

## Molekulārās mijiedarbības parametru precizitātes uzlabošana plaša redzeslauka FRET mikroskopijā

*Laura Hippe, Anita Bērziņa, Šimons Svirskis,  
Modra Murovska, Mārtiņš Kālis*

*Rīgas Stradiņa universitāte, A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas  
un virusoloģijas institūts, Latvija*

**Ievads.** Fluorescentās rezonanses enerģijas pārvešanas (FRET) metode, kas detektē molekulu mijiedarbību, kurā savstarpējais attālums ir līdz 10 nm, pirmo reizi tika aprakstīta pirms vairāk nekā 50 gadiem, un aizvien biežāk tā tiek lietota biomedicīnā un zāļu izstrādē, pētot proteīnu mijiedarbību un konformatīvās izmaiņas šūnās. FRET sistēma ir komplicēta un ietver precīzu eksperimenta dizaina, mērījumu un datu analīzes iestatījumu identificēšanu. Metodes aprobācijai par modeļa objektu tika izmantots  $Ca^{2+}$  atkarīgais  $Ca^{2+}$  (CRAC) kanāls. Kalcija krātuvju atkarīgie kanāli ir galvenais kalcija signālceļš šūnās un audos, kas piedalās gēnu ekspresijas, sekrēcijas un imūnās atbildes regulācijā. Pētījumā izmantotais STIM proteīns atrodas endoplazmatiskā tīkla (ET) membrānā un pēc  $Ca^{2+}$  izkļūšanas no endoplazmatiskā tīkla, STIM tiek aktivēts un šūnas plazmatiskajā membrānā veido jonu kanālu ar ORAI proteīnu.

**Darba mērķis, materiāls un metodes.** Darba mērķis ir noteikt piemērotākos apstākļus fluorescējoši iezīmētu molekulu mijiedarbības pētījumos plaša redzes lauka (*widefield*) divu detektoru FRET sistēmā un raksturot datu kvalitāti ietekmējošos parametrus.

HEK 293 šūnu līnija tika kultivēta uz priekšmetstikliņiem, kas apstrādāti ar poli-L-lizīnu. Transfekcijai ar plazmīdu vektoriem tika izmantots lipofektamīns (*Lipofectamine® LTX; Invitrogen, ASV*). Jonu kanāla veidošanās detektēšanai ar FRET tika izmantotas plazmīdas (STIM1 ar CFP un ORAI1 ar YFP gēnu). Ekspozīcijas laiks un datu analīzes metodes tika variētas eksperimentu gaitā, lai optimizētu FRET datu kvalitāti. Statistikas analīzēm tika izmantots *Kruskal-Wallis* tests, ko lieto neparametriskiem datiem, kā arī Pīrsona korelācija, lai noteiktu CFP/YFP attiecības ietekmi uz FRET efektivitāti.

**Rezultāti.** FRET datu iegūšanai tika izmantotas dažādas tehniskās pieejas. Pārāk spilgts fluorescences gaismas avota apgaismojums parauga apstrādes laikā veicināja fluoroforu fotobalēšanu, un tika iegūtas zemas FRET efektivitātes vērtības. Neitrālā blīvuma ND4 un ND8 optisko filtru izmantošana paraugu fokusēšanas laikā samazināja fotobalēšanu, uzlaboja emitētās fluorescences intensitāti un līdz ar to arī FRET efektivitātes vērtības. Datu analīzē tika konstatēts, ka FRET pikseļu intensitātes sastopamības biežumam jāatbilst Gausa jeb normālsadalījumam, kā arī tika atrasta korelācija starp fluoroforu attiecību un FRET efektivitātes vērtību. Sliktas kvalitātes FRET mērījumi, kas neatbilda Gausa sadalījumam, uzrādīja paaugstinātu FRET vērtību. Tomēr netika konstatēta korelācija starp CFP/YFP attiecību un FRET kvalitāti.

### Secinājumi.

1. Akurāta FRET attēla iegūšanai nepieciešams izmantot ND optiskos filtrus pirms FRET efektivitātes mērījuma veikšanas, lai mazinātu fluorofora fotobalēšanu.
2. Pareizu rezultātu interpretēšanai nepieciešams analizēt CFP/YFP attiecību un FRET signāla kvalitāti.

*Eiropas Savienības 7. ietvarprogrammas projekts "Infekcijas slimību pētniecības potenciāla attīstīšana Rīgas Stradiņa universitātē".*