

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
BIOLOĢIJAS FAKULTĀTE  
MOLEKULĀRĀS BIOLOĢIJAS KATEDRA

**FRET SISTĒMAS APROBĀCIJA CRAC JONU  
KANĀLU PĒTĪJUMIEM**

BAKALaura DARBS

Autors: Laura Hippe

Stud. apl. Nr. 13005

Darba vadītājs: Ph.D. Mārtiņš Kālis

RĪGA 2016

## KOPSAVILKUMS

Fluorescentās rezonanses enerģijas pārnese metodei ir plašs pielietojums mūsdienu zinātnē proteīnu mijiedarbības un konformācijas maiņas pētījumos. Tā kā Latvijā pētniecības metode nav izmantota, nepieciešama pilnīga instrumentu, ietekmējošo faktoru un parametru apguve no pašiem pamatiem.

Bakalaura darbā “FRET sistēmas aprobācija CRAC jonu kanālu pētījumiem” veikti trīs galvenie eksperimenti, izmantotot STIM1 ar CFP fluorescento proteīnu C vai N galā molekulas mijiedarbība ar ORAI1, kam N galā YFP proteīns, kuru gaitā uzlabota šūnu audzēšanas tehnika, FRET mikroskopa konfigurācija, kvalitatīvu attēlu uzņemšana un kvalitatīva datu apstrāde.

Iegūtas tehniskas prasmes un zināšanas augstas precizitātes FRET datu ieguvei.

**Atslēgvārdi:** CRAC, FRET, HEK 293, proteīnu mijiedarbība, YFP, CFP

## SUMMARY

Fluorescent resonance energy transfer method has wide application in modern science when studying protein interaction and conformation change. Since research method has not been used in Latvia, it requires full acquisition of tools, impact factors and parameters from very basis.

Bachelor thesis “Approbation of FRET system for studying CRAC ion channels” has three main experiments – using STIM1 with CFP fluorescent protein in C or N terminus interaction with ORAI1, which has YFP protein in N terminus. During the work process, improvements in cell growth technique were obtained, configuration of FRET microscopy set up, creating quality images and quality data analysis.

This allows to gain technical skills and knowledge for gaining high precision FRET data.

**Keywords:** CRAC, FRET, HEK 293, protein - protein interaction, YFP, CFP

## SATURS

Ievads.....	5
Apzīmējumu saraksts.....	6
1. literatūras apskats .....	8
1.1. FRET.....	8
1.2. Ca <sup>2+</sup> transports un tā loma šūnās.....	12
1.3. Uzkrājuma regulēti kanāli (SOC) .....	14
1.4. STIM.....	15
1.5. ORAI.....	17
1.6. ORAI mutācijas .....	20
1.7. STIM1 – ORAI1 .....	21
2. Materiāli un metodes .....	24
2.1. Materiāli.....	24
2.1.1. Reaģenti .....	24
2.1.2. Šūnu līnijas / DNS .....	25
2.1.3. Laboratorijas iekārtas .....	25
2.1.4. Laboratorijas materiāli.....	26
2.2. Metodes.....	26
2.2.1. LB barotnes un LB agara barotnes pagatavošana.....	26
2.2.2. Baktēriju transformācija plazmīdu pavairošanai .....	26
2.2.3. Šūnu kultivēšana un pārsēšana .....	27
2.2.4. Šūnu skaitīšana .....	28
2.2.5. Segstikliņu pārklāšana ar polilizīnu.....	28
2.2.6. Transfekcija ar lipofektamīnu.....	29
2.2.7. FRET .....	30
2.2.8. Statistiskā analīze. ....	31
3. Rezultāti un diskusija .....	32
3.1. Piloteksperimenti .....	32
3.2. Pirmais eksperiments .....	32
3.3. Otrais eksperiments.....	35
3.4. Trešais eksperiments.....	37
Secinājumi .....	39
Pateicības.....	40
Literatūras saraksts .....	41
Pielikumi.....	44
1. pielikums.....	45
2. Pielikums .....	46

## IEVADS

Fluorescentās rezonanses enerģijas pārnese (FRET) mikroskopija ir fizikāla metode, kas pirmo reizi aprakstīta pirms vairāk kā 50 gadiem un aizvien biežāk tiek pielietota biomedicīniskos zāļu izpētes un proteīnu mijiedarbības pētījumos. FRET metode balstās uz enerģijas pārnesei, kas atkarīga no divu molekulu – donora un akceptora – savstarpējā attāluma. Donora molekula tiek ierosināta ar konkrētu viļņu garumu, un, ja akceptors atrodas mazāk kā 10 nm attālumā, donora enerģija netiek emitēta, bet gan pārnesta uz akceptora molekulu, to ierosinot.

FRET sistēma ietver ne vien paraugu ierosināšanu un emisijas detekciju, bet arī piemērotāko šūnu audzēšanu, fluorescento plazmīdu ekspresiju, mikroskopa tehnisko stāvokli, konkrētu filtru izmantošanu, paraugu fokusēšanas īpatnības, datu iegūvi, programmas konfigurāciju, rūpīgu datu izvērtēšanu un analīzi.

Tika izvirzīti šādi darba uzdevumi:

- Pavairot šūnas un plazmīdu konstruktus transfekcijai;
- Iegūt praktiskas iemaņas darbā ar FRET sistēmu;
- Veikt piloteksperimentus, lai noteiktu DNS konstruktus spēju ekspresēt fluorescenti iezīmētos proteīnus un optimizētu FRET sistēmas iestatījumus atbilstošajiem mērījumiem;
- Veikt FRET eksperimentus un salīdzināt iegūto rezultātu kvalitāti aprobācijas laikā.

Darbs tika izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā šūnu bioloģijas laboratorijā laikā no 2015. gada septembra līdz 2016. gada jūnijam. Darbu vadīja Ph. D. Mārtiņš Kālis.

## APZĪMĒJUMU SARAKSTS

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>ET</sub>	Kalcija jonu koncentrācija endoplazmatiskajā tīklā
Arg	arginīns
Asp (D)	asparģīnskābe
ATPāze	adenozīn trifosfāta sintāze
CAD	CRAC aktivēšanas domēns ( <i>CRAC activation domain</i> ) = SOAR
cADPR	cikliskā ADP riboze
CC	proteīna <i>coiled-coil</i> struktūra
CFP	ciānzilais fluorescentais proteīns ( <i>Cyan fluorescent protein</i> )
CMD	CRAC modulatorais domēns ( <i>CRAC modulatory domain</i> )
CRAC	Ca <sup>2+</sup> atkarīgais Ca <sup>2+</sup> kanāls ( <i>Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel</i> )
DNS	dezoksiribonukleīnskābe
EGTA	etilēnglikola tetraetiķskābe ( <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i> )
ET	endoplazmatiskais tīkls
FERM	4.1 proteīna, ezrīna, radiksīnam moezīna saturošs domēns
FRET	Fluorescentās rezonances enerģijas pārnese ( <i>Fluorescent resonance energy transfer</i> )
Glu (E)	glutamīnskābe
HEK	cilvēka embrionālā nieru šūnu līnija ( <i>human embryonic kidney cells</i> )
Ins(1,4,5)P3	inositol-1,4,5-trifosfāts
kDa	kilodaltoni
Km	kanamicīns
LB barotne	<i>Luria-Bertani</i> barotne
Lys	lizīns
NAADP	Nikotīnskābes adenīdinukleotīdfosfāts ( <i>nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate</i> )
ORAI	Ca <sup>2+</sup> atkarīgais Ca <sup>2+</sup> modulatorais proteīns ( <i>Calcium release-activated calcium modulator</i> )
PM	plazmatiskā membrāna
Pro (P)	prolīns
R <sub>DA</sub>	donoru akceptoru skaita attiecība ( <i>donor-to-acceptor ratio</i> )
ROI	interesējošo rajonu robežas ( <i>region of interest</i> )
rpm	apgriezīnu skaits minūtē ( <i>revolutions per minute</i> )
S1P	sfingozīna-1-fosfāts

SAM	sterilais alfa motīvs ( <i>sterile alpha motif</i> )
Ser (S)	serīns
SOAR	STIM-Orai activation region.
SOC	uzkrājuma regulēti kanāli ( <i>store-operated channel</i> )
SOCE	uzkrājuma regulētā Ca <sup>2+</sup> ieplūde ( <i>Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry</i> )
ST	sarkoplazmatiskais tīkls
STIM	stromālās mijiedarbības molekula ( <i>stromal interaction molecule</i> )
TM	transmembrānas

# 1. LITERATŪRAS APSKATS

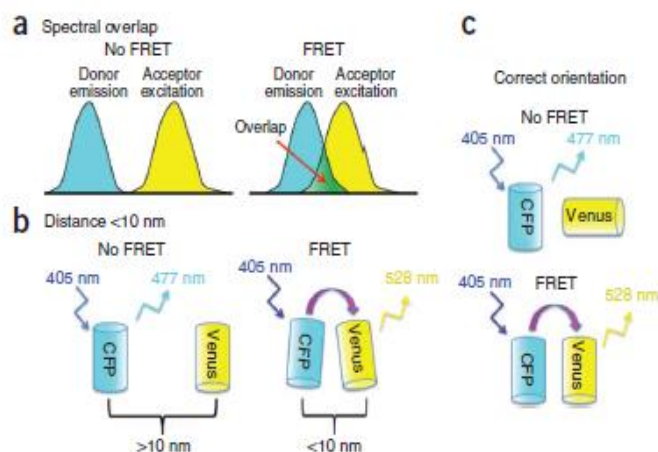
## 1.1. FRET

Gaismas difrakcija (gaismas viļņa apliekšanās ap šķērslī) ierobežo acs un optisko instrumentu izšķirtspēju. Balstoties uz Abes likumu optikā, kas liedz izšķirt divus punktus mikroskopā, kas atrodas tuvāk par 250nm, šūnu molekulārās darbības pētījumiem jāizmanto mikroskopi ar īsākiem viļņu garumiem nekā gaismai, piemēram, UV vai rentgenstari (*x-rays*), tomēr šīs tehnikas liedz attēlam piešķirt lielu krāsu kontrastu un var neatgriezeniski bojāt paraugu. Lai konstatētu vai interesējošie objekti atrodas mazāk nekā 10 nm robežās, izmanto netiešās mērīšanas paņēmienus (Silfies *et al.* 2015).

Gaismas mikroskopijas tehnikas attīstība ļauj novērot proteīnu mijiedarbību šūnā. Fluorescentās rezonanses enerģijas pārnese (FRET), saukta arī par Forstera rezonanses enerģijas pārnesei pēc vācu zinātnieka Teodora Forstera, kurš pirmais aprakstījis FRET, ir kvantitatīva gaismas mikroskopijas metode, ar kuras palīdzību iespējams detektēt molekulārās mijiedarbības dzīvās šūnās (Forster 1965, Li *et al.* 2006 cit. pēc Broussard *et al.* 2013). FRET princips ir enerģijas pārnese no viena ierosināta fluorofora (donora) uz otru (akceptoru), kuru ierosina pirmā fluorofora emisija (Chen *et al.* 2003 cit. pēc Broussard *et al.* 2013). Fluoroforus izvēlas tā, lai donora fluorescences emisijas spektrs (viļņu garums) pārklātos ar akceptora fluorescences absorbcijas spektru (Alberts *et al.* 2008). FRET eksperimentos tiek mērīta akceptora proteīna emisijas lielums. Katram proteīnam ir sava fluorescentā iezīme, kuru gaismas spektri pārklājas, piemēram, donoram ciānzilais fluorescentais proteīns (CFP), savukārt akceptoram dzeltenais fluorescentais proteīns (YFP) (Periasamy *et al.* 2008 pēc Broussard *et al.* 2013). Tiek ierosināts CFP proteīns, kurš emitē zilu gaismu, savukārt, ja tuvumā (2 - 10 nm) atrodas proteīns ar dzelteni fluorescento iezīmi, tad absorbētās gaismas enerģija tiek pārnesta no CFP fluorofora, ierosinot YFP un tiek emitēta dzeltena gaisma (attēls).

Metodi iespējams pielietot, lai pētītu proteīna konformācijas izmaiņas, pievienojot proteīnam gan donora, gan akceptora fluorescentos proteīnus, kā arī lai pētītu divu proteīnu, signālmolekulu vai receptoru mijiedarbību, vienam proteīnam piesaistot donora, otram akceptora fluorescento proteīnu.

Fotoaktivācijas ierosināšanai izmanto mikroskopus, kas ar lāzera palīdzību spēj raidīt spēcīgu gaismas impulsu nelielā šūnas reģionā (Alberts *et al.* 2008) vai arī izmanto fluorescences gaismas avotu ar attiecīgajiem fluoroforus ierosinošās gaismas spektra filtriem.



1. attēls Shematiskas diagrammas fluoroforu trīs stāvokļu apstākļi, kas ietekmē FRET efektivitāti. (a) Donora emisijas spektram jāpārklājas ar akceptora absorbcijas spektru. (b) Lai FRET notiktu, donora un akceptora attālums nedrīkst būt lielāks par 10 nm. (c) Donora un akceptora dipoliem jāatrodas paralēli. (attēls pielāgots no Brossard *et al.* 2013)

Figure 1 Schematic diagrams of fluorophore three conditions that affects FRET efficiency. (a) Emission spectrum from donor fluorophore must overlap with acceptor fluorophore's excitation spectrum. (b) FRET occurs if distance between acceptor and donor is less than 10 nm. (c) Dipoles of donor and acceptor must be parallel each other.

FRET efektivitāti iespējams noteikt ar tādām metodēm kā akceptora fotoizbalināšanu, sensitīvo emisiju (*sensitized emission*), spektrālo attēlu veidošanu (*spectral imaging*), fluorescences anizotropiju (*fluorescence anisotropy*), fluorescences ilguma attēlošanu (*fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)*).

**Spektrālā attēlu veidošana.** Metodei izmanto 32 kanālu multianodu detektorus, kas padara iespējamu vairāku krāsu spektra atbildi abiem fluoroforiem vienā attēlu uzņemšanas reizē. Iespējams detektēt abu fluoroforu emitētos signālus vienā attēlā. Tomēr nav iespējams atšķirt vai akceptora emitētā gaisma ir enerģijas pārnese rezultātā vai signāls tiek radīts no tiešas akceptora ierosināšanas. Rezultātu uzlabošanai izmanto kontroles attēlus katram fluoroforam atsevišķi.

**Akceptora izbalināšana.** Metode paredzēta fiksētiem paraugiem. Metodē izvēlas interesējošo reģionu (ROI), kurus izbalina ar lāzeri. FRET efektivitāte tiek aprēķināta balstoties uz donora signāla attiecību pirms un pēc akceptora izbalināšanas. Lai metode būtu precīza, akceptors ir pilnībā jāizbalina, precīzi noregulējot lāzera jaudu, balināšanas viļņu garumu un laiku. Metodē jāņem vērā nespecifiskā emisija akceptora spektrā (*crosstalk*) un metodes fototoksiskums dzīvām šūnām.

**Donora izbalināšana.** Metode piemērota fiksētiem paraugiem un gluži kā iepriekšējā metodē, tiek mērīta donora balēšana akceptora klātbūtnē un bez tās.

**Fluorescences anizotropija.** Metode tiek pielietota medicīniskās pārbaudēs un ietver paraugu ierosināšanu ar polarizētu gaismu.

**FLIM.** Tiek veidots attēls, balstoties uz eksponenciālu fluorescences samazinājumu pētāmajam paraugam. Attēla veidošanai nevis tiek ņemta vērā fluorofora intensitāte, bet gan fluorofora signāla ilgums (Lakowicz 2010).

**Sensitīvā emisija.** Visbiežāk pielietotā metode, kuras pamatā FRET tiek mērīts balstoties uz iegūtām paraugu un kontroles attēliem. Metode ir piemērota plašā lauka (*wide-field*) mikroskopijai. Attēlu uzņemšana noris ātri, tādēļ metode piemērota dzīvām šūnām. Kontroles un parauga attēli jāuzņem, ar vienādiem parametriem (Stack *et al.* 2011 pēc Broussard *et al.* 2013).

Nepieciešami kontroles attēli: donora (CFP), akceptora (YFP) un FRET signāli neiezīmētām, netransfēcētām šūnām, lai izmērītu autofluorescenci. Ar CFP proteīnu saistītas šūnas attēls, lai noteiktu YFP spektram atbilstošu emisiju FRET attēla kanālā (emisijas *crosstalk*), kas rada viltus pozitīvu FRET rezultātu. Iegūst YFP attēlu, kas apstarots ar donora ierosinošu gaismas viļņa garumu, lai noteiktu *crosstalk*. Tiek aprēķinātas un veiktas FRET attēla korekcijas (Lacoste *et al.* 2012 pēc Broussard *et al.* 2013). Nepieciešamie kontroles attēlu veidi var atšķirties, izmantojot dažādas datorprogrammas.

Fona korekcijas tiek veiktas, atzīmējot interesējošo rajonu robežas (ROI) un izmērot tajos vidējo FRET intensitāti. Tiek iegūts labots FRET attēls. Maksimālā fluorescento proteīnu FRET efektivitāte parasti ir 10 - 40% (Ormo *et al.* 2007 pēc Broussard *et al.* 2013).

Aprēķinot FRET efektivitāti, jāņem vērā katra fluorescentā proteīna ekspresijas atšķirības šūnā (Vogel *et al.* 2006 cit. pēc Broussard *et al.* 2013). Lai precizētu FRET mērījumu, jāveic attēla korekcija, ņemot vērā nevēlamu signālu pārnese starp kanāliem (*crosstalk*), faktu, ka katra mērītā fluorescentā intensitāte sastāv gan no FRET gan ne-FRET komponentiem, donora koncentrācija, akceptora koncentrācija (Gordon *et al.* 1998 cit. pēc Berney and Danuser 2003). FRET metodei jāņem vērā arī donora emitētās gaismas *crosstalk*, respektīvi, kad donora emisija dod daļu no akceptora spektrā mērītā emisijas signāla. Šis parametrs ir atkarīgs no fluorescento krāsu pāra spektra pārklāšanās lieluma. Jo lielāks pārklāšanās spektrs, jo tiek noteikta lielāka FRET efektivitāte, dodot paaugstinātu signālu. Jo lielāks signāls, jo lielāka iespēja, ka nav ņemtas vērā sistemātiskas kļūdas (neprecīzs mērījums).

$R_0$  ir Forstera attālums, kas atspoguļo katra krāsu pāra attālumu, kurā to efektivitāte ir 50%. Fona līmenis ir atkarīgs tikai no signāla pastiprinātāja iestatījumiem, bet ne no lāzera jaudas vai detekcijas digitālā pastiprinājuma (*gain*). Aprēķinus veic balstoties uz pikseļu

intensitātes attiecību. Netiek ņemti vērā pikseli, kuri ir pārāk spilgti vai pārāk blāvi jebkurā no kanāliem.

FRET efektivitāte atkarīga no donoru un akceptoru skaita attiecības paraugā jeb  $R_{DA}$  (*donor-to-acceptor ratio*). Zems  $R_{DA}$  nozīmē, ka virsmas laukums pārsvarā ir klāts ar akceptoru molekulām. Šādā variantā ierosinātai donora molekulai ir lielāka iespēja pārnest enerģiju uz akceptormolekulu, nekā tieši emitēt enerģiju fluorescences veidā, kā arī iespēja, ka vairākas donora molekulas *sacentīsies* par vienas akceptormolekulas ierosināšanu, ir niecīga. Zems  $R_{DA}$  rezultājas augstā FRET efektivitātē. Eksperimentos  $R_{DA}$  jābūt robežās no 1 līdz 20. Ja  $R_{DA} > 20$  FRET efektivitāte ir tuvu nullei, savukārt ja  $R_{DA} < 1$ , efektivitāte sasniedz plato fāzi, kur izmaiņas molekulu attiecībā maz ietekmē efektivitāti. Starp donoriem un akseptoriem nav konkurences. Palielinoties  $R_{DA}$  konkurence starp donoriem uz vienu akceptoru palielinās un FRET efektivitāte tuvojas nullei. FRET efektivitāte samazinās, palielinoties attālumam starp fluoroforiem. C. Bernija un G. Danusera (2003) eksperiments pierāda, ka FRET rezultāts ir uzticams, ja  $R_{DA}$  ir robežās no 0,1 līdz 100, tomēr optimālākie un stabilākie rezultāti ir, ja  $R_{DA}$  ir robežās no 0,1 līdz 10. Ārpus šīs robežas rezultāti ir nestabili, neatkarīgi no pielietotās metodes.

*1.tabula.*

**Biežāk izmantotie FRET fluoroforu pāri**

*Table 1*

**Most commonly used fluorophore pairs in FRET**

Donors (ierosinošais-emitētais viļņu garums, nm)	Akceptors (ierosinošais-emitētais viļņu garums, nm)
FITC (495-519)	TRITC/hodamīns (557-576)
Cy3 (554-568)	Cy5(649-666)
EGFP (489-508) /Alexa 488 (490-525)	Cy3 (554-568)
CFP (435-485)	YFP (514-527)
EGFP (489-508)	YFP (514-527)
BFP(402-457)	GFP (489-509)

FRET detektēšanai tiek izmantoti fluorescenti proteīni. Pirmais atklātais fluorescents proteīns bija zaļais fluorescents proteīns (GFP), kuru atklāja Osams Šimomura 1962. gadā medūzā *Aequorea victoria*, par ko 2008. gadā tika piešķirta Nobela balva ķīmijā. Proteīns ir augstas izturības atšķirīgos vides apstākļos (karstums, pH) (Ward and Bokman 1982 cit. pēc Green 2012). Mūsdienās pieejams plašs fluorescento proteīnu klāsts, kas veidoti sintētiski, balstoties uz dabīgo bioluminiscento proteīnu uzbūves. Biežāk izmantotai fluorescento

proteīnu pāris ir no zaļā fluorescentā proteīna (GFP), kas ir organiska fluorescējošā krāsa, atvasinātie varianti ciānzilais (CFP) un dzeltenais (YFP) fluorescentais proteīns. GFP un tā atvasinātie proteīni tiek attīrīti, modificēti un pievienoti proteīnam ar gēnu inženierijas palīdzību. Tomēr bez minētā pāra, izmanto arī daudz citus fluoroforu pārus (1.tabula) (Zimmermann and Terjung 2005).

FRET atšķirīgie rezultāti ir atkarīgi no izvēlētajās metodes, metodei atbilstošā *crosstalk* aprēķina. Attēlu kvalitāti un mērījumu rezultātus ietekmē arī pieejamā aparatūra. Rezultāti var atšķirties dzīvu šūnu eksperimentos, jo dažādas šūnas satur atšķirīgu proteīnu daudzumu, ietekmē arī izmaiņas eksperimenta apstākļos, piemēram, temperatūra, pH (Berney and Danuser 2003).

## 1.2. $\text{Ca}^{2+}$ transports un tā loma šūnās

Transportu cauri membrānām šūnā nodrošina jonu kanāli un pārnēsējošās baltumvielas, izmantojot ATF enerģiju vai vielu koncentrācijas gradientu.  $\text{Ca}^{2+}$  joni augu un dzīvnieku šūnās uzkrājas endoplazmatiskā tīkla (ET) iekšējā telpā jeb lumenā. Endoplazmatisko tīklu veido caurulīšu un cisternu sistēma, kas veidojas no kodola ārējās membrānas izaugumiem. Membrāna ir 6-7 nm bieza, gluda un kustīgāka kā citas šūnas membrānas.  $\text{Ca}^{2+}$  sūkņi un kanāli atrodas ET, mitohondriju un citās šūnas membrānā, un to darbību kontrolē šūnu signālsistēma. Membrānā esošie jonu sūkņi pārvieto jonus pret koncentrācijas gradientu no citosola uz lumenu.  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrācija citosolā ir  $10^{-7}$  M, ārpus šūnas  $10^{-3}$  M. Caur šūnas plazmatisko membrānu noris  $\text{Ca}^{2+}$  un  $\text{Na}^{+}$  jonu antiports. Dzīvnieku šūnās [ $\text{Ca}^{2+}$ ] citosolā palielinās, ja plazmatiskajā membrānā atveras sprieguma atkarīgie katjonu kanāli vai kanālu atvēršanos ET izraisa inozitola trifosfāts.  $\text{Ca}^{2+}$  izvadīšana no šūnas noris ar ATF-āzes palīdzību (Selga 2008).

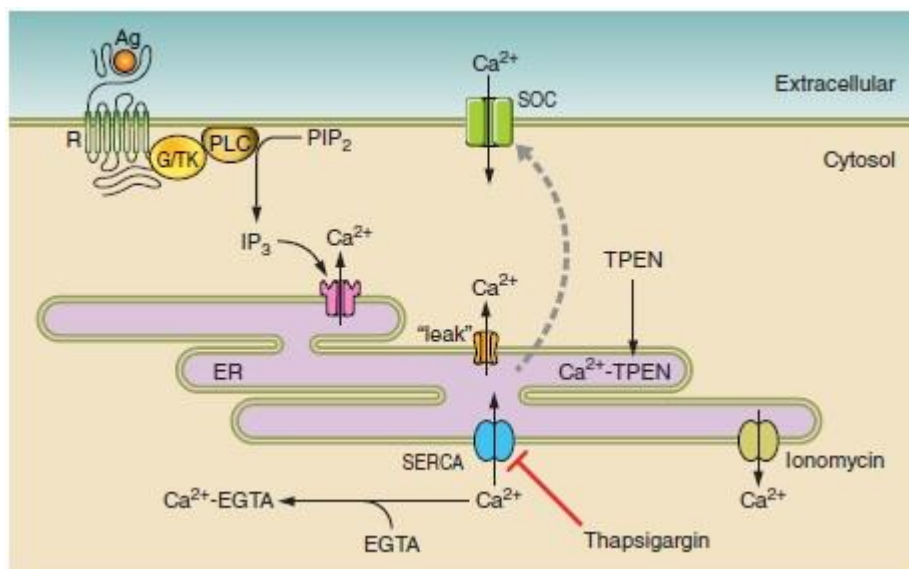
Visizplatītākais  $\text{Ca}^{2+}$  transports caur šūnas membrānu noris pa uzkrājuma regulētiem (*store-operated*) kanāliem (SOCs), kuri piedalās tādu svarīgu funkciju regulēšanā kā sekrēcija, gēnu ekspresija un šūnu augšana.  $\text{Ca}^{2+}$  regulēto procesu izpildes laika diapazons šūnās plaši variē, tādēļ arī  $\text{Ca}^{2+}$  signālsistēmu darbības mehānismi ir atšķirīgi. Piemēram, eksocitozes ierosināšana  $\text{Ca}^{2+}$  ilgst pāris mikrosekundes, savukārt tādi procesi kā gēnu ekspresija un šūnu proliferācija (dalīšanās) ilgst no minūtes līdz pat vairākām stundām (Berridge 2003).

$\text{Ca}^{2+}$  koncentrācija šūnā ir atkarīga no reakciju līdzsvara, kas regulē  $\text{Ca}^{2+}$  ieplūšanu citoplazmā un šo signālu bloķējošās buferu un sūkņu aktivitātes. Pārslēgšanās no viena procesa uz otru rada īsus  $\text{Ca}^{2+}$  impulsus, kas nodrošina kalcija jonu signālsistēmas darbību.

$\text{Ca}^{2+}$  piesaistās efektoriem (neliela molekula vai proteīns, kas stimulē bioķīmiskus procesus), kuri stimulē kalcija jonu atkarīgus procesus. Tālāk notiekošo signālceļu mehānisms ir atkarīgs no signālceļos iesaistīto komponentu (receptori, efektori, pārnēsēji (transduceri), kalcija buferi, enzīmi, kanāli, sūkņi) variācijas un izofomām, kas radušās splaisinga rezultātā. Izmaiņas konstantā signālsistēmas mehānismā var izraisīt dažādas slimības, kā piemēram, sirds mazspēju (Berridge 2003).

Signālizraisošie  $\text{Ca}^{2+}$  (ligandi) atrodas iekššūnu krātuvēs un ārpusšūnas vidē.  $\text{Ca}^{2+}$  ieplūst šūnā caur  $\text{Ca}^{2+}$  kanāliem, kas atrodas plazmatiskajā membrānā (PM). Kanālu atvēršanās ir atbildes reakcija uz tādiem stimuliem kā membrānas depolarizācija, izstiepšanās, iekššūnu mesendžeriem, ārpusšūnu un iekššūnu krātuves iztukšošanas. Iekššūnu  $\text{Ca}^{2+}$  atbrīvošanu no ET vai sarkoplazmatiskā tīkla (ST) muskuļos kontrolē paši  $\text{Ca}^{2+}$  vai mesendžeri (Ins(1,4,5)P3 receptors; cADPR; NAADP; S1P). Tie stimulē vai koriģē iekššūnu krātuvju jonu kanālus (Bootman 2002 cit. pēc Berridge 2003).

**$\text{Ca}^{2+}$  ieplūšanas mehānisms.**  $\text{Ca}^{2+}$  ieplūšanu šūnā no starpšūnu telpas. Procesu nodrošina liels elektromehāniskais gradients abpus membrānai. Ārpusšūnas esošie kalcija joni



2. attēls. Kalcija ieplūšanas mehānisms caur uzkrājuma regulētu kanālu. Agonists (Ag) (molekula, kas piesaistās šūnas receptoram un izsauc fizioloģisku atbildes reakciju) piesaistās receptoram (R), caur G proteīnu vai tirozīnkināzes ceļu (G/TK) aktivējot PLC. PLC šķeļ PIP<sub>2</sub>, kā rezultātā rodas IP<sub>3</sub>, kas atbrīvo Ca<sup>2+</sup> no ET. Ca<sup>2+</sup> koncentrācijas samazināšanās ET, aktivē SOC kanālus. Eksperimentāli Ca<sup>2+</sup> ieplūšanu no ET citosolā iespējams panākt inhibējot SERCA sūkņus ar tapsigargīna (TG) palīdzību, ar jonomicīnu, EGTA (veidojot helātus ar iekššūnu Ca<sup>2+</sup>) vai TPEN (veidojot helātus ar ET lumenā esošajiem Ca<sup>2+</sup>).

Figure 2 Store-operated calcium entry mechanism. Agonists (Ag) (a molecule that combines with a receptor on a cell and triggers physiological reaction) bind to receptors (R), activate PLC through G protein or tryosine kinase-coupled pathway (G/Tk). PLC cleaves PIP<sub>2</sub>, producing IP<sub>3</sub>, which release Ca<sup>2+</sup> from ER. Reduction of Ca<sup>2+</sup> in lumenal ER activates SOC channels. Experimentaly Ca<sup>2+</sup> depletion in ET can be achieved bt thapsigargin (TG), Ionomycin, EGTA (chelating with intracellular Ca<sup>2+</sup>) or TPEN (chelating with lumenal Ca<sup>2+</sup>).

aktivē dažādus jonu kanālus (receptoru, ligandu vai sprieguma atkarīgi  $\text{Ca}^{2+}$  kanāli, piemēram L-tipa sprieguma atkarīgs jonu kanāls) (Singh *et al.* 2006). Kalcija ieplūšanu šūnā nodrošina dažādi stimuli - gan receptoru atkarīgie, gan neatkarīgi jonu krātuves iztukšošanās stimuli (SERCA bloķētāji,  $\text{Ca}^{2+}$  helatori, lipofili  $\text{Ca}^{2+}$  jonofori, TPEN) (Gross *et al.* 2009 cit. pēc Lewis 2011). Kalcija ieplūšanu ET aktivē sarko(endo)plazmatiskā tīkla  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPāze (SERCA), kas atrodas uz ST vai ET membrānas un nodrošina  $\text{Ca}^{2+}$  transportu no citosola un lumenu (**Kļūda! Nav atrasts atsauces avots.**).

### 1.3. Uzkrājuma regulēti kanāli (SOC)

SOC kanāli tiek aktivēti stimulu dēļ, kas rodas lumenālā  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrācijas samazināšanās rezultātā endoplazmatiskajā tīklā ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ET}}$ ) par aptuveni 25% (Lewis 2011). Stimuli var būt dažādi (**Kļūda! Nav atrasts atsauces avots.**). SOC kanāli var tikt aktivēti ar receptoriem, kas atrodas uz kanāla virsmas. Receptoram piesaistās signālmolekula, kas caur G proteīnu vai tirozīnkināzes kaskādi aktivē fosfolipāzi C, kas šķeļ fatidilinositol 4,5-bifosfātu ( $\text{PIP}_2$ ) un producē inositol-1,4,5-trifosfātu ( $\text{IP}_3$ ). Uz ET virsmas atrodas  $\text{IP}_3$  receptori, kas tiek aktivēti.  $\text{IP}_3$  izraisa  $\text{Ca}^{2+}$  izplūšanu no ET caur  $\text{IP}_3$  receptoriem, kas aktivē kalcija jonu selektīvu SOC, ko sauc par  $\text{Ca}^{2+}$  izplūdes aktivētu  $\text{Ca}^{2+}$  kanālu (CRAC – Calcium Release-Activated Channel), kā rezultātā samazinās  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ET}}$  (**Kļūda! Nav atrasts atsauces avots.**) (Feske *et al.* 2006). Jonu krātuves iztukšošanos var izraisīt arī paši  $\text{Ca}^{2+}$  joni, kas ierosina  $\text{Ca}^{2+}$  izplūšanu no ET/ST caur rianodīna receptoriem (Lewis 2011; Parekh and Putney 2005 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015).  $\text{Ca}^{2+}$  ieplūde šūnā var ilgt vairākas stundas, nodrošinot bioloģisku procesu norisi. SOC kanālu darbību neietekmē membrānas potenciāls. (Berridge *et al.* 2000 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015).  $\text{Ca}^{2+}$  krātvju kontrolētā ieplūdes (SOCE) ceļa (Putney 1986 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015) sastāvā ietilpst STIM un ORAI1 proteīni, kuru atklāšana ir devusi progresu SOC molekulārā mehānisma un funkciju labākai izprašanai šūnās un audos (Lewis 2007 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015). SOCE molekulārās sastāvdaļas pilnībā joprojām nav atklātas (Prakriya and Lewis 2004, Parekh and Putney 2005 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015).

Nomācot STIM1 ekspresijas aktivitāti, tiek bloķēta CRAC kanālu aktivitāte un līdz ar to  $\text{Ca}^{2+}$  ieplūšana šūnā (Liou *et al.* 2005; Roos *et al.* 2005 cit. pēc Barr *et al.* 2009).

SERCA sūknis regulē kalcija uzņemšanu ET (Lytton *et al.* 1991 cit. pēc Barr *et al.* 2009). SERCA sūkņa inhibitors - tapsigargīns (TG) - ir plaši lietots  $\text{Ca}^{2+}$  daudzuma un SOCE saiknes pētīšanas eksperimentos. Tas ir no augiem izdalīts laktons, kam, iekš ET un ST, piemīt spēja inhibēt sarko/endoplazmatiskā tīkla kalcija ATPāzes. TG tieši izsauc  $\text{Ca}^{2+}$

izplūšanu no ET, bez receptoru un bioķīmisku signālu iesaistīšanas. Inhibē  $\text{Ca}^{2+}$  uzņemšanu vienlaikus neizsaucot  $\text{IP}_3$  sintēzi (Ong *et al.* 2007 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015).

#### 1.4. STIM

STIM (stromal interaction molecule) transmembrānas (TM) proteīns kā  $\text{Ca}^{2+}$  sensors ETā tika identificēts 2005. gadā (Liou *et al.* 2005; Roos *et al.* 2005 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015), savukārt STIM1 citosola fragmentu kristālstruktūra 2012. gadā (Yang *et al.* 2012 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). Zīdītājiem raksturīgi divi homologi – STIM1 (77 kDa) un STIM2 (84 kDa). Abiem raksturīgs lumena  $\text{NH}_2$  gals un citoplazmas COOH gals. ET lumena gala domēns ir spējīgs reaģēt uz fizioloģisku brīvo  $\text{Ca}^{2+}$  jonu koncentrācijas izmaiņu ET lumenā (Liou *et al.* 2005; Manji *et al.* 2000 cit. pēc Barr *et al.* 2009; Hogan 2015). 54-61% STIM1 un STIM2 sekvences ir identiskas (Cahalan 2009 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013), savukārt līdzība raksturīga vairāk kā 74% sekvences (Collins and Meyer 2011, Soboloff *et al.* 2012, Stathopoulos and Ikura 2013 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015). Zīdītājos STIM proteīni ekspresējas tādos audos un orgānos kā aizkuņģa dziedzerī, smadzenēs, skeleta muskuļos un sirdī, kā arī nedaudz plaušās un aknās (Williams *et al.* 2001 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015).

STIM1 miera stāvoklī atrodas viscaur ET (Mignen *et al.* 2007 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015), savukārt ierosināts STIM1 pārkārtojās klasteros (Liou *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2005).

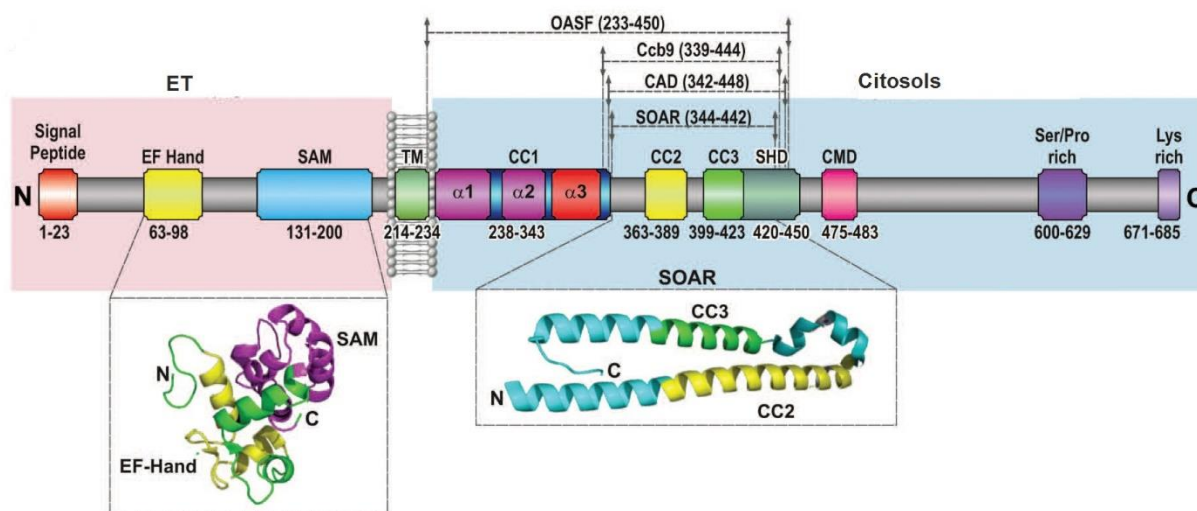
Lumena pusē atrodas EF hand (spirāle-cilpa-spirāle), pie kura saistās  $\text{Ca}^{2+}$ , un sterilā alfa motīva (SAM) domēni (3. attēls). Starp abiem domēniem pastāv hidrofobs kontakts. Kalcija piesaistīšanās gadījumā fragments ir labi salocīts, savukārt kalcija trūkuma gadījumā daži hidrofobie atlikumi ir vērsti pret šķīdinātāju, rezultējoties oligomēru veidošanā (Stathopoulos *et al.* 2008 cit. pēc Barr *et al.* 2009). Citoplazmas pusē atrodas coiled – coil (CC), FERM, serīna-prolīna bagāti un lizīna bagāti domēni (Liou *et al.* 2005; Williams *et al.* 2002 cit. pēc Barr *et al.* 2009). COOH gals piesaistās plazmatiskajai membrānai (PM) un aktivē ORAI1 (Roos *et al.* 2005, Brandman *et al.* 2007 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). ORAI1 aktivēšanu kontrolē neliels coiled-coil domēna fragments, kas atrodas FERM domēnā. Fragmenta trūkums neizraisa ORAI1 atbildes reakciju  $\text{Ca}^{2+}$  trūkuma gadījumā (Park *et al.* 2009). Pārējie COOH gala domēni ir atbildīgi par STIM1 lokalizēšanu ET-PM savienojuma izveidei (Huang *et al.* 2006, Liou *et al.* 2007 cit. pēc Barr *et al.* 2009).

Zīdītāju STIM1 ir atrodams gan ET, gan PM (2%) (Xu *et al.* 2006), savukārt STIM2 tikai ET (Soboloff *et al.* 2006). STIM2 proteīns ir iesaistīts pamata kalcija ieplūdes mehānismā, bet STIM1 funkcionē kā ET kalcija jonu sensors, kas iesaistīts CRAC kanālu

aktivēšanā (Brandman *et al.* 2007, Parvez *et al.* 2008, Stathopoulos *et al.* 2009 cit. pēc Barr *et al.* 2009).

Jonu krātuves iztukšošanās laikā lumenālais EF hand zaudē  $Ca^{2+}$ , kas izsauc homomerizāciju (STIM1 oligomēri veido klasterus) un STIM1 lokācijas maiņu PM virzienā, mijiedarbojoties un aktivējot ORAI1, veidojot ET-PM savienojumu (Xu *et al.* 2006; Li *et al.* 2007, Luik *et al.* 2008 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). FRET eksperimentu rezultātā secināts, ka krātuvju iztukšošanās noved pie stabilas STIM1 oligomēra/dimēra veidošanas lumenālajā pusē, kas ir pirmais STIM1 aktivēšanas solis (Luik *et al.* 2006; Roos *et al.* 2005, , Malli *et al.* 2008 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013).

**STIM1 ET lumena puses domēni.** ET pusē atrodas STIM1 N-terminālais gals, kam seko transmembrānu šķērsojošais domēns (TM *spaning domain*) un C-gals citosola pusē. ET daļā atrodas EF-hand domēns (Stathopoulos and Ikura 2010 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). EF-hand sastāv no spirāles-cilpas-spirāles motīva, kur negatīvi lādētās aminoskābes – aspartāts un glutamāts – saista  $Ca^{2+}$  pietiekamā krātuves jonu koncentrācijas gadījumā.  $Ca^{2+}$  krātuves iztukšošanās ir ierosinošais signāls STIM1 oligomerizācijai, un  $Ca^{2+}$  aizplūšanai no EF hand, tādējādi destabilizējot EF-SAM kompleksu. EF-SAM komplekss pietiekamā  $Ca^{2+}$  koncentrācijas gadījumā ir kompaktāks (monomērs) nekā  $Ca^{2+}$  trūkuma gadījumā, kad veidojas dimērs vai oligomērs (Stathopoulos *et al.* 2008 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013).



3. attēls STIM1 struktūra. ET – endoplazmatiskais tīkls, SAM - sterilais alfa motīvs, TM – transmembrānas domēns, CC1-3 – coiled-coil domēni, CAD- CRAC aktivēšanas domēns, SOAR – STIM1- ORAI1 aktivēšanas reģions. (Pielāgots no Fahrner *et al.* 2013)

Figure 3 Structure of STIM1. ET- endoplasmatic reticulum, SAM – sterile alpha motif, TM- transmembrane domain, CC1-3 – coiled-coil domains, CAD – CRAC activation domain, SOAR – STIM1-ORAI1 activation region.

Arī STIM2 raksturīgs EF-SAM domēns ET lumena daļā, tomēr STIM2 aktivē CRAC plūsmu pie nelielas  $[Ca^{2+}]$  samazināšanās ET. STIM2 nodrošina stabilu  $Ca^{2+}$  koncentrāciju, mazā variācijas diapazonā (Brandman *et al.* 2007 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). EF-SAM atšķirīgo mehānismu STIM1 un STIM2 izskaidro atšķirības abu proteīnu lumenālās daļas strukturālajā stabilitātē (Zheng *et al.* 2011 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). Ir veikts pētījums, kas apskata STIM2 atbildes mehānismu uz aktivāciju un liecina par STIM2 nozīmīgumu tieši zema līmeņa fizioloģiskā stimulācijā (Thiel *et al.* 2013 cit. pēc hogan 2015).

Starp lumena un citosola puses domēniem atrodas TM segments ET membrānā, kura funkcija un ietekme uz STIM1 oligomerizāciju ir neskaidra (Fahrner *et al.* 2013).

**STIM1 domēni citosola daļā.** STIM1 proteīna citosola daļa ir garāka un ietver trīs coiled-coil reģionus (CC1, CC2, CC3), CRAC modulāro domēnu (CMD), aminoskābju Ser/Pro un Lys bagātus reģionus (3. attēls). Tieši šis gals ir atbildīgs par CRAC kanālu aktivēšanu. ORAI aktivēšanā piedalās OASF, CAD, SOAR un Ccb9 domēni (Muik *et al.* 2009 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013).

SOAR veidots no 2 garām antiparalēlām alfa spirālēm (CC2, CC3), kuras savieno divas īsas alfa spirāles. SOAR nodrošina ORAI1 aktivēšanu. CC1 domēns transducē lumena daļas di-/oligomerizēšanos (Yang *et al.* 2012, Fahrner *et al.* 2009, Muik *et al.* 2011, Yu *et al.* 2013 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). CC1 nodrošina oligomerizāciju neatkarīgi no koncentrācijas jonu krātuvē, CC3+SHD nodrošina oligomerizāciju balstoties uz  $[Ca^{2+}]_{ET}$  (Muik *et al.* 2011 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013).

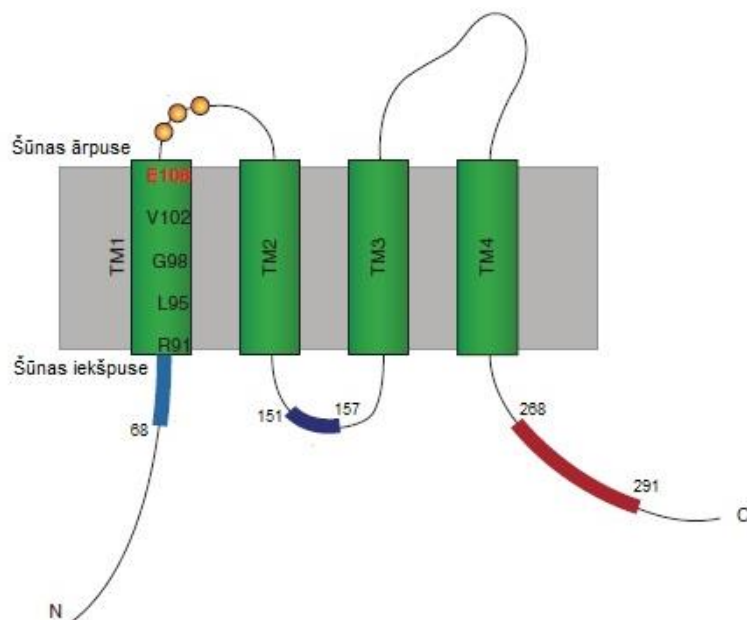
STIM1 nodrošina arī ET struktūru, saistoties ar mikrocaurulītēm EB1 un EB3 proteīnu pluss galā (Grigoriev *et al.* 2008 pēc Barr *et al.* 2009). Kalcija koncentrācijai ET krītoties, STIM1 saikne ar EB1 proteīnu samazinās, tādēļ tiek uzskatīts, ka STIM1 nevar vienlaicīgi iedarboties ar EB1 un ORAI1 (Barr V.A., unpublished data cit. pēc Barr *et al.* 2009).

## 1.5. ORAI

ORAI1, saukts arī par CRAC-membrānu (CRACM) proteīnu ir 33 kDa šūnas virsmas proteīns, kam raksturīgi 4 transmembrānas (TM) domēni, iekššūnu  $NH_2$  un  $COOH$  gali, viena iekššūnu un divas ārpusšūnu cilpas (4. attēls) (Lis *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2008 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). Cilvēka genomā ir trīs ORAI izoformas (ORAI1, ORAI2, ORAI3) (Feske *et al.* 2006). Kopējais proteīnu identiskums ir 62% , savukārt 92% tieši TM domēnos (Prakriya and Lewis 2015). ORAI1 ir vislabāk izpētītais proteīns no visiem trim ORAI analogiem, kā arī tam ir liela līdzība ar ORAI proteīnu, kas atrasts *Drosophila* un, *Caenorhabditis elegans*, tam piemīt funkcionāla saikne ar endogēniem CRAC kanāliem , kā

arī efektoru funkcija cilvēka T šūnās (reaģē uz stimuliem) (Mignen *et al.* 2008 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015). ORAI kristālstruktūra atklāta 2012. gadā (Hou *et al.* 2012 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013).

ORAI3 konstatēts tikai zīdītājiem. Tas radies ORAI 1 gēnu dublikācijas rezultātā (Shuttleworth 2012 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015) un tam raksturīga garāka III-IV cilpa, īsāks COOH gals, kam piemīt lielāka varbūtība izveidot coiled-coil strukturālo motīvu nekā ORAI1 (Frischauf *et al.* 2009 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015). Stimulējot ORAI3 kanāla aktivitāti ar 2-aminodifenilborātu (2-APB), ir konstatēta palielināta ekspresija vēža šūnās un karcinogēzes veicināšana (Motiani *et al.* 2013 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015). Palielinot ORAI3 un STIM1 ekspresiju, tiek panākta vāja kalcija ieplūde (Mercer *et al.* 2006; DeHaven *et al.* 2007 pēc Barr *et al.* 2009). ORAI isoformu funkcionālās atšķirības tiek pētītas vēl joprojām (Barr *et al.* 2009).

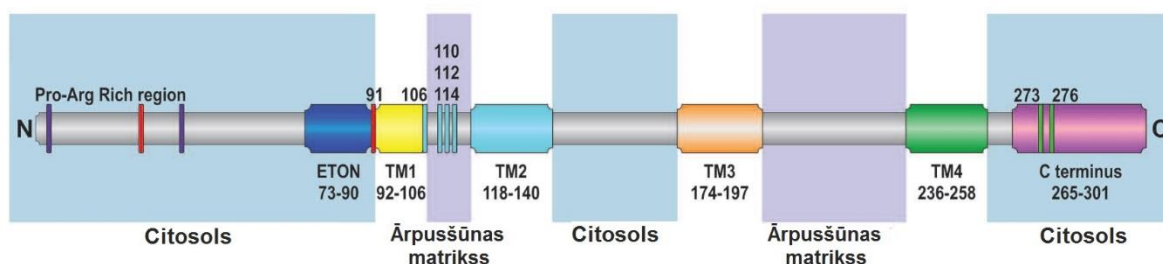


4. attēls ORAI1 funkcionālais izkārtojums šūnā. TM 1-4 Transmembrānu domēni, N (amino-) gals un C (karboksil-) gals, trīs TM savienojošas cilpas. Atzīmētas 4 nozīmīgas aminoskābes TM1 daļā, kas veido ūdens caurlaidīgu poru. E106 ir jonu selektivitātes filtrs. Tiek inhibēta kanāla funkcija, ja R91 tiek aizstāts ar hidrofobu aminoskābi. Aminoskābes pozīcijā 68-91 veido CAM saistīšanās domēnu, reģions atbildīgs par saistīšanos ar CAD un nodrošina kanāla atvēršanos. Fragmenti 151-157 nozīmīgi priekš CDI. 268 – 291 satur coiled-coil domēnu, kurš nepieciešams lai saistītos ar STIM. (Pielāgots no Lewis 2011)

Figure 4 ORAI1 functional organization in cell. TM1-4 transmembrane domains, N (amino-) terminus and C (carboxyl-) terminus, three TM connecting loops. 4 significant aa are shown in TM1, that lines the aqueous pore. E106 forms the ion selectivity filter. The channel function is inhibited, if R91 is substituted by hydrophobic residue. Residues in position 68-91 form CAM binding domain. Fragment is essential for CAD binding and channel opening. Fragment 151-157 is required for CDI. 268-291 contains coiled-coil domain, which is critical for binding STIM1.

ORAI1 ekspresējas imūnajās šūnās (makrofāgos un limfocītos), smadzenēs, aizkuņģa dziedzerī, nierēs un ādā. Dažādi pētījumi pierāda ORAI1 nozīmīgo lomu gan imūnās sistēmas šūnās, piemēram, T šūnās, tuklajās (*mast*) šūnās, B šūnās, NK šūnās, gan arī citās šūnās, piemēram, fibroblastos, skeleta muskuļos, trombocītos, mikroglījas un endotēlija šūnās, gludajos muskuļos un neironu cilmes šūnās (Baba *et al.* 2008; Oh-Hora *et al.* 2008, Stiber *et al.* 2008, Braun *et al.* 2009, McCarl *et al.* 2010, Somasundaram *et al.* 2014 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015). Gan ORAI1, gan STIM1 piedalās sviedru dziedzeru un zobu normālas attīstības un funkciju nodrošināšanā (McCarl *et al.* 2009).

Citosola pusē atrodas trīs daļas – N-terminālais gals, cilpa, kas savieno TM2 un TM3 un C-terminālais gals (5. attēls) (Prakriya *et al.* 2006, Vig *et al.* 2006, Yeromin *et al.* 2006, Schindl *et al.* 2008 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). ORAI citoplazmatiskais N-terminālais gals atbildīgs par slēgta kanāla izveidi, savukārt citoplazmatiskais C-terminālais gals par ET un PM savienojuma izveidi ar STIM1 (Gudlur *et al.* 2013). C-terminālo galu veido coiled-coil domēns, savukārt N-galu ar arginīnu bagāts un divi prolīna bagāti domēni (Cahalan *et al.* 2007, Takahashi *et al.* 2007 cit. pēc Barr *et al.* 2009). Būtiska loma STIM1 - ORAI1 savienojuma izveidē ir negatīvi lādētiem atlikumiem ORAI1 C gala coiled-coil domēnā (Calloway *et al.* 2009).



5. attēls. Pirmā ārpusšūnu matrkksa cilpa optimizē  $\text{Ca}^{2+}$  caurlaidību. Negatīvie atlikumi piesaista  $\text{Ca}^{2+}$  jonus, kontrolējot jonu koncentrāciju. Glu 106, Asp 110, 112 un 114 pozīcijā regulē jonu kanāla selektivitāti. Mutācija arginīnā 91 pozīcijā izraisa SCID. (pielāgots no Fahrner *et al.* 2013)

Figure 5 First loop optimizes permeation of  $\text{Ca}^{2+}$ . negative residues attracts  $\text{Ca}^{2+}$  ions, thereby controlling ion concentration. ETON – the extended TM1 ORAI1 N-terminal region. Arginine 91 SCID disease

Aktuāls bija uzskats, ka ORAI1 miera stāvoklī veido dimēra struktūru, savukārt STIM1 C-gala aktivācijas rezultātā veidojas par tetramēru (Gwack *et al.* 2007, Zhou *et al.* 2010, Maruyama *et al.* 2009 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). Kristalogrāfijas analīze *Drosophila melanogaster* atklāj, ka iespējama arī heksamēra struktūra. Četras transmembrānu spirāles ierosinātā stāvoklī veido 3 gredzenus – TM1 iekšējo gredzenu, kas veido jonu poru, TM2 un TM3 veido otru gredzenu kārtu un TM4 trešo (Hou *et al.* 2012 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013)

(5.attēls). Pētījumi ar metilētiem amonija atvasinājumiem liecina, ka šaurākais reģions ORAI1 poras diametrā ir 3.8 Å (Yamashita *et al.* 2007, Schindl *et al.* 2008 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013), savukārt kristālstruktūras pētījumi liecina, ka tas ir 6 Å (Hou *et al.* 2012 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013).

Kanāla selektivitāti regulē TM1 reģionā negatīvi lādēta glutamīnskābe (E106) un 3 negatīvi lādētas asparģīnskābes D110/112/114 pirmajā ārpusšūnu matricas cilpā. Viena punkta (*single point*) mutācijas gadījumā E106D (Vig *et al.* 2006, Lee *et al.* 2009 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013) poras minimālais diametrs palielinās līdz 5.4 Å un Ca<sup>2+</sup> selektivitāte samazinās (Yamashita *et al.* 2007 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). Joni piesaistās negatīvajiem atlikumiem cilpā, tad virzās cauri ORAI, saistoties pie glutamīnskābes (E106). Citoplazmas pusē kanāla poras diametrs kļūst lielāks. Talāk Ca<sup>2+</sup> joni virzās caur hidrofobo poras daļu līdz sasniedz ETON reģionu, pie kura piesaistīties STIM1. Ca<sup>2+</sup> ieplūst citosolā. TM3 domēns regulē selektivitāti un ORAI kanāla blīvumu (Fahrner *et al.* 2013).

Mutācijas ORAI proteīnā ietekmē CRAC kanāla funkcijas, pierādot, ka tas ir CRAC kanāla sastāvdaļa (subvienība) (Vig *et al.* 2006, Yeromin *et al.* 2006 cit. pēc Barr *et al.* 2009).

## 1.6. ORAI mutācijas

Mutācijas ORAI proteīnā noved pie imūndeficīta slimībām, ekrīno sviedru dziedzeru funkciju problēmām un zobu emaljas nepilnvērtīgas veidošanās. Cilvēka T šūnas, kurās ir nefuncionējoši CRAC kanāli, izraisa smagu kombinētu imūndeficīta sindromu (*Severe combined immunodeficiency syndrome (SCID)*) (Partiseti *et al.* 1994, Fanger *et al.* 1995, Feske *et al.* 2005 cit. pēc Barr *et al.* 2009; Partiseti *et al.* 1994 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015). Pacienti raksturīga viegla muskuļu miopātija, samazināts spēks un izturība (McCarl *et al.* 2009). Vienīgā funkcionālā tearpija ir asinsrades cilmes šūnu transplantācija (Lewis 2011). Ekrīno dziedzeru darbības traucējumu gadījumā āda kļūst sausa un tiek traucēta organisma termoregulācija, kas rezultējas periodiskā drudzī (McCarl *et al.* 2009). Pacienti ar imūndeficīta sindromu atklāj viena nukleotīda (*single missense*) mutāciju ORAI1 (R91W), kas aptur CRAC kanāla aktivitāti (Feske *et al.* 2006). Kanāla plūsmas samazināšanās intensitāte ir atkarīga nevis no ORAI1 R91W pozīcijas, bet gan mutanto subvienību skaita tetramērā (Thompson *et al.* 2009 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013).

Ja coiled-coil domēnā notikusi mutācija vai tas trūkst, ORAI netiek aktivēts un saistīšanās ar STIM1 nenotiek. Punktveida mutācija hidrofoba leicīna nomainā 273. pozīcijā uz hidrofilo serīnu (L273S) un L276D mutācija destabilizē coiled-coil struktūru (Muik *et al.* 2008; Frischauf *et al.* 2009 cit. pēc Lewis 2011).

Mutācija Arg ORAI1 pirmās TM spirāles tuvumā izslēdz kalcija ieplūdi cilvēka šūnā (Calloway *et al.* 2009), lai gan mijiedarbība ar STIM1 notiek (Muik *et al.* 2008; Navarro *et al.* 2008 pēc Barr *et al.* 2009). Arī ORAI1 ar izdzēstu N-galu veido kontaktu ar STIM1, tomēr kalcija ieplūde nenotiek (Muik *et al.* 2008; Li *et al.* 2007 pēc Barr *et al.* 2009). Mutācija hidrofobās daļas V102 aminoskābē vai polārā glicīna G98 TM1 daļā, rezultējas kanāla bloķēšanā atvērtā konformācijā (McNally *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2011 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). Single point mutācija TM3 domēna E190 būtiski palielina poras diametru līdz aptuveni 7.4 Å (Prakriya *et al.* 2006, Vig *et al.* 2006, Yamashita *et al.* 2007, Schindl *et al.* 2008 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013).

Delēcija ORAI1 C-gala daļā ( $\Delta$ 283–301) netraucē STIM1 piesaistei, norādot, ka šis reģions nav būtisks mijiedarbībai ar STIM1 proteīnu (Lee *et al.* 2009 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013).

Mutants ORAI1 vai STIM1 vai to trūkums izraisa defektu citokīna ekspresijā peles T šūnās (Gwack *et al.* 2008 pēc Lewis 2011), savukārt tuklajās šūnās nepareizu sintēzes procesu vai iekaisuma mediatoru izdalīšanos (Baba *et al.* 2008).

## 1.7. STIM1 – ORAI1

STIM1 ir regulatorais proteīns, kas tieši mijiedarbojoties kontrolē  $Ca^{2+}$  kanāla ORAI1 caurlaidību. SOC kanālu darbības mehānisms formulēts balstoties uz dažādu šūnu eksperimentu rezultātiem (Hoth and Penner 1993, Zweifach and Lewis 1993, Roos *et al.* 2005 cit. pēc Hogan 2015). CRAC plūsma nodrošina ilgstošu citoplazmatiskā Ca signālu nodošanu šūnā. STIM1-ORAI1 mijiedarbību iespējams novērot  $Ca^{2+}$  krātuvju iztukšošanās gadījumā ar FRET, iezīmējot proteīnus ar atbilstošu donoru un akceptoru fluoroforiem (Muik *et al.* 2008; Gudlur *et al.* 2013).

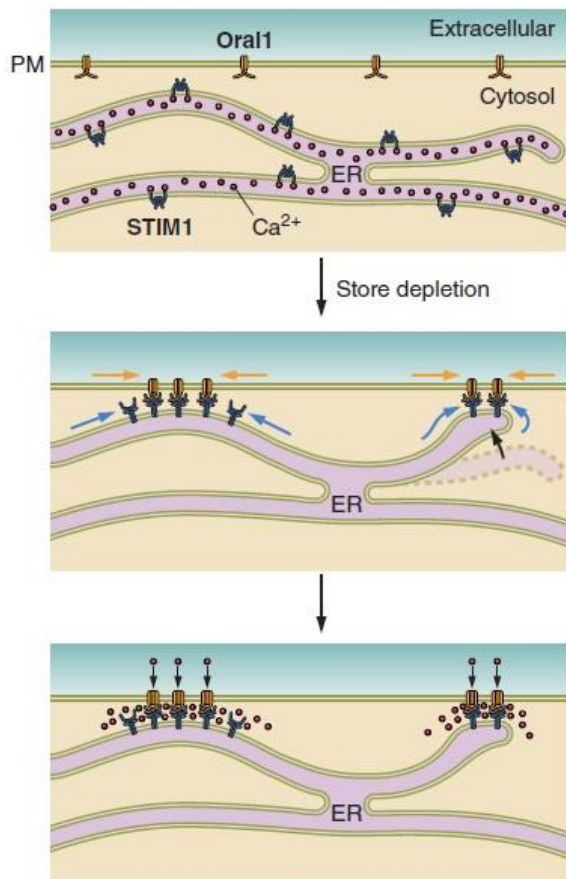
Neaktivētā stāvoklī STIM un ORAI ir mobili un izplatīti viscaur ET un PM. Jonu ieplūšana no endoplazmatiskā tīkla citosolā aktivē SOCE (6.attēls).

STIM1 un ORAI1 pārvietojas attiecīgajā membrānā, akumulējas, veidojot klasterus, kuras iespējams redzēt proteīniem pievienojot fluorescento iezīmi (Mercer *et al.* 2006; Wu *et al.* 2006; Hogan 2015). Proteīna pārvietošanās tika konstatēta imūnajās šūnās (Jurkat T šūnas un žurku bazofilās leikēmijas tuklās šūnas), kā arī HeLa un HEK293 šūnu līnijām (Liou *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2005).

ORAI kanālu skaits ir atkarīgs no šūnu tipa, piemēram T šūnās, mast šūnās un *Drosophila* S2 šūnās CRAC plūsma ir augstāks nekā HEK293 šūnās. Vairāki pētījumi liecina,

ka tikai daži ORAI kanāli ir aktīvi savienojuma vietās zīdītāju šūnās, neatkarīgi no stimulācijas lieluma. (Hogan 2015).

**Kalcija izkļūšana no ET.** Jonu izplūšanu no ET eksperimentāli panāk ar tapsigarginu (Park *et al.* 2009; Liou *et al.* 2007, Covington *et al.* 2010, Fukushima *et al.* 2012 cit. pēc



6. attēls STIM1 un ORAI1 savienojuma izveides diagramma. STIM1 un ORAI1 izkārtojušies viscaur ET un PM šūnas miera stāvoklī. cit. pēc krātuves iztukšošanās, abi proteīni maina lokalizāciju un veido klasterus. ORAI1 kanāls atveras un  $Ca^{2+}$  joni ieplūst šūnā. (Pielāgots no Prakriya and Lewis 2015)

Figure 6 STIM1 and ORAI1 junction formation diagram. STIM1 and ORAI1 are distributed throughout the ER and PM in resting cell. After store depletion, both proteins colocalize and forms puncta. ORAI1 channels are opening and  $Ca^{2+}$  are entering the cell.

Mercer *et al.* 2006; Soboloff *et al.* 2006).

**STIM aktivēšana un saistīšanās ar ORAI.** STIM 1 tiek aktivēts oligomerizēšanas rezultātā gan lumena, gan citosola coiled-coil domēnu daļās,  $[Ca^{2+}]_{ET}$  samazināšanās rezultātā. Ir iespējamās 2 STIM1 konformācijas (1. pielikums). CAD fragments veido

Prakriya and Lewis 2015), jonomicīnu (Muik *et al.* 2008) un augstu iekššūnu  $IP_3$ , vai helātu koncentrāciju (Lewis 2011). STIM1 klasterošanās un kanāla veidošanu ar ORAI1 iespējams panākt arī pakļaujot šūnu stresam, piemēram, oksidācijai ar  $H_2O_2$  vai butionīna sulfoksimīnu (Hawkins *et al.* 2010 cit. pēc Lewis 2011). Jonu izkļūšana no krātuves var notikt arī ar receptoru piesaisti, kur fosfolipāze  $C\gamma$  ( $PLC\gamma$ ) šķel fosfatidilinositol-3,4-bifosfātu, kā rezultātā rodas inositol-1,4,5-trifosfāts ( $IP_3$ ), kas izraisa kalcija izkļūšanu no ET (Feske 2007, Samelson 2002 cit. pēc Barr *et al.* 2009).  $[Ca^{2+}]$  palielināšanās citosolā inducē īslaicīgu kustīguma un izplatīšanās samazināšanos. Kalcija izplūšana no ET aktivē SOC jonu kanālu atvēršanos plazmas membrānā (Oh-hora and Rao 2008 cit. pēc Barr *et al.* 2009).

CRAC kanāla aktivēšanu, neatkarīgi no kalcija līmeņa ET, izraisa arī mutācijas glutamāta vai aspartāta atlikumos, kas ir EF hand domēna sastāvdaļa. Mutāciju gadījumā, kalcija saistīšanās minētajās vietās nenotiek, taču tiek radīts signāls, kas liek STIM proteīnam mainīt lokalizāciju, veidojot klasterus. (Zhang *et al.* 2005;

tetramēru, savukārt atlikusī citosoliskā daļa veido dimēru (Ji *et al.* 2008 pēc Lewis 2011). STIM1 maina lokalizāciju veidojot klasterus. CC1 domēns regulē aktivēšanas statusu, savukārt CC2 saistās ar ORAI1 C-galu. N-gala saistīšanās ar STIM1 vēl joprojām ir neskaidra (Fahrner *et al.* 2013; Ercan *et al.* 2009, Zhou *et al.* 2013, Bhardwaj *et al.* 2013 cit. pēc Hogan 2015)). Savienojuma izveidē un ORAI1 aktivēšanā piedalās SOAR reģions, kas konformācijai mainoties kļūst pieejams (Liou *et al.* 2005; Luik *et al.* 2006; Xu *et al.* 2006; Roos *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2006 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013). STIM1 spēj saistīt ORAI1, atrodoties CC1 reģiona coiled-coil vai alfa-spirāles izstieptā konformācijā, ko pierāda FRET iekššūnu mērījumi (Muik *et al.* 2011, Zhou *et al.* 2013 cit. pēc Hogan 2015).

STIM1 tieši mijiedarbojas ar ORAI1 C-galu, tomēr pētījumi liecina, ka ET-PM savienojuma kompleksa veidošanā iesaistīti arī citi proteīni (Muik *et al.* 2008; Calloway *et al.* 2009). FRET eksperimenti parāda enerģijas pārnēsi starp abām molekulām, kas nozīmē, ka abu molekulu savstarpējais attālums ir mazāks par 10nm. Ja tas ir lielāks, saskatāmi atsevišķi STIM1 klasteri. (Liou *et al.* 2007 pēc Barr *et al.* 2009). ORAI1 pārkārtojas klasteros tikai pēc STIM1 lokalizācijas maiņas. (Luik *et al.* 2006; Muik *et al.* 2008).

STIM1 afinitāte pret ORAI1 palielinās, paaugstinoties coiled-coil domēna varbūtībai C-terminālajā galā. (Zhang *et al.* 2013 cit. pēc Fahrner *et al.* 2013).

**ET-PM savienojums.** Pētījumi, izmantojot elektronmikroskopu, uzrāda, ka ET-PM sprauga ir 10 līdz 20 nm liela (Wu *et al.* 2006; Hogan 2015; Lur *et al.* 2009, Orzi *et al.* 2009 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015). Viens pētījums liecina, ka ET jonu krātuves uzpildīšanās var nebūt pietiekami efektīvs paņēmiens SOCE procesa pārtraukšanai, un ka papildus ir nepieciešams  $Ca^{2+}$  ieplūst caur ORAI1 citosolā, lai lumena  $Ca^{2+}$  piesaistītos STIM1 EF hand daļai. (Malli *et al.* 2008, Shen *et al.* 2011 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015). Tiešais  $Ca^{2+}$  sensors (STIM1 daļa), kas nodrošina šo procesu, kā arī STIM1 un ORAI1 lokalizācijas maiņas pamata mehānisms nav zināms vai ir nepietiekami saprasts. Tiek veikti pētījumi, lai noskaidrotu kādi proteīni ir iesaistīti ET-PM savienojuma izveidošanā un stabilizēšanā (Prinz 2014 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015). Līdz šim arī par  $Ca^{2+}$  saistīšanās vietām, to lokalizāciju un īpašībām STIM-ORAI1 mikrodomēnā informācija ir nepilnīga (Hogan 2015).

Pēc jonu kanāla atkārtotas uzpildes, STIM1 un ORAI1 atgriežas iepriekšējā difūzajā izkārtojumā. (Muik *et al.* 2008; Sampieri *et al.* 2009; Malli *et al.* 2008, Smyth *et al.* 2008 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015).

## 2. MATERIĀLI UN METODEDES

Bakalaura darbs izstrādāts Rīgas Stradiņa universitātes Augusta Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtā Ph. D. Mārtiņa Kāļa vadībā no 2015. gada septembra līdz 2016. gada jūnijam.

### 2.1. Materiāli

#### 2.1.1. Reaģenti

0,05% Tripsīns/EDTA (etilēndiamīntetraetiķskābe) 1X (*Invitrogen*, ASV)

0,4% Tripānzilais krāsas šķīdums (*Amresco*, ASV)

1x fosfāta buferis (PBS – phosphate Buffered Saline) pH 7,4 (*Thermo Fisher Scientific*, ASV)

1x TAE buferis (*Thermo Scientific*, ASV)

6x uznešanas buferis ar fluorescento nukleīnskābju krāsu GelRed (6x Loading Buffer with GelRed) (*GenScript*, ASV)

96% etanols

Agarozē (*Agarose D1 low EEO*) (*Conda biolab*, Spānija)

Bakto Agars (Bacto Agar “Typ USA”) (*Ferak Laborat GmbH Berlin*, Vācija)

Bakto Triptons (Bacto™ Tryptone) (*Becton, Dickson and Company*, ASV)

Destilēts ūdens

Dimetilsulfoksīds DMSO (*Sigma Aldrich*, ASV)

DMEM Dulbeko modificētā Īgla barotne (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 1X papildināta ar L-glutamīnu, 100X Penicilīnu un Streptomicīnu (PenStrep) (*Gibco*, ASV), fetālā teļa serumu (FBS) (*HyClone*, Lielbritānija)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ar augstu glikozes koncentrāciju (*Invitrogen*, ASV)

DNS marķieris 1kb (GeneRuler 1kb DNA ladder) (*Thermo Fisher Scientific*, ASV)

Kanamicīns (*Sigma Aldrich*, ASV)

Lipofectamine® LTX (*Invitrogen*, ASV)

NaCl (Михайловский завод химреактивов, Krievija)

NaOH (*Sigma Aldrich*, ASV)

Nukleāžu nesaturošs ūdens (nuclease free water) (*Thermo Fisher Scientific*, ASV)

Plazmīdu DNS izdalīšanas komplekts E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (*OMEGA bio-tek*, ASV)

Plus™ Reagent (*Invitrogen*, ASV)

Polilizīns Poly-l-lysine (*Boster Biological Technology*, ASV)

Rauga ekstrakts (BBL™ Yeast Extract) (*Becton, Dickson and Company*, ASV)

Thapsigargin (*Alomone Labs*, Izraēla)

### 2.1.2. Šūnu līnijas / DNS

Kompetentas *E. coli* baktēriju šūnas (Chemically Competent Cells) (*Invitrogen*, ASV)

Darbā tika izmantotas 3 veidu ekspresijas plazmīdas, kurās ekspresējamie proteīni ir konjugēti ar fluorescento proteīnu. Plazmīdu konstrukti iegūti no Muik M. *et al.* 2008 un izmantoti ar autoru atļauju.

1. ORAI1 ar konjugēto dzeltenu fluorescento proteīnu (YFP) 5' galā (pEYFP-C1-ORAI1)
2. STIM1 ar zilo fluorescento proteīnu 5' galā (pCFP-C1-STIM1) izmanto kontrolei, jo CFP, kas piesaistīts STIM1 N galā lokalizējas ET lumenā, tāpēc neveido FRET ar YFP-ORAI1
3. STIM1 ar zilo fluorescento proteīnu 3' galā (pCFP-N1-STIM1)

Izmantota HEK 293 18.- 50. pasāžas šūnu līnijas, kas tika pārsēta attiecībā viens pret desmit.

### 2.1.3. Laboratorijas iekārtas

Analītiskie svāri (*Sartorius lab*, Vācija)

Autoklāvs (*CertoClav*, Austrija)

CO<sub>2</sub> inkubators (*SANYO Electric Co.* MCO 175, Japāna)

Hemocitometrs (*Горяев*)

Inkubators – kratītājs *New Brunswick™ Innova® 43* (*Eppendorf*, ASV)

Invertētais gaismas mikroskops (*Leitz Labovert FS*, Vācija)

Invertētās gaismas widefield mikroskops (*Nikon Eclipse Ti-U*, Japāna)

Laminārās gaisa plūsmas skapis (*AC2-4E8*) *Airstream®*, II klases A2 tips (*Esco*, ASV)

Mikrocentrifūga/vortekss *Micro-Spin FV-2400* (*Biosan*, Latvija)

Mikroskops šūnu skaitīšanai (*PZO*, Polija) ar gaismas padevi *ZM5 max 6V*

Sildīšanas bloks *CH-100* (*Biosan*, Latvija)

Spektrofotometrs *NanoDrop ND-1000* (*NanoDrop Technologies*, ASV)

Ultrazemas temperatūras saldētava *SANYO MDF-U53V (-80°C)* (*SANYO Electric Co.*, Japāna)

Ūdens vanna-termostats WB-4MS (Biosan, Latvija)

#### **2.1.4. Laboratorijas materiāli**

Audu un šūnu kultivēšanas flakoni (T25) (Sarstedt, ASV)

Audu un šūnu kultivēšanas plates (6 bedrīšu) (Sarstedt, ASV)

Automātiskā pipete 0,2-10, 10-100, 20-200, 100-1000  $\mu$ l Finnpiquette (Thermo Scientific, ASV)

Automātisko pipešu vienreizlietojamie uzgaļi (Thermo Scientific, ASV)

Centrifugēšanas stobriņi (15 un 50 ml) (Sarstedt, ASV)

Kolba (100 ml, 200 ml)

Ledus vanniņa

Mikrocentrifugēšanas stobriņi (1,5 un 2 ml) (Sarstedt, ASV)

Pipetēšanas palīgiekārtā Integra Pipetboy acu 2 (Integra Biosciences, ASV)

Pincete

Segstikliņi (18x18 mm) (Gost, PSRS)

Spirta lampiņa

Stikla špatele

Vienreizlietojamās seroloģiskās pipetes (5, 10, 25 ml) (Sarstedt, ASV)

Vārglāze (100 ml)

## **2.2. Metodes**

### **2.2.1. LB barotnes un LB agara barotnes pagatavošana**

Kolbā pagatavo 100 ml LB barotnes. Vienu 10g/l bakto triptona, 5g/l rauga ekstrakta un 10g/l NaCl izšķīdina 95 ml destilēta ūdens. Pievieno 5  $\mu$ l 1M NaOH. Šķīdumu sterilizē, autoklāvējot 20 min 15 psi. Pēc autoklāvēšanas atdzesē šķīdumu līdz 55°C un pievieno antibiotiku – Kanamicīnu (50  $\mu$ g/ml).

Lai pagatavotu 100 ml agarizētu LB barotni, LB barotnē pirms autoklāvēšanas izšķīdina 15 g/l agara. Pēc autoklāvēšanas atdzesē līdz aptuveni 55°C, pievieno antibiotiku un lej petri platēs. Katrā aptuveni 30 ml šķīduma. Kad barotne sacietējusi, petri plates ievieto tumšā telpā +4°C.

### **2.2.2. Baktēriju transformācija plazmīdu pavairošanai**

Transformācija ir veids kā baktēriju šūnai iespējams uzņemt svešu DNS. Baktēriju šūnas, kuras var integrēt savā genomā svešu DNS, tiek sauktas par kompetentām. Būtiski, lai kompetentās baktēriju šūnas atrodas log augšanas fāzē (šūnas aug un dalās) (Hanahax 1983

cit. pēc Inoue *et al.* 1990). Plazmīdu DNS ir stabils un spēj autonomi replicēties saimniekšūnā, izmantojot saimniekšūnas replikācijas mehānismu. Transformējamās baktēriju šūnas atlasa, audzējot barotnē, kur pievienota selektīva antibiotika. Rekombinanta plazmīda satur antibiotiku rezistences gēnu, kas ļauj šūnai augt attiecīgo antibiotiku saturošā vidē.

### **Pirmā diena**

Pirms darba sākšanas ieslēdz un noregulē sildīšanas bloku 42°C un ūdens vannu 37°C.

2 µl plazmīdu DNS pārnes eppendorf mikrocentrifugēšanas stobriņā.

Kompetentās šūnas, kas tiek glabātas -80°C, ievieto ledus vanniņā. Kad šūnas atkusušas, 100 µl kompetento šūnu pievieno stobriņā ar plazmīdu DNS. Transformācijas stobriņu 15 min inkubē ledū.

Stobriņu ievieto sildīšanas blokā (42°C) uz 90 sekundēm, pārnes uz ledus vannu un inkubē 2 min.

Transformācijas stobriņiem pievieno 300 µl sterilas LB barotnes. Kolbas augšdaļu turēt tuvu spirta lampiņas liesmai, lai nepieļautu baktēriju iekļūšanu barotnē no gaisa un nodrošinātu sterilitāti.

Transficējamās stobriņus inkubē ūdens vannā 37°C 1h.

Aptuveni 30 µl šūnu uznes uz antibiotiku saturošas LB barotnes un vienmērīgi izlīdzina pa barotnes virsmu ar sterilu špateli.

Petri plates ievieto inkubatorā 37°C uz 18-20 stundām.

### **Otrā diena**

Centrifugēšanas stobriņā (15 ml) iepilda 6 ml LB barotnes un 100 µl/l Km.

Uz agarizētās LB barotnes izvēlas izolētu koloniju, kurai pieskaras ar vienreizlietojamu pipetes uzgali. Uzgali ieliek centrifugēšanas stobriņā ar sagatavoto LB barotni un inkubē kratītājā 37°C 200 rpm uz nakti. Lai nodrošinātu baktēriju augšanu un aerāciju, korķīti atstāj nedaudz vaļīgu un nostiprina ar līmlenti.

### **Trešā diena**

Izolē plazmīdu DNS, izmantojot plazmīdu minipreparātu komplekta (plasmid miniprep kit) instrukciju (*Omega Biotek, ASV*).

Spektrofotometrā nosaka plazmīdu koncentrāciju izolētajā šķīdumā.

## **2.2.3. Šūnu kultivēšana un pārsēšana**

Eksperimentos izmantoto adherentas HEK 293 šūnas. Šūnas pārsēj, kad sasniegta aptuveni 70-90 % virsmas laukuma konfluence.

Mikroskopā novērtē šūnu konfluenci un tīrību. No T25 šūnu kultivēšanas flakona atsūc barotni un šūnas divas reizes mazgā ar 2 ml 1x PBS, lai aizvadītu serumu saturošus tripsīna

inhibitorus. Flakonā iepilda 1 ml 0,05% tripsīnu/EDTA šķīdumu. Flakonu ievieto CO<sub>2</sub> inkubatorā uz 5 minūtēm. Mikroskopā vai pret gaismu novēro šūnu atdalīšanos no flakona virsmas. Pievieno 4 ml DMEM. Šūnu suspensiju pārnes uz stobriņu.

Veic šūnu skaitīšanu.

Daļu suspensijas (attiecībā 1:10) uzsēj jaunā T25 flakonā šūnu audzēšanai, pievieno DMEM barotni tā, lai kopējais tilpums ir 6 ml. Šūnas eksperimentam uzsēj 6 bedrīšu platēs. Katrā plates bedrītē ievieto ar polilizīnu apstrādātu segstikliņu. Katrā plates bedrītē pievieno 2 ml šūnu suspensijas ar koncentrāciju  $60 \times 10^4$  šūnu/bedrītē. Flakonu un šūnu plati liek inkubatorā 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Šūnas no audu kultūras flakona virsmas atdala ar proteolītisku enzīmu – tripsīnu. Tripsīns katalizē peptīdsaišu hidrolīzi, pārrauj ekstracelulāro matriksu, noārda šūnu adhēzijas proteīnus. Lai samazinātu adhēzijas molekulu mijiedarbību, tripsīnam tiek pievienota etilēndiamīntetraetiķskābe (EDTA) (Albert *et al.* 2002).

#### 2.2.4. Šūnu skaitīšana

Sagatavo skaitīšanas kameru un segstikliņu. Iesākumā materiālus notīra ar spirtu, nosusina un ar nelielu ūdens pilienu piestiprina segstikliņu pie hemocitometra. Ņūtona gredzenu atspīdums norāda uz atbilstošu virsmu saskari.

Nosaka šūnu skaitu kvadrātā un izmantojot formulu aprēķina šūnu skaitu vienā mililitrā.

Pipetējot, sajauc šūnu suspensiju. Pirms šūnas nogulsņējas, 20 μl suspensijas sajauc ar 0,04% 20 μl tripānzilo krāsu. Tripānzilais iekrāso mirušas šūnas zilas. Uznes 20 μl krāsoto šūnu suspensijas Gorjajeva skaitīšanas kamerā. Priekšmetstiklu ievieto Leitz mikroskopā. Izskaita dzīvās šūnas hemocitometra rūtotajā daļā (9 lielajos kvadrātos), izmantojot objektīvu ar 10X palielinājumu. Precīzākam rezultātam, šūnu skaitu nosaka vismaz 3 dažādās vietās. Aprēķina šūnu skaitu vienā mililitrā, izmantojot formulu:

$$\frac{\text{vid. šūnu skaits} \times \text{atšķaidījums} \times 250000}{\text{kvadrātu skaits}} = \text{šūnu skaits/ml}$$

#### 2.2.5. Segstikliņu pārklāšana ar polilizīnu

Pagatavo polilizīna šķīdumu, sajaucot poli-L-lizīnu ar destilētu ūdeni (1:9).

Eksperimentam šūnu audzēšanai uz virsmas izmanto 18x18 mm segstikliņus, kurus vispirms attīra siltā ūdenī, tad destilētā ūdenī un ievieto vārglāzē 96% etanolā. Vārglāzi ar segstikliņiem pārnes uz laminārās gaisa plūsmas skapi, kur, izmantojot sterilu pinceti, segstikliņus nožāvē spirta lampiņas liesmā un izkārto petri platēs. Uz stikliņiem lej polilizīna šķīdumu.

Pēc stundas šķīdumu atsūc, stikliņus mazgā ar sterilu ūdeni un nožāvē. Kad stikliņi nožuvuši, tos ievieto 6 bedrīšu platē.

## 2.2.6. Transfekcija ar lipofektamīnu

Transfekciju veic šādiem plazmīdu paraugiem:

1. YFP-ORAI1
2. STIM1–CFP
3. CFP–STIM1
4. YFP-ORAI1 + STIM1–CFP
5. YFP-ORAI1 + CFP–STIM1
6. Pēdējā eksperimentā tika izmantota arī vienkāršu CFP un YFP fluorescento proteīnu kodējošo plazmīdu maisījums (negatīvā FRET kontrole), kā arī plazmīda, kas ekspresē CFP un YFP, kas izvietoti vienā proteīnā (pozitīvā FRET kontrole). Visi darbā izmantotie plazmīdu konstrukti iegūti no Dr. Rainera Šindla (Lincas Keplera universitāte, Austrija) speciāli konkrētās FRET sistēmas aprobācijai un izmantoti ar Dr. Šindla laipnu atļauju.

Transfekcija tiek veikta, kad šūnas ir sasniegušas aptuveni 70% konfluenci. Izmanto sešu bedrīšu plates, kur katrā bedrītē ievietots sterils ar polilizīnu apstrādāts segstikliņš. Katrā plates bedrītē pievieno 2 ml šūnu suspensijas ar koncentrāciju  $60 \times 10^4$  šūnu/bedrītē. Plati ievieto inkubatorā 37°C, 5% CO<sub>2</sub> un kultivē 2 dienas.

### Lipofektamīna transfekcija

Katrā bedrītē pievieno 2,5 μg DNS, 2,5 μl Plus Reagent, 5 μl Lipofectamine LTX un 0,5 ml DMEM bez seruma.

Katram DNS paraugam sajauc 250 μl serumu nesaturošas DMEM ar 2,5 μl Plus Reagent un pievieno 2,5 μg DNS (aprēķina pēc plazmīdu koncentrācijas ūdens šķīdumā).

5 μl Lipofektamīna sajauc ar 250 μl serumu nesaturošas DMEM, inkubē 5 min istabas temperatūrā.

Sagatavoto Lipofektamīna un DMEM šķīdumu pievieno DNS šķīdumam. Inkubē 30 min.

No šūnu kultivēšanas plates atsūc barotni, šūnas mazgā ar 2ml PBS un tad ar 2 ml serumu nesaturošas DMEM.

Šūnu kultūrai pievieno 0,5 ml DMEM un 0,5ml lipofektamīna-DNS kompleksa izveidoto šķīdumu. Inkubē 3 stundas 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Pēc 3 stundām nomaina šķīdumu katrā bedrītē ar 2ml serumu saturošas DMEM un inkubē 24 stundas 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.7.FRET

Attēli tika uzņemti ar plašā lauka (*wide-field*) fluorescentās mikroskopijas sistēmu, kam pievienotas divas Andor iXon Ultra EMCCD kameras. Sistēma pievienota Ti-U mikroskopam (Nikon) Eclipse Ti. Fluorescences avots Lambda DG-4 ar konkrēti FRET metodei atbilstošiem filtriem CFP un YFP fluoroforu ierosināšanai, bet pirms detekcijas kamerām novietots daļēji caurlaidīgs spogulis, kas cauri filtrē YFP izstarošanas spektru, novadot to uz vienu Andor kameru, bet CFP izstarošanas spektra gaismu atstaro uz otru Andor kameru. Atbilstošais filtrs būtiski samazina nevēlamu signālu pārneši starp kanāliem (*crosstalk*). Attēlu iegūšanai un konfokālās sistēmas kontrolēšanai tikai izmantota NIS Elements programma (NIKON). Attēlu uzņemšanai ekspozīcijas laiks dažādos eksperimentos 100-200 ms, kā arī koriģēta abu Andor kameru detekcijas jutība atbilstoši CFP un YFP fluorescences intensitātei. Lai novērstu *crosstalk* starp kanāliem, tika izveidots izlabots FRET attēls, aprēķinot fona troksni.

Piloteksperimentos plastikāta šūnu kultūru plātēs tika izmantots sākotnēji 40x objektīvs, savukārt, metodi uzlabojot un audzējot šūnas uz 0,17 mm bieziem segstikliņiem - , 100x eļļas imersijas objektīvs, kas būtiski uzlabo izšķirtspēju un novērš gaismas kropļojumus.

Transfēcētās HEK-293 šūnas audzē uz segstikliņiem 1-2 dienas. Priekšmetstiklam uzpilda 15 µl PBS. No 6 bedrīšu plates ar pinceti izņem segstikliņu, nomazgā PBS šķīdumā un uzliek uz PBS piliena ar šūnām uz leju. Sagatavoto paraugu ieliek mikroskopā, uz tā uzpilda eļļu un izvēlas eļļas imersijas objektīvu (100x). Šūnu fokusēšanai izmanto redzamās gaismas funkciju. Izmantojot epifluorescenci, redzes laukā atrod interesējošās šūnas. Tas tiek darīts tumšā telpā un procesā laikā vienlaikus izmanto ND4 un ND8 (*neutral density*) filtrus, lai minimalizētu fluoroforu fotoizbalošanu.

Datorprogrammā iestata parametrus – skanēšanas ātrumu 200ms. Paraugi tiek fotogrāfēti, izmantojot multikanālu attēlu fotogrāfēšanas funkciju. Donora, akceptora attēlu un FRET attēlu, kur abi proteīni mijiedarbojas. Attēli tiek saglabāti .nd formātā. Priekš *sensitized emission* FRET tika iegūti 3 attēli, kur 1) ierosina ar donora CFP spektru / mēra akceptora YFP spektru; 2) ierosina ar CFP / mēra CFP izstarošanu; 3) ierosina ar YFP spektru / mēra YFP spektra izstarošanu. Vispirms šo procesu veic kontroles šūnās, kurās ekspresēts tikai viens no fluoroforiem, lai šos mērījumus izmantotu kalibrācijai (*crosstalk* novērtēšanai).

No multikanālu CFP un YFP proteīnu faila izvelk atsevišķus donora-donora, donora-akceptora un akceptora-akceptora kanālus un saglabā kā atsevišķus failus, kas tālāk izmantojami FRET attēla aprēķināšanā. Paraugiem ar atsevišķi pievienoto CFP un YFP proteīnu izveido FRET attēlu (NIS Elements funkcija “Create FRET image”), atzīmējot *FRET*

*in donor* un *FRET in acceptor* konfigurācijas lauciņā “1”. Atzīmē ROI (intereses reģionu), kā arī fona intereses reģionu un abus izveidotos FRET attēlus saglabā. Programmā izvēlas komandu “FRET calibration”, pievieno tikko izveidotos donora un akceptora FRET attēlus. Tiek iegūti eksperimentam atbilstoši konfigurācijas FRET *crossstalk* raksturojošie koeficienti, kas programmā saglabājas kā noklusējums.

Lai veiktu interesējošos FRET mērījumus, katram multikanālu STIM1-ORAI1 mijiedarbības attēlam izvelk atsevišķus kanālus, tos saglabā. Sadaļā “Applications” izvēlas “Create FRET image from files” un izveido FRET attēlu, kam nosaka fona reģionu un šūnas intereses reģionu (ROI). Eksportē vidējo FRET vērtību (%) un analizē FRET vērtības pikseļu sadalījumu šūnā un to atbilstību normālsadalījumam.

### **2.2.8. Statistiskā analīze.**

Dati tika analizēti Graphpad Prism 7.0 datorprogrammā. Iegūtos datus vispirms novērtē ar vienfaktora dispersijas analīzi (ANOVA), kam seko Barleta un Brauna Forseta testi, lai noskaidrotu, vai datu sadalījums dažādās grupās ir būtiski atšķirīgs, no kā atkarīgs, vai jāizmanto parametrisku vai neparametrisku datu analīzi. Neparametrisku datu grafiskai attēlošanai jāņem vērā nevis vidējā vērtība, bet mediāna, ko atzīmē Options → Additional results → Descriptive statistics for each data set. Datorprogramma attiecīgi veic *Kruskal-Wallis* testu, kas izmantojams nesaistītiem un neparametriskiem datiem un salīdzina mediānas. Divu grupu salīdzināšanai izmanto *Mann-Whitney* testu. Statistiski būtisku atšķirību pieņem ja  $P < 0,05$ .

Veidojot grafiku, izvēlas mediānas funkciju (median with interquartile range).

Tā kā eksperimenta dati satur daudz mazas vērtības, dati tiek grafiski attēloti izmantojot logaritmisko skalu, šādi iegūstot lielāku soli starp vērtībām. Šādi ir uzskatāmāk redzama datu izkliede un iespējams novērtēt izlecošās vērtības.

Pirmajā eksperimentā dati analizēti arī ar hī kvadrāta metodi, lai noteiktu atšķirības starp vērtību grupām.

### 3. REZULTĀTI UN DISKUSIJA

FRET sistēmas aprobācijai tikai veikti trīs eksperimenti, kas ietvēra CRAC jonu kanālu pētījumus. Lai novērtētu fizisku CRAC jonu kanāla komponentu STIM1 un ORAI1 proteīnu mijiedarbību dzīvās HEK 293 šūnās, izmanto ar fluorescentu proteīnu saistītu STIM1 un ORAI1. Tika izmantoti divi STIM1 proteīni attiecīgi ar fluorescento CFP (donora) iezīmi C vai N galā un ORAI1 ar YFP (akceptora) iezīmi N galā.

STIM1 proteīns ar fluorescento iezīmi C galā veido klasterus un mijiedarbojas ar ORAI1. Šūnai atrodoties miera stāvoklī FRET vērtības M. Muik (2008) eksperimentā ir zemas. Pievienojot tapsigargīnu (TG), tiek izsaukta ET kalcija krātuves iztukšošanās, kas savukārt inducē STIM1 un ORAI1 klasterizēšanos, saistīšanos un kanāla veidošanu. STIM1-ORAI1 klasteri izveidojas 4 min laikā. 8 min pēc TG pievienošanas, FRET vērtība ir visaugstākā. Šajā laikā STIM1-ORAI1 aktivēšana ietver vairākus etapus:  $Ca^{2+}$  izplūšana no ET, STIM1 oligomerizēšanās, STIM1-ORAI1 mijiedarbība un ORAI1 kompleksa veidošanās (Muik *et al.* 2008).

Visi STIM1 proteīni ir reakcijā ar YFP-ORAI1 proteīnu, taču lai vienkāršotu rezultātu attaisnošanu, datu attēlos minēts tikai konkrētais STIM1 proteīns ar sajūgto fluorescento proteīnu un TG klātbūtni maisījumā, nepieminot YFP-ORAI1.

#### 3.1. Piloteksperimenti

Pirms trim pamateksperimentiem (aprakstīti 3.2., 3.3., un 3.4. nodaļā) tika veikti vairāki piloteksperimenti ar šūnām, kas audzētas 6 bedrīšu platēs. Plates biezums ir 1,2 mm, kas ļauj izmantot maksimāli 40x palielinājuma objektīvu bez eļļas imersijas. Piloteksperimenti veikti, lai novērtētu plazmīdu konstruktu ekspresiju un fluorescences intensitāti, optimizējot FRET sistēmas un programmas iestatījumus fluorescences detektēšanai. Par visoptimālāko atzīts ekspozīcijas laiks 200ms un detekcijas jutības iestatīšana attiecībā 10 pret 100 (attiecīgi YFP/CFP detektējošajām kamerām), lai spilgtāko YFP intensitāti pielīdzinātu CFP vājākajai fluorescences intensitātei, tādējādi izvairoties no tā, ka viens no fluoroforiem attēlā ir pārāk spilgts.

#### 3.2. Pirmais eksperiments

Pirmais pētījums tiek veikts izmantojot eļļas imersijas objektīvu un transficētas HEK 293 šūnas, kas audzētas uz ar polilizīnu apstrādātiem segstikliņiem.

Iegūtie attēli ir ar zemu fluorescences intensitāti, tādēļ FRET vērtības ir pārsvarā zemākas nekā bija gaidīts. Kruskala Vallisa tests uzrāda būtisku atšķirību starp četrām galvenajām datu grupām ( $p < 0.0001$ ). Lai analizētu rezultātus, dati tiek sadalīti grupās ar FRET vērtības desmitkāšu atšķirību (2.tabula). No 0,0001 līdz 0,1 ietvertie dati uzskatāmi par ļoti zemu vērtību grupu, savukārt 0,1 -100 grupā šūnas, kurās FRET efekts ir relatīvi augsts šī eksperimenta iegūto vērtību kontekstā. Vislielākais augsto vērtību īpatsvars ir STIM1-CFP+YFP-ORAI1 ar TG (82%), liecinot, ka STIM1 un ORAI1 proteīni ir mijiedarbojušies kalcija deficīta rezultātā, izveidojot kalcija jonu kanālu. Tā kā pārējiem paraugiem vērtības pārsvarā ir mazas (0.0001-0.1), kā papildanalīze to salīdzināšanai tiek izmantots hī kvadrāts. Tā ir kvalitatīvās analīzes metode, kas tiek lietota, lai noteiktu vai starp datu grupām ir atšķirības datu izklaidē. Skaitliskās vērtības starp grupām var būt līdzīgas, tomēr būtiski, ja izklaidē ir atšķirīga. Metode ļauj manīt atšķirību arī starp datiem, kur ir zemas FRET vērtības. Hī kvadrāts norāda, ka starp STIM-CFP ar un bez TG pastāv būtiska atšķirība ( $p < 0.0001$ ).

2..tabula.

**Fluorescento proteīnu vidējo FRET vērtību skaits (%) grupās**

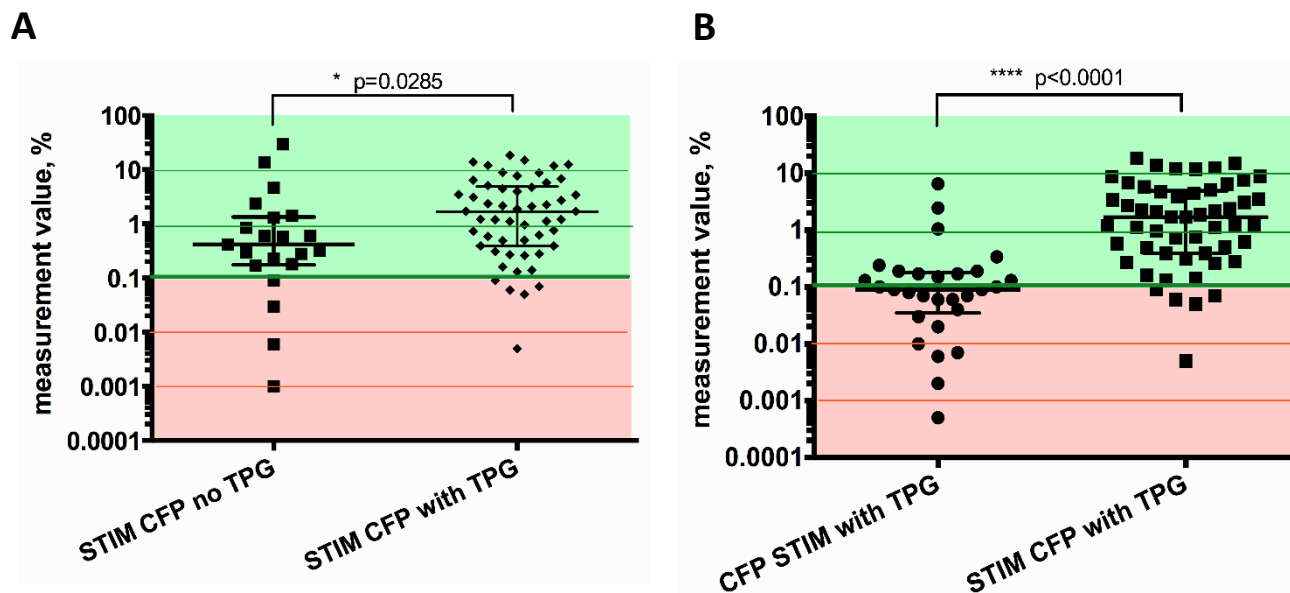
Table 2

**Distribution of mean FRET efficiency (%) by different fluorescent protein coupling**

	<0.01	0.01 – 0.09	0.1 – 0.9	1.0 – 9.0	>10	Kopā
STIM1-CFP+YFP-ORAI1 bez TG	2 (9%)	3(14%)	11(50%)	4(18%)	2(9%)	22
STIM1-CFP+YFP-ORAI1 ar TG	1(2%)	4(8%)	16(30%)	26(49%)	6(11%)	53
CFP-STIM1 +YFP-ORAI1 ar TG	2(7%)	13(45%)	11(38%)	3(10%)	0(0%)	29
CFP-STIM1 +YFP-ORAI1 bez TG	4(21%)	6(32%)	5(26%)	4(21%)	0(0%)	18

Divu grupu salīdzināšanai izmantots neparametriskiem datiem atbilstošs Mana Vitneja tests, kas parāda, ka starp STIM1-CFP+YFP-ORAI1 bez TG un STIM1-CFP+YFP-ORAI1 ar TG pastāv būtiska atšķirība ( $p=0.0285$ ) (7. attēls A). Arī starp kontroles (CFP-STIM1+YFP-ORAI1) ar TG un STIM1-CFP+YFP-ORAI1 ar TG paraugiem novērojama būtiska atšķirība ( $p < 0.0001$ ) (7. attēls, B). Tā kā STIM1 N gals atrodas ET lumenā un tieši nesaistās ar ORAI1

proteīnu, FRET efekts CFP-STIM1+YFP-ORAI1 netiek neovērots un tiek uzskatīts par kontroli FRET eksperimentos (Muik *et al.* 2008). M. Muik (2008) veiktajos kontroles eksperimentos FRET netiek novērots, ko izskaidro fluorescēto iezīmju lokalizācija (YFP-ORAI1 atrodas citosolā, savukārt CFP-ORAI1 ET lumenā).



7. attēls **A** STIM1-CFP+ YFP-ORAI1 ar un bez TG **B** CFP-STIM1+YFP-ORAI1 (kontrolē) ar TG un STIM1-CFP+YFP-ORAI1 ar TG. Sarkanajā laukumā zemas FRET efektivitātes vērtības (0.0001-0.1 %), zaļajā relatīvi augstas FRET efektivitātes vērtības (0.1 – 100%)

Figure 7 **A** STIM1-CFP+YFP=ORAI1 with and without thapsigargin (TG) **B** CFP-STIM1+YFP-ORAI1 (control) with TG and STIM1-CFP+YFP-ORAI1 with TG. Low FRET values in the red area (0.0001-0.1 %), relatively high FRET values in the green area (0.1 – 100 %)

Salīdzinot abus STIM1 variantus bez TG ietekmes, Manna Vitneja tests uzrāda statistiski būtisku atšķirību ( $p=0.0468$ ), tomēr balstoties uz literatūras datiem (Muik *et al.* 2008) un tuvu robežu būtiskuma līmenim ( $p<0.05$ ), atšķirība tiek apšaubīta un izskatīta turpmākos eksperimentos.

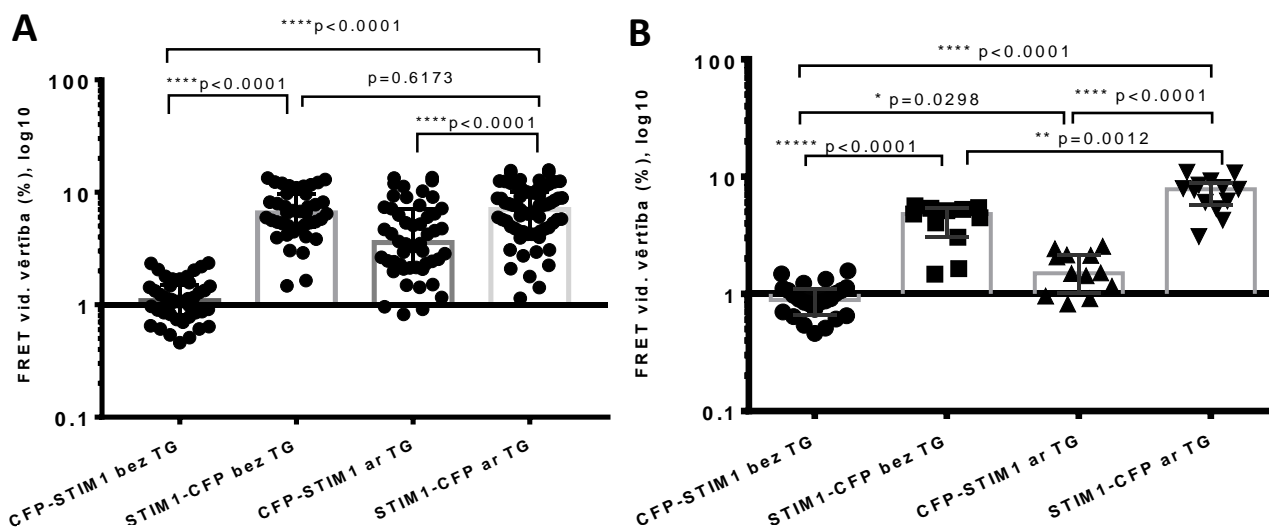
Ar konkrēto metodoloģijas pieeju ir iespējams konstatēt atšķirības paraugos, tomēr FRET signāls ir vājš, FRET vērtības pārsvarā ļoti zemas. Nepieciešams uzlabot fluorescences intensitāti. Personiskā komunikācijā ar FRET ekspertu no Lincas Johanna Keplera universitātes Austrijā Dr. Raineru Šindlu, tiek konstatēts, ka zema FRET vērtība rodas ilgas šūnu apstarpes dēļ, kā rezultātā fluorofori izbalē pirms mērījumu veikšanas. Tiek pieņemts lēmums, ka ir nepieciešams rast risinājumu kā minimizēt šūnu apstarpes ilgumu un fluorescentās gaismas intensitāti šūnu fokusēšanas laikā, lai izvairītos no fluoroforu izbalēšanas.

### 3.3. Otrais eksperiments

Otrajā eksperimentā šūnu fokusēšanas laikā tika izmantoti neitrālā blīvuma (pelēkie) ND4 un ND8 optiskie filtri, kas, izmantojot vienlaikus, caurejošās gaismas intensitāti samazina 32 reizes, šādi samazinot fluoroforu izbalēšanu. Arī fokusēšanas laiks bija mazāks, vidēji 3 – 5 s katrai šūnai. Tādējādi FRET mērījumos tika iegūtas stipri augstākas FRET vērtības, kas atbilst publikācijās sastopamajam parasti iegūtajam FRET vērtību intervālam.

Iegūtajos rezultātos konstatēts, ka starp STIM-CFP+YFP-ORAI1 ar un bez TG nav būtiskas atšķirības ( $p=0.6173$ ) (8.attēls). Pēc rezultātiem var spriest, ka TG klātbūtne STIM1-CFP+YFP-ORAI1 kompleksa veidošanos neietekmē, tomēr tas ir pretrunā ar iepriekš literatūrā apskatīto (Muik *et al.* 2008; Park *et al.* 2009; Liou *et al.* 2007, Ong *et al.* 2007, Covington *et al.* 2010, Fukushima *et al.* 2012 cit. pēc Prakriya and Lewis 2015), kā arī pirmajā eksperimentā iegūtajiem datiem. Veicot otrā eksperimenta paraugu fotogrāfēšanu,

konstatēts sliktas kvalitātes, vājš YFP signāls un liels fona troksnis CFP spektra kanālā, kas redzams arī ap šūnām FRET efektivitātes pikseļu attēlā. Ap šūnām fona troksnis, kas



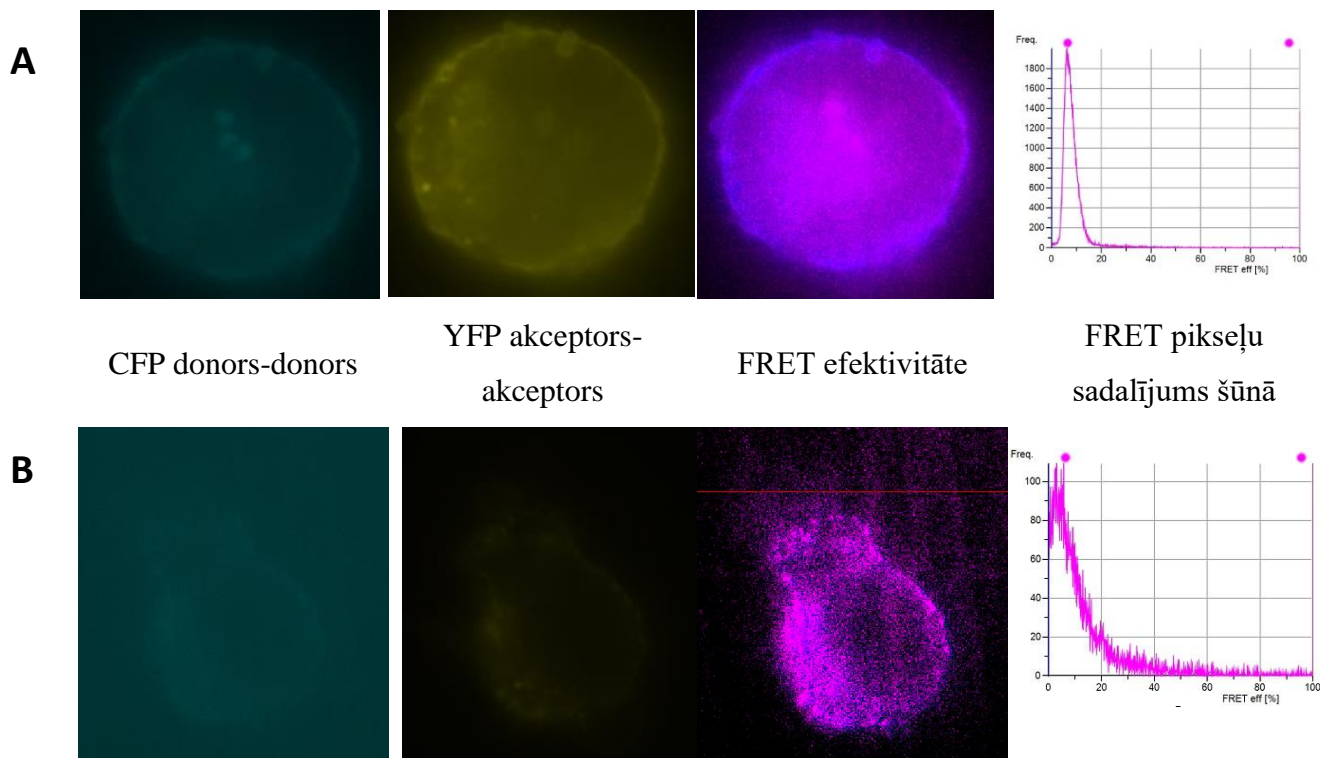
8. attēls Otrā FRET eksperimenta sākotnējie rezultāti. STIM1 proteīnu ar un bez tapsigargīna (TG) vidējo FRET vērtību (%) izkliede. Atšķirību salīdzinājums starp grupām, par statistiski būtisku atšķirību pieņemot  $p < 0.05$ . **A** Dati pirms pārbaudes normālsadalījumam. **B** Dati, kas satur šūnas, kuru FRET pikseļu sastopamības biežuma atbilst normālsadalījumam

Figure 8. The initial results of experiment number two. Mean FRET efficiency (%) distribution of STIM1 proteins with and without thapsigargin (TG). Comparison of differences between groups, considering statistically significant difference  $p < 0.05$ . **A** Data before testing for normal distribution **B** Data containing only cells which have FRET pixel frequency according to normal distribution

iespējams radies no tuvumā esošajām šūnām, kas nav fokusā, bet izstaro fluorescenci, radot viltus CFP pikseļus pētāmajai šūnai. Izvērtējot fluoroforu attiecību šūnā, intensitātes atšķirība

netiek atzīta par problēmas limitējošo faktoru, jo pieļaujamā attiecība atbilst literatūrā minētajai (Berney and Danuser 2003).

Pēc Dr. Rainera Šindla ieteikumiem katras šūnas iegūtās FRET vērtības tiek vēlreiz pārskatītas un atlasītas tikai tās šūnas, kurās dažādas intensitātes FRET pikseļu sastopamības biežums atbilst Gausa sadalījumam (9. attēls) (Muik *et al.* 2008). Par nekvalitatīviem tiek uzskatīti dati, kas neatbilst šai histogrammai, un konkrētie dati tiek izņemti no turpmākas analīzes. Atbilstošs pikseļu sadalījums konstatēts šūnām, kurās ir labs kontrasts starp fonu un šūnas fluorescenci.



9. attēls Attēla kvalitāte un šūnu atlasīšana, balstoties uz FRET pikseļu vērtību sadalījumu šūnā. Violetie pikseļi norāda, ka FRET ir tuvu nullei, savukārt zilie, ka FRET efekts attiecīgajā vietā ir noticis. **A** šūna, kuras FRET pikseļi atbilst Gausa sadalījumam. **B** šūna, kurai redzami fona trokšņi FRET attēlā, kā arī FRET pikseļu sadalījums neatbilst Gausa sadalījumam.

Figure 9 Quality of the picture and selection of cells based on FRET pixel distribution in cell. Purple pixels shows no FRET signal, while blue pixels shows FRET in exact place in the cell **A** Cell, of which FRET pixels fits Gaussian distribution. **B** Cell, which has background noise in FRET picture, and also FRET pixels don't fit Gaussian distribution.

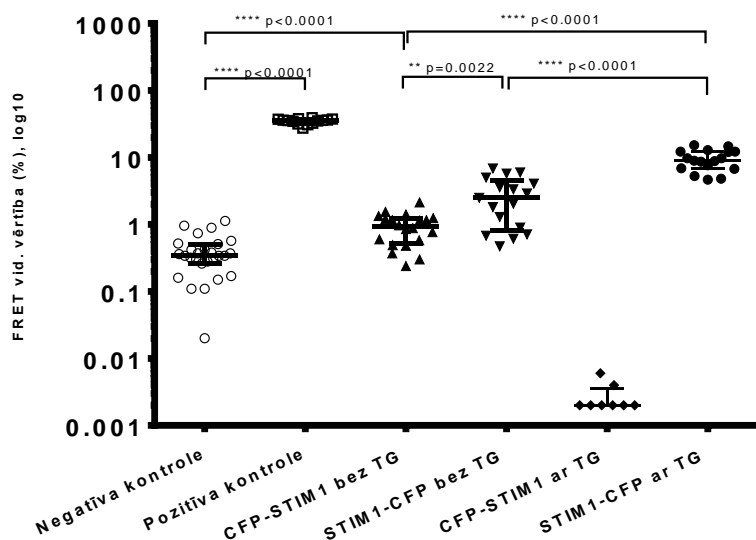
Rezultātā starp STIM1-CFP+YFP-ORAI1 ar un bez TG ir redzama būtiska atšķirība ( $p=0.012$ ). STIM1-CFP+YFP-ORAI1 bez TG FRET vērtība vēl joprojām ir salīdzinoši augsta (FRET vidējās vērtības mediāna ir 4,79). Šo parādību izskaidro STIM1 molekulas īpatnība, ka bieži vien sastopama STIM1 proteīnu klasterizēšanās bez TG klātbūtnes vai arī kalcija jonu

koncentrācijas samazināšanos endoplazmatiskajā tīklā izraisījis kāds cits faktors. Šāda klasterizēšanās palielina iespēju veidot kontaktu ar ORAI1, radot FRET efektu (Berney and Danuser 2003).

### 3.4. Trešais eksperiments

Pirmajos divos eksperimentos pierādīts, ka ND filtru izmantošana šūnu apstarošanas laikā, kā arī FRET pikseļu izvērtēšana normālsadalījumam uzlabo datu kvalitāti un ticamību. Šajā eksperimentā papildus iepriekš izmantotajiem plazmīdu DNS konstruktiem, tika izmantota negatīvās un pozitīvās kontroles plazmīdas, kas tika iegūtas no Dr. Rainera Šindla pētniecības grupas.

Negatīvā kontrole ir divas plazmīdas, kas attiecīgi ekspresē brīvi peldošus CFP un YFP proteīnus, kam nav ciešas mijiedarbības, tie atrodas vairāk kā 10 nm lielā attālumā, tāpēc starp tiem nav jānotiek FRET. Pozitīvā kontrole ir no plazmīdas ekspresēts rekombinants proteīns,



10.attēls Trešā FRET eksperimenta rezultāti. Pozitīvās, negatīvās kontroles un STIM1 proteīnu ar un bez tapsigargīna (TG) vidējo FRET vērtību (%) izkliede. Atšķirību salīdzinājums starp grupām, par statistiski būtisku atšķirību pieņemot  $p < 0.05$ .

Figure 10 Results of third experiment. Distribution of mean FRET value (%) for positive, negative controls and STIM1 protein with and without thapsigargin (TG). Comparison of differences between groups, considering statistically significant difference  $p < 0.05$ .

kam N galā ir YFP fluorescentā proteīna daļa, bet C galā CFP, bet starp abiem galiem savienojošais (*linker*) peptīds. Tā kā šajā konstruktā fluoroforu attiecība ir nemainīga (1:1), un fluorofori atrodas mazāk kā 10 nm attālumā, tie nepārtraukti citosolā veido FRET signālu. Iepriekš veiktos eksperimentos pierādīts, ka fluoroforu attiecībai

(CFP:YFP) optimāli jābūt 1:10, bet FRET vērtības ticamības intervāls ir no 1:1 līdz pat 1:100 (Barney and Danuser 2003).

Abas kontroles norāda maksimālo un minimālo iegūstamo FRET vērtību. Eksperimentā maksimālais FRET vērtības lielums (kā pozitīvajai

kontrolei – vidēji FRET vērtība 34,85 %) nav sasniedzams, jo jonu kanāla kompleksā STIM un ORAI1 fluorescentie proteīni atrodas tālāk viens no otra, nekā fluorofori kontroles proteīnā.

CFP-STIM1+YFP-ORAI1 ar TG vērtība ir tuvu 0 (FRET vidējā vērtība 0,0027%), ko varētu izskaidrot ar nepieciešamību veikt izmaiņas CFP spektra uztverošās kameras jutībai eksperimenta laikā, tādējādi mazinot fona troksni CFP kanālā.

STIM1-CFP + YFP-ORAI1 bez TG uzrāda būtisku atšķirību ar CFP-STIM1+YFP-ORAI1 ( $p=0.0022$ ) (10. attēls), ko izskaidro STIM klasterizēšanās arī bez TG vai kalcija deficīta šūnā (Muik *et al.* 2008). STIM1 klasteri nejauši saistoties ar ORAI1, tomēr to iespējams detektēt STIM1-CFP gadījumā, kad fluorescentie proteīni atrodas mazāk nekā 10 nm attālumā. STIM1 nejauša klasterizēšanās palielina viltus FRET varbūtību. Tomēr ņemot vērā maisījumu bez TG ar tā paša veida maisījuma FRET vērtību TG klātbūtnē, var secināt, ka TG būtiski palielina STIM saistīšanās varbūtību ar ORAI1, veidojot kalcija jonu kanālu. Eksperimenta grupu aprakstošie dati pieejami 2. pielikumā.

## SECINĀJUMI

- Pirms eksperimentu veikšanas, jāveic optimizācijas eksperimenti, lai noteiktu mikroskopa un detekcijas kameru optimālos iestatījumus
- Pirms FRET mērījumu veikšanas šūnu apstarošanas laikā jāizmanto ND (natural density) filtri, lai mazinātu fluoroforu izbalēšanu un eksperimenta kvalitātes krišanos
- Uzticamai rezultātu iegūšanai, jāizvēlas šūnu attēli, kuros FRET pikseļu vērtība atbilst normālsadalījumam
- Eksperimentā vēlams iekļaut pozitīvo un negatīvo fluoroforu kontroli, lai novērtētu FRET vērtību minimālo un maksimālo sliekšni
- Iegūtie dati ļauj secināt, ka šobrīd FRET sistēmas aprobācija ir pabeigta un Latvijā ir iespēja veikt sensitīvās emisijas FRET pētījumus dzīvās šūnās ar ORAI1 un STIM1 specifiskām mutācijām, konformācijas izmaiņām vai citu proteīnu mijiedarbību

## PATEICĪBAS

Izsaku pateicību Ph.D. Mārtiņam Kālim par darba vadīšanu;

A. Kirhenšteina Mikrobioloģijas un virusoloģijas institūtam par iespēju izstrādāt bakalaura darbu

Dr. Med. Šimonam Svirskim par darba recenzēšanu.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

Albert B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2008. *Molecular Biology of the cell*. Fifth edition. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group. 1725pp

Baba Y., Nishida K., Fujii Y., Hirano T., Hikida M., Kurosaki T. 2008. Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses. *Nat Immunol* 9(1): 81-88

Barr A. V., Bernot K. M., Shaffer H. M., Burkhardt K. J., Samelson E. L., 2009. Formation of STIM and ORAI complexes: puncta and distal caps. *Immunol Rev*. 231(1): 148 – 159

Berney C., Danuser G. 2003. FRET or no FRET: A quantitative comparison. *Biophysical Journal*. 84(6): 3992-4010

Berridge M. J., Bootman M. D., Roderick H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat.Rev. Mol. Cell Biol*. 4:e 517-529

Broussard J. A., Rappaz B., Webb D., J., Brown C. M. 2013. Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nature America*. 8(2): 265 – 281

Calloway N., Vig M., Kinet J. P., Holowka D., Baird B. 2009. Molecular clustering of STIM1 with ORAI1/CRACM1 at the plasma membrane depends dynamycally on depletion of Ca<sup>2+</sup> stores and on electrostatic interactions. *Mol Biol Cell*. 20(1): 389-99

Fahrner M., Derler I., Jardin I., Romanin C. 2013. The STIM1/ORAI1 signaling machinery. *Landes Bioscience* 7(5): 330-343

Feske S., Gwack Y., Prakriya M., Srikanth S., Puppel S., Tanasa B., Hogan P., Lewis R., Daly M., Rao A. 2006. A mutation in ORAI1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441(7090):179-185

Green R. M., Sambrook J. 2012. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Fourth edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press. 1890 pp

Gudlur A., Zhou Y., Hogan G., P. 2013. Chapter Two – STIM – ORAI interactions that control the CRAC channel. *Store-operated Calcium Channels*. 71: 33-58

Hogan G., P. 2015. The STIM1 – ORAI1 microdomain. *Cell Calcium*. 58(4): 357 – 367  
[http://www.embl.de/eamnet/downloads/modules/FRET\\_teaching\\_module.pdf](http://www.embl.de/eamnet/downloads/modules/FRET_teaching_module.pdf)

Inoue H., Nojima H., Okayama H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96(1): 23-28

Lakowicz R. J. 2010. Principles of fluorescence spectroscopy. Third edition. Maryland: Springer. 923 pp

Lewis S. R. 2011. Store-operated calcium channels: new perspectives on mechanism and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: 1-26

Liou J., Kim M. L., Heo W. D., Jones J. T., Myers J. W., Ferrell J. E. Jr., Meyer T. 2005. STIM is a  $Ca^{2+}$  sensor essential for  $Ca^{2+}$ -store-depletion-triggered  $Ca^{2+}$  influx. *Curr Biol*. 15(13): 1235-41

Luik R., Wu M., Buchanan J., Lewis R. 2006. The elementary unit of store-operated  $Ca^{2+}$  entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* 174(6): 815-825

McCarl C. A., Picard C., Khalil S., Kawasaki T., Rother J., Papolos A., Kutok J., Hivroz C., Ledest F., Plogmann K., Ehl S., Notheis G., Albert M. H., Belohradsky B. H., Kirschner J., Rao A., Fischer A., Feske S. 2009. ORAI1 deficiency and lack of store-operated  $Ca^{2+}$  entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol*. 124(6): 1311-1318

Mercer J., Dehaven W., Smyth J., Wedel B., Boyles R., Bird G., Putney J. 2006. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of OrAI1 or ORAI2 with the intracellular calcium sensor, STIM1. *J Biol Chem* 281(34): 24979-24990

Muik M., Frischauf I., Derler I., Fahrner M., Bergsmann J., Eder P., Schindl R., Hesch C., Polzinger B, Fritsch R., Kahr H., Madl J., Gruber H., Groschner K., Romanin C. 2008. Dynamic Coupling of the Putative Coiled-coil Domain of ORAI1 with STIM1 Mediates ORAI1 Channel Activation. *Jou. Biol. Ch.* 283(12): 8014 – 8022

Palty R., Isacoff E. Y. 2016. Cooperative binding of Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) to the N and C Termini of Calcium Release-activated Calcium Modulator1 (ORAI1). *J Biol Chem*. 291(1): 334 – 341

Park C. Y, Hoover P. J., Mullins F. M., Bachhawat P., Covington E. D., Raunser S., Walz T., Garcia K. C., Dolmetsch R. E., Lewis R. S. 2009. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to ORAI1. *Cell* 136(5): 876-890

Prakriya M., Lewis S. R. 2015. Store-operated Calcium Channels. *Physiol. Rev* 95: 1383 – 1436

Sampieri A., Zepeda A., Asanov A., Vaca. 2009. Visualizing the store-operated channel complex assembly in real time: identification of SERCA2 as a new member. *Cell Calcium* 45(5): 439 – 446

Selga T. 2008. Šūnu bioloģija. Rīga: Latvijas Universitātes Akadēmiskais apgāds. 344 lpp

Silfies S. J., Schwartz A., Davidson M. W. 2015. The diffraction barrier in optical microscopy. <http://www.microscopyu.com/articles/superresolution/diffractionbarrier.html>

Singh A., Hamedinger D., Hoda C. J., Gebhart M., Koschak A., Romanin C., Striessnig J. 2006. C-terminal modulator controls Ca<sup>2+</sup>-dependent gating of Cav1.4 L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 9(9): 1108-1116

Soboloff J., Spassova M. A., Tang X. D., Hewavitharana T., Xu W., Gill D. L. 2006. ORAI1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem.* 281(30): 20661–20665

Spiering D., Bravo-Cordero J. J., Moshefegh Y., Miskolci V., Hodgson L. 2013. Quantitative ratiometric imaging of FRET – Biosensors in living cells. *Methods Cell Biol.* 114:593-609

Wu M. M., Buchanan J., Luik R. M., Lewis R.S. 2006. Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol.* 174(6): 803–813

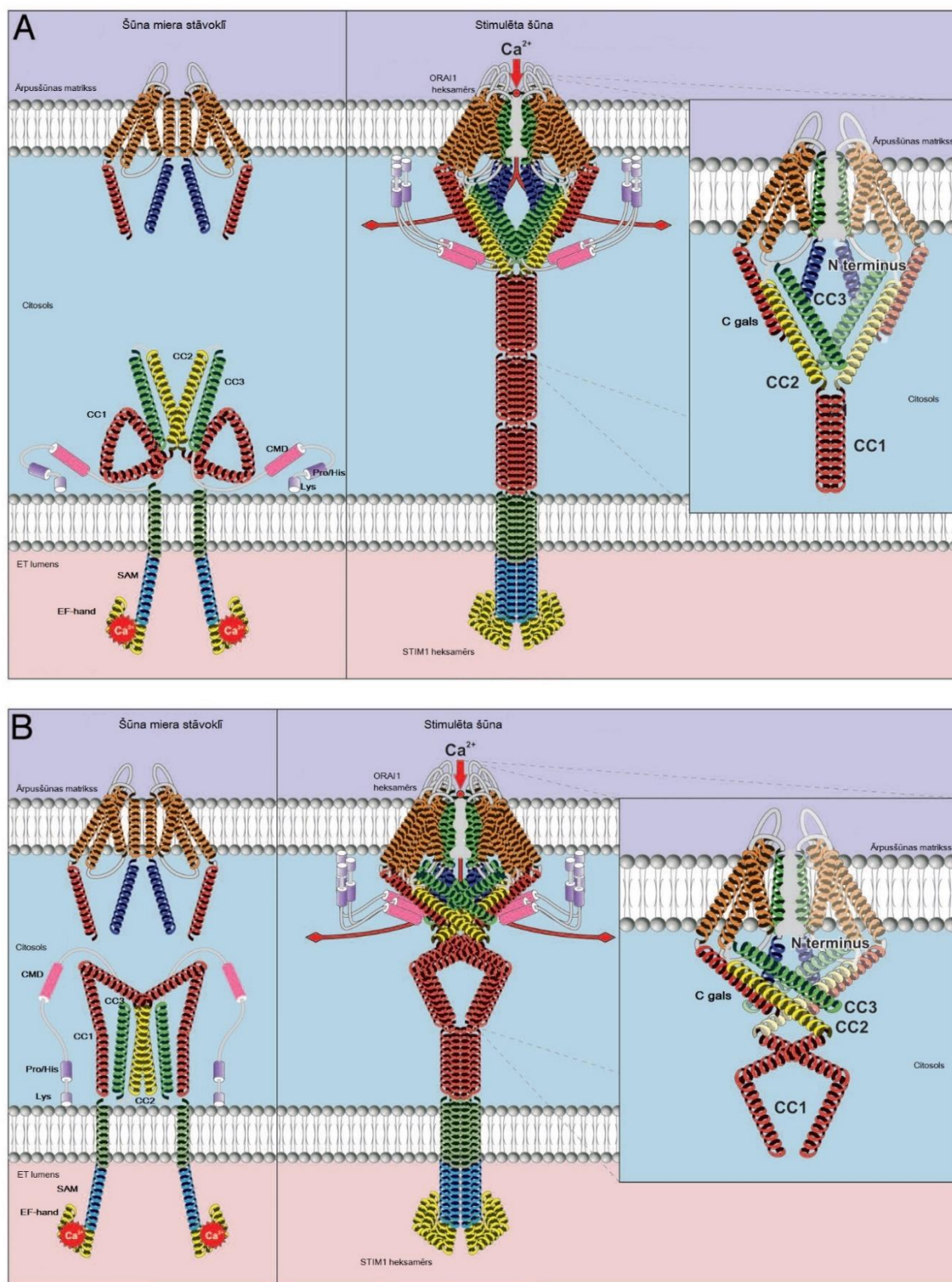
Xu P., Lu J., Li Z., Yu X., Chen L., Xu T. 2006. Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of ORAI1. *Biochem Biophys Res Commun* 350(4): 969-976

Zhang S. L., Yu Y., Roos J., Kozak J. A., Deerinck T. J., Ellisman M. H., Stauderman K. A., Cahalan M. D. 2005. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature.* 437(7060): 902–905

Zimmermann T., Terjung S. 2005. FRET basics and applications. An EAMNET teaching module. European Mol Biol Lab

## PIELIKUMI

STIM1-ORAI1 savienojumu modeļi (A un B), kas balstīti uz STIM1 konformāciju šūnai atrodoties miera stāvoklī.



Samazinoties koncentrācijai jonu krātuvē, STIM1 oligomerizējas. Procesu kontrolē CC1 domēns. CC2 un CC3 domēni ir iesaistīti savienojumā ar ORAI1 C un N galiem. (Pielāgots no Fahrner *et al.* 2013)

## 2. Pielikums

## Trešā FRET eksperimenta grupu aprakstošie dati

	Negatīva kontrole	Positīva kontrole	CFP-STIM1 bez TG	STIM1-CFP bez TG	CFP-STIM1 ar TG	STIM1-CFP ar TG
Šūnu skaits	27	14	20	17	8	17
Minimālā vērtība	0,02	27,4	0,24	0,47	0,002	4,65
25% vērtību robeža	0,26	32,26	0,5125	0,805	0,002	6,825
Mediāna	0,34	35,76	0,925	2,5	0,002	8,93
75% vērtību robeža	0,51	37,34	1,23	4,545	0,0035	12,2
Maksimālā vērtība	1,13	39,29	2,13	6,86	0,006	15,27
Vidējā vērtība	0,4019	34,85	0,9425	2,855	0,00275	9,483
Standartnovirze	0,2644	3,217	0,4799	2,082	0,001488	3,305

Bakalaura darbs „FRET sistēmas aprobācija CRAC jonu kanālu pētījumiem” izstrādāts  
LU Bioloģijas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie  
informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Laura Hippe

2016. gada 1. jūnijs

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: Ph.D. Mārtiņš Kālis

2016. gada 1. jūnijs

Recenzents: Ph. D. Med. Šimons Svirskis

Darbs iesniegts Molekulārās bioloģijas katedrā

Darbs aizstāvēts bakalaura gala pārbaudījuma komisijas sēdē

2016. gada 8. jūnijā