Met die toepassing van x-straalanalises en keleerderbehandelings is aangetoon dat die antimonaat-presipiteringsreaksie onder gespesifiseerde toestande tog spesifiek vir kalsiumione in die teenwoordigheid van ander katione kan wees.^{2,3}

Die selektiwiteit vir kalsiumione in die teenwoordigheid van ander katione word grootliks bepaal deur die tipe buffers, die pH van die buffers, die antimonaatkonsentrasies, die tipe fikseermiddels en die weefselvoorbereiding, wat almal die retensie en presipitering van die fisiologiese katione relatief tot mekaar bepaal.^{2,4} Die metode vir die lokalisering van intrasellulêre kalsium berus op a) die stabilisering en/of die binding van kalsium deur óf fosfaat óf oksalaatanione gedurende primêre fiksering met glutaaraldehyd (fosfaat en oksalaat kan teoreties kalsium in verskillende kalsiumkompartemente bind), b) die daaropvolgende uitwas van alle niegebinde katione en c) die vorming van 'n elektrondigte en nie-oplosbare kalsiumantimonaatsout van die gekomplekseerde of gebonde kalsium gedurende postfiksering.^{2,5} Om die subcellulêre verspreiding van kalsium in die neutrofiel te kan ondersoek, moet daar eerstens geskikte transmissie-elektronmikroskopiepreparate voorberei word. Tweedens moet die reaksietoestande tydens hierdie neutrofielvoorbereiding vir transmissie-elektronmikroskopie optimaal wees vir die selektiewe presipitering van kalsiumione in die teenwoordigheid van die ander fisiologiese katione. Die doel van hierdie werk was om 'n metode te ontwikkel vir die antimonaatpresipitering van intrasellulêre kalsium in neutrofiel

* Outeur aan wie korrespondensie gerig kan word

en om vas te stel of die presipiteringsreaksie spesifiek is vir kalsium.

MATERIALE EN METODEDES

Vir die subsellulêre lokalisering van intrasellulêre kalsium in die neutrofiel moet die ultrastruktuur van die neutrofiel behoue bly. Isolering van neutrofiel uit volbloed en die daaropvolgende pakking en fiksering van die neutrofiel moet dus so min moontlik verstourings van die neutrofielultrastruktuur veroorsaak. Die volgende metode is geskik gevind.

Isolering van neutrofiel

Polimorfonukleêre leukosiete is soos volg vanuit 7 ml volbloed met "suur-sitraat-dekstrose" (ACD) (Becton Dickenson Vacutainer sisteme) as antikoagulant geïsoleer.

6 ml ACD-volbloed is bo-op 'n volume van 3 ml ficoll-hypaque (Histopaque - 1077 Sigma Kat. No. 1077 -1) in 'n koniese buis (15 ml) gepipetteer en daarna by 360 g by 12 °C vir 25 minute gesentrifugeer. Die polimorfonukleêre leukosiete (PMNL's) vorm 'n wit laag bo-op die massa rooibloedselle in die onderpunt van die buis. Die supernatant is verwyder en die rooibloedselle met 'n ammoniumchloried-oplossing geliseer (155 mM NH₄Cl, 12 mM NaHCO₃, 0.25 mM EDTA). Die PMNL's is hierna een maal met 4 ml Hepes-gebufferde Hanks-oplossing gewas (Highveld Biological EDMS. BPK. Kat. No. CN 2027-3, KCl, KH₂PO₄, Glukose, MgSO₄·7H₂O, Hepes, NaHCO₃, CaCl₂, pH 7.4 by 25°C) en finaal in 2 ml van die buffer gesuspendeer. Die metode berus op 'n aanpassing van die metode van Böyum.⁶

Vorming van 'n neutrofiel sediment geskik vir transmissie-elektronmikroskopie (TEM)-voorbereiding

'n Volume van 1 ml van die neutrofiel suspensie is in 'n Eppendorffbuis gepipetteer. Aanvanklik is die neutrofiel suspensie by verskillende sentrifugering-snelhede en -tye gesentrifugeer om voldoende kompaktering van die neutrofiel te verkry. Sentrifugering by 440 g by kamertemperatuur vir 5 minute het gesorg vir voldoende kompaktering van die neutrofiel vir verdere transmissie-elektronmikroskopie voorbereiding sonder om penetrasie van die verskeie reagense te bemoeilik.

TEM-voorbereiding vir die lokalisering van intrasellulêre kalsium

Ses toetsprotokolle is saamgestel vir intrasellulêre kalsiumlokalisering in die neutrofiel met behulp van die antimonaatioon. Die ses protokolle word in figuur 1 skematies weergegee. Die metode is soos volg: 1 ml van die primêre fikseermiddel (2.5%-glutaaraldehyd - Premier Technologies Kat. No. 16400) wat onderskeidelik óf fosfaat (1a, 1b, 2a, 2b)- óf oksalaat (3a, 3b)-anione bevat is in die Eppendorffbuis wat die neutrofiel bevat, gepipetteer. Omdat neutrofielisolering in die teenwoordigheid van EDTA uitgevoer is, is die invloed van EDTA tydens neutrofielisolering op intrasellulêre kalsium ondersoek. Neutrofielisolering is onderskeidelik óf in die teenwoordigheid óf in die afwesigheid van EDTA uitgevoer. Met EDTA - 1a, 2a, 3a en sonder EDTA - 1b, 2b, 3b. Primêre fiksering is vir 1 uur lank by kamertemperatuur uitgevoer. Die supernatant is hierna verwyder en die neutrofiel is drie

maal gewas met die toepaslike buffer soos aangedui in figuur 1. Die supernatant is verwyder en 1 ml van die postfikseermiddel wat die antimonaatioon bevat (1% osmium tetraoksied in 2% K₂Sb(OH)₆, OsO₄ Sigma Kat. No. 247286 en K₂Sb(OH)₆ Wirsam Scientific Kat. No. R1015) is in die Eppendorffbuis gepipetteer. Postfiksering is vir 1 uur lank by kamertemperatuur uitgevoer. Die supernatant is verwyder en die neutrofiel is drie maal met die toepaslike buffer gewas soos aangedui in figuur 1. Die supernatant is verwyder en die neutrofiel is met 'n reeks van stygende konsentrasie etanoloplossings, 50%, 70%, 95%, 100%, gedehidreer. Vir elk van die etanolkonsentrasies is 0.5 ml van die etanoloplossing bygevoeg en dehidreer vir 10 minute by kamertemperatuur uitgevoer, die neutrofiel is by 440 g, by kamertemperatuur vir 10 minute afgeswaai en die supernatant verwyder. Na die laaste dehidreer by 100%-etanol is die supernatant verwyder en vars 100%-etanol bygevoeg. Die neutrofiel is in 'n Quetol-epoksiedhars (Quetol, MNA, DDSA, RD2, S1)⁷ ingebed. 'n Gelykstaande volume Quetol-epoksiedhars is bygevoeg, dus 'n volume van 0.5 ml van die hars is by die neutrofiel in die 100%-etanol gevoeg. Die neutrofiel is

<p>Kalsiumlokalisering Adaptasie 1a</p> <p>Neutrofielisolering + EDTA</p> <p>Fikseer 2.5% GA in 0.1 M NaPBS 1 uur (kt) Was 3x 0.1 M NaPBS Postfikseer 1% OsO₄, 2% K₂Sb(OH)₆ 1 uur (kt) Was 3x 0.1 M NaPBS</p> <p>Dehidreer 10 min/konsentrasie 1ste alkohol=50% etanol 2de alkohol=70% etanol 3de alkohol=95% etanol 4de alkohol=100% etanol 5de alkohol=100% etanol</p> <p>Impregneer met Quetol Sny</p>	<p>Kalsiumlokalisering Adaptasie 1b</p> <p>Neutrofielisolering - EDTA</p> <p>Fikseer 2.5% GA in 0.1 M NaPBS 1 uur (kt) Was 3x 0.1 M NaPBS Postfikseer 1% OsO₄, 2% K₂Sb(OH)₆ 1 uur (kt) Was 3x 0.1 M NaPBS</p> <p>Dehidreer 10 min/konsentrasie 1ste alkohol=50% etanol 2de alkohol=70% etanol 3de alkohol=95% etanol 4de alkohol=100% etanol 5de alkohol=100% etanol</p> <p>Impregneer met Quetol Sny</p>
<p>Kalsiumlokalisering Adaptasie 2a</p> <p>Neutrofielisolering + EDTA</p> <p>Fikseer 2.5% GA in 0.1 M KPBS 1 uur (kt) Was 3x 0.1 M KPBS Postfikseer 1% OsO₄, 2% K₂Sb(OH)₆ 1 uur (kt) Was 3x 0.1 M KPBS</p> <p>Dehidreer 10 min/konsentrasie 1ste alkohol=50% etanol 2de alkohol=70% etanol 3de alkohol=95% etanol 4de alkohol=100% etanol 5de alkohol=100% etanol</p> <p>Impregneer met Quetol Sny</p>	<p>Kalsiumlokalisering Adaptasie 2b</p> <p>Neutrofielisolering - EDTA</p> <p>Fikseer 2.5% GA in 0.1 M KPBS 1 uur (kt) Was 3x 0.1 M KPBS Postfikseer 1% OsO₄, 2% K₂Sb(OH)₆ 1 uur (kt) Was 3x 0.1 M KPBS</p> <p>Dehidreer 10 min/konsentrasie 1ste alkohol=50% etanol 2de alkohol=70% etanol 3de alkohol=95% etanol 4de alkohol=100% etanol 5de alkohol=100% etanol</p> <p>Impregneer met Quetol Sny</p>
<p>Kalsiumlokalisering Adaptasie 3a</p> <p>Neutrofielisolering + EDTA</p> <p>Fikseer 2.5% GA in 90 mM C₂K₂O₄ 1 uur (kt) Was 3x 90 mM C₂K₂O₄, 7.5% sukrose Postfikseer 1% OsO₄, 2% K₂Sb(OH)₆ 1 uur (kt) Was 3x gealkaliniseerde H₂O pH 10</p> <p>Dehidreer 10 min/konsentrasie 1ste alkohol=50% etanol 2de alkohol=70% etanol 3de alkohol=95% etanol 4de alkohol=100% etanol 5de alkohol=100% etanol</p> <p>Impregneer met Quetol Sny</p>	<p>Kalsiumlokalisering Adaptasie 3b</p> <p>Neutrofielisolering - EDTA</p> <p>Fikseer 2.5% GA in 90 mM C₂K₂O₄ 1 uur (kt) Was 3x 90 mM C₂K₂O₄, 7.5% sukrose Postfikseer 1% OsO₄, 2% K₂Sb(OH)₆ 1 uur (kt) Was 3x gealkaliniseerde H₂O pH 10</p> <p>Dehidreer 10 min/konsentrasie 1ste alkohol=50% etanol 2de alkohol=70% etanol 3de alkohol=95% etanol 4de alkohol=100% etanol 5de alkohol=100% etanol</p> <p>Impregneer met Quetol Sny</p>

Figuur 1: Toetsprotokolle vir die daarstelling van 'n metode vir kalsiumlokalisering in die neutrofiel.

vir 1 uur in hierdie mengsel by kamertemperatuur laat staan, waarna die supernatant verwyder is en 1 ml skoon Quetol-epoksiedhars in die Eppendorffbuis gepipetteer is. Hierna is die neutrofiel oornag in hierdie oplossing by kamertemperatuur laat staan en die supernatant die volgende oggend verwyder. 'n Verdere 1 ml skoon Quetol-epoksiedhars is onmiddellik na verwydering van die supernatant in die Eppendorffbuis gepipetteer. Die neutrofiel is in hierdie oplossing by 60 °C vir 12 ure laat staan vir polimerisering waarna die neutrofielblokkie gesny is. Die snitte is nie gekleur nie.

Kontroleaksies

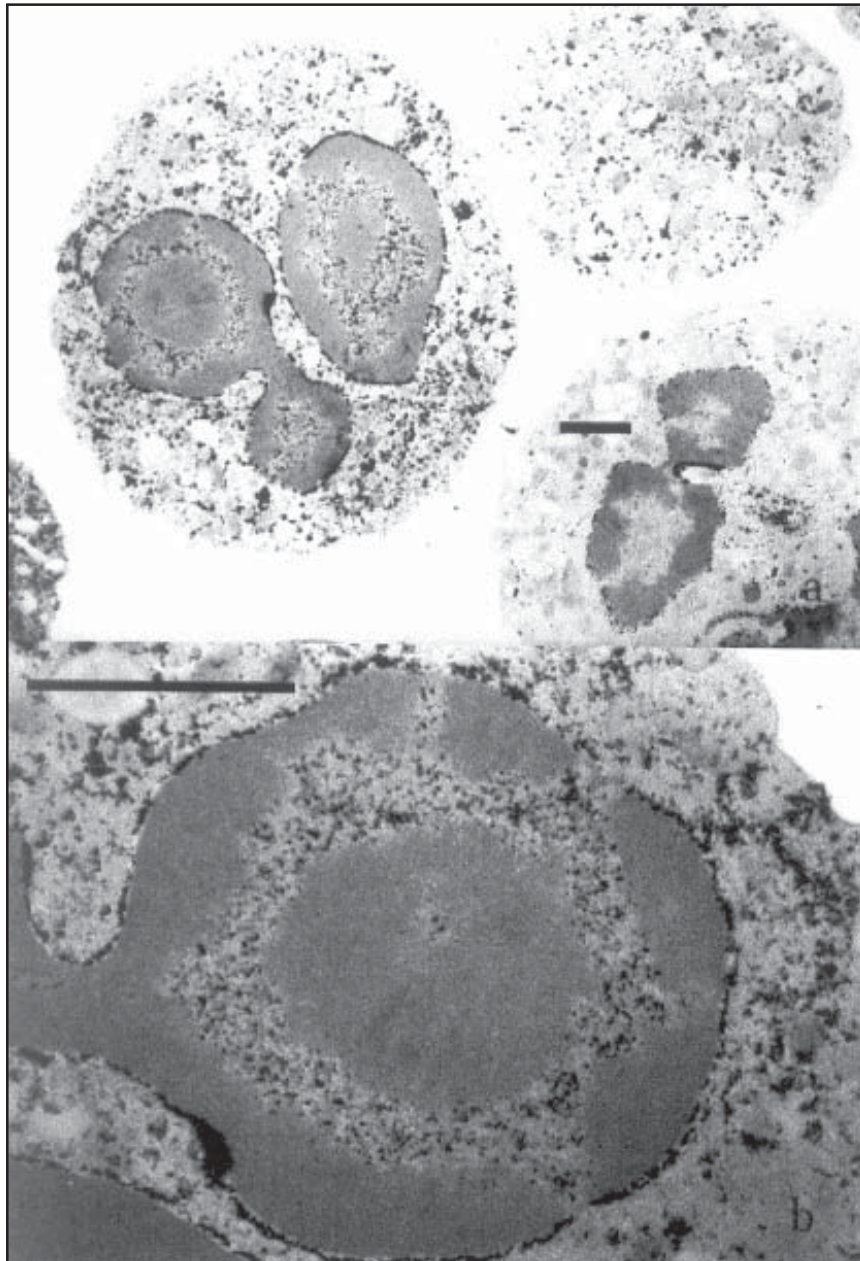
EDTA is 'n welbekende kalsiumkeleerder.^{2,8} Om die identiteit van die kation teenwoordig in die gevormde presipitate te ondersoek, is die snitte in 'n 0.2 M EDTA-oplossing pH 8.4 vir 1 uur by 60 °C gelaat. Direk hierna is die snitte geëvalueer met behulp van 'n Philips HIURS EM 301-transmissie-elektronmikroskoop (Philips Electron Optics, Eindhoven).

RESULTATE

Twee van die protokolle, 2a en 2b het die beste resultate gelever. Die enigste verskil tussen die protokolle is die insluiting of weglating van EDTA gedurende neutrofielisolering. Die resultate toon aan dat immobilisering van intrasellulêre kalsium gedurende primêre fiksering meer doeltreffend in die teenwoordigheid van kalium plaasvind as in die teenwoordigheid van natrium (figuur 2a en 2b). In die elektronmikrograwe kom presipitaatvorming verspreid deur die sitoplasma, in die spasie tussen die buitenste en binneste kernmembrane en in die nukleus voor. Figuur 3a en 3b toon die effek van EDTA-blootstelling. Die verdwyning van die presipitaat na kelering met EDTA vir 1 uur by 60 °C bewys dat die presipitaat wel kalsium bevat en nie 'n ander kation nie.

BESPREKING

Drie metodes is gebruik om kalsium tydens primêre fiksering vas te vang. In die eerste twee protokolle is die fosfaataniëon



Figuur 2a en b: Transmissie-elektronmikroskopiefoto's wat die kalsiumantimonaat-presipitaat-vorming in die neutrofiel aandui soos verkry met die gestandaardiseerde metode. Skaal 1 μm .

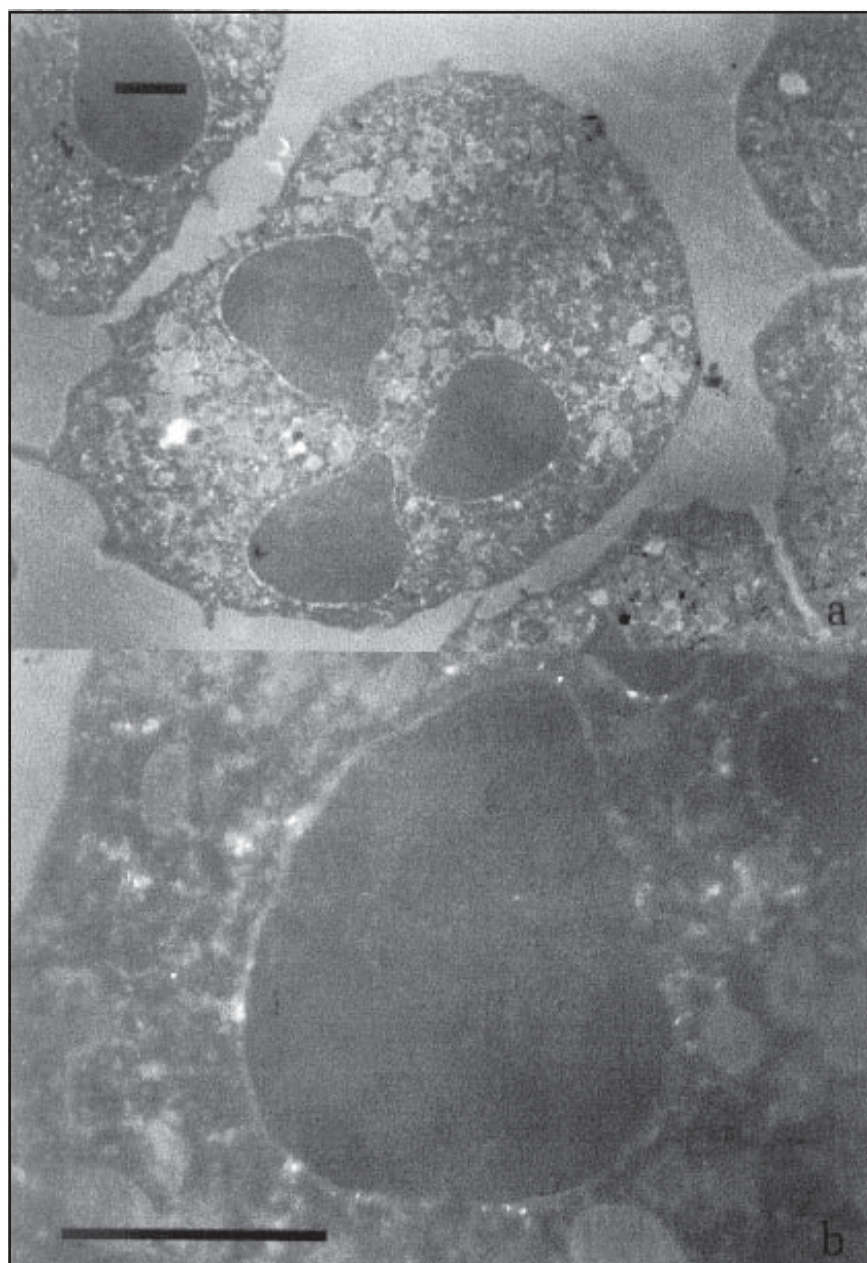
gebruik om kalsium in die primêre fikseringstap vas te vang, óf in die teenwoordigheid van natriumione (1a en 1b) óf in die teenwoordigheid van kaliumione (2a en 2b). In die derde protokol is die oksalaatanioon vir die vasvang van kalsium gebruik (3a en 3b). Die beste resultate is verkry met die inisiële binding van kalsium deur die fosfaatanioon waar fosfaat teenwoordig was as 'n kaliumfosfaatsout en nie as 'n natriumfosfaatsout nie. Met die gebruik van natriumfosfaatsout is daar minder kalsiumantimonaat-presipitate waargeneem. Die antimonaat-ion het 'n affiniteit vir natrium en moontlik het die natrium-ion kalsium verplaas vanuit die kalsiumantimonaat-kompleks.² Slegs 'n klein hoeveelheid presipitate is gevorm met die gebruik van die oksalaatanioon. Dit dui daarop dat die reaksiekondisies soos toegepas in hierdie studie nie optimaal is vir die vasvang van kalsium deur die oksalaat-ion nie.

EDTA is 'n bekende keleerder van kalsium. Omdat die ammoniumchloried-oplossing wat gebruik word vir die lisering van die rooibloedselle gedurende neutrofielisolering EDTA bevat,

is die effek van EDTA op die vorming van die kalsiumantimonaat-presipitate ondersoek. Geen verskil in die hoeveelheid en grootte van die kalsiumantimonaat-presipitate tussen 2a en 2b is waargeneem nie. Dit dui daarop dat EDTA by 'n konsentrasie van 0.25 mM, by 8 °C tydens neutrofielisolering, nie 'n noemenswaardige invloed op intrasellulêre kalsium het nie.

Die vraag of die metode wel selektief is vir kalsium is positief beantwoord deur die resultate van die keleringsreaksie. Met die blootstelling van EDTA by 60 °C vir 1 uur het die gevormde presipitate verdwyn. Dit dui daarop dat die antimonaat-presipiteringsreaksie wel spesifiek vir kalsiumione in die teenwoordigheid van die ander intrasellulêre katione is.

In die literatuur is daar teenstrydighede oor die verspreiding van intrasellulêre kalsium in die neutrofiel. Een studie is gedoen van intrasellulêre kalsiumverspreiding in die neutrofiel met behulp van die antimonaatpresipiteringstegniek waar kalsium-presipitate aangetoon is onder die selmembraan en verspreid deur die sitoplasma.⁹ Verder is verskeie studies gedoen om



Figuur 3a en b: Transmissie-elektronmikroskopiefoto's wat die verwydering van die kalsiumantimonaat-presipitate aandui met die blootstelling aan EDTA by 60 °C vir 1 uur. Skaal 1 μ m.

kalsiumstore te lokaliseer deur enige van die proteïene te lokaliseer wat geassosieer word met die kalsiumstoor. Hieruit is voorgestel dat kalsium onder die selmembraan en in domeine verspreid deur die sitoplasma voorkom.¹⁰ Daar is ook studies uitgevoer waarby die fluoressente molekule, chloortetrasiklien, wat in domeine wat 'n hoë kalsiuminhoud bevat, lokaliseer, gebruik is. Met hierdie resultate word daar 'n stoor vir kalsium aan die binnekant van die selmembraan en 'n stoor duskant die selkern (juksta-nukleêr) in die middel van die neutrofiel gehipotetiseer.¹¹ Dit is ook bekend dat kalsium in sekretoriese selle, in die spasie tussen die buitenste en binneste kernmembraan, gestoor word.¹²

Die kalsiumdistribusiepatrone wat in hierdie studie waargeneem is, sluit die meerderheid van beskryfde store in. Opmerklike presipitaatvorming is in die spasie tussen die buitenste en binneste nukleusmembraan waargeneem. Hierdie verteenwoordig die kalsiumstoor rondom die kern. Binne die kern, as deel van die minder digte euchromatien, is verskeie presipitate waargeneem. Die patroon van die kalsiumpresipitate gevorm in die nukleus, is opmerklik. Verskeie bande van presipitate projekteer uitwaarts na die nukleusmembraan. Die punt waar die presipitaatband die nukleusmembraan bereik, stem ooreen met porie-openinge in die nukleusmembraan. Verder is wydverspreide presipitaatvorming in die sitoplasma waargeneem.

Samevattend blyk dit asof die daargestelde antimonaatpresipiteringsreaksie spesifiek is vir intrasellulêre kalsium in die teenwoordigheid van die ander intrasellulêre katione in die neutrofiel. In teenstelling met verskeie van die ander genoemde tegnieke vir die ondersoek na die verspreiding van intrasellulêre kalsium, dui die antimonaatpresipitate die direkte lokalisering van kalsium aan.

LITERATUURVERWYSINGS

- Komnick, H. (1962). Elektronenmikroskopische Lokalisation von Na⁺ and Cl⁻ in Zellen und Geweben, *Protoplasma*, 55, 414.
- Wick, S.M., Hepler, P.K. (1982). Selective Localization of Intracellular Ca²⁺ with Potassium Antimonate, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 30(11), 1190-1204.
- Appleton, J., Morris, D.C. (1979). The Use of the Potassium Pyroantimonate-Osmium Method as a Means of Identifying and Localizing Calcium at the Ultrastructural Level in the Cells of Calcifying Systems, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 27(2), 676-680.
- Tandler, C.J., Libanati, C.M., Sanchis, C.A. (1970). The Intracellular Localization of Inorganic Cations with Potassium Pyroantimonate, *The Journal of Cell Biology*, 45, 355-366.
- Borgers, M., Thone, F., Verheyen, A., Terkeurs, H.E.D.J. (1984). Localization of Calcium in Skeletal and Cardiac Muscle, *Histochemical Journal*, 16, 295-309.
- Böyum, A. (1968). Isolation of Mononuclear Cells and Granulocytes from Human Blood, *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation - Supplement*, 97, 77-89.
- Van der Merwe, C.F., Coetzee, J. (1992). Quetol 651 for General Use: a Revised Formulation, *Communications of the Electron Microscopy Society of Southern Africa*, 22, 31-32.
- Slocum, R.D., Roux, S.J. (1982). An Improved Method for the Subcellular Localization of Calcium using a Modification of the Antimonate Precipitation Technique, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 30(7), 617-629.
- Northover, A.M. (1982). A Study of the Effects of Indomethacin, Flufenamate and Salicylate on the Localization of Intracellular Calcium in Rabbit Neutrophil Polymorphs using an Antimonate Staining Method, *British Journal of Experimental Pathology*, 63, 686-692.
- Krause, K-H., Pittet, D., Volpe, P., Pozzan, T., Meldolesi, J., Lew, D.P. (1989). Calciosome, a Sarcoplasmic Reticulum-like Organelle Involved in Intracellular Ca²⁺-Handling by Non-Muscle Cells: Studies in Human Neutrophils and HL-60 Cells, *Cell Calcium*, 10, 351-361.
- Pettit, E.J., Davies, E.V., Hallett, M.B. (1997). The Microanatomy of Calcium Stores in Human Neutrophils: Relationship of Structure to Function, *Histology and Histopathology*, 12, 479-490.
- Petersen, O.H., Gerasimenko, O.V., Mogami, H., Tepikin, A.V., (1998). The Calcium Store in the Nuclear Envelope, *Cell Calcium*, 23(2/3), 87-90.