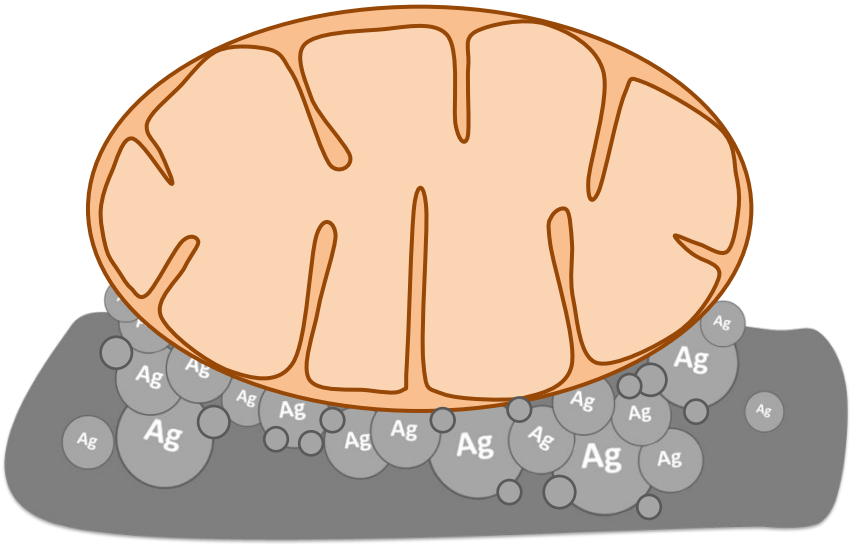
Как заглянуть в митохондрию с помощью наночастиц



Никельшпарг Эвелина Ильинична

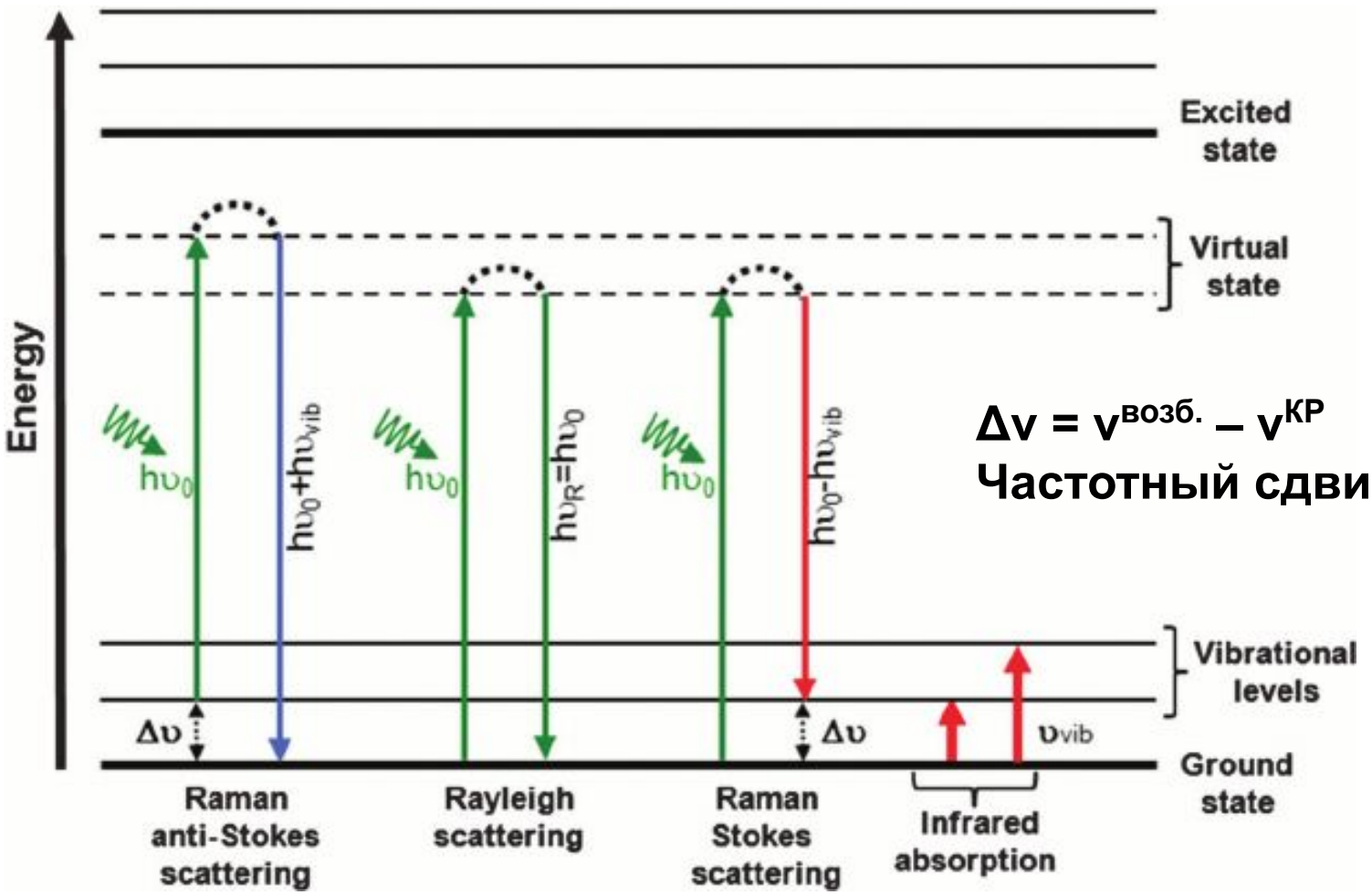
Кафедра биофизики биологического факультета МГУ

План доклада

1) Спектроскопия комбинационного рассеяния
2) Особенности гигантского комбинационного рассеяния
3) Типы наноструктур и примеры их применения
4) Наноструктуры мечты
5) Наноструктурированные поверхности: получение дальнодействующего усиления на примере изучения митохондрий

Комбинационное рассеяние (КР, или эффект Рамана)

– это неупругое рассеяние света на молекулах вещества с изменением частоты излучения



$\Delta\nu = \nu^{возб.} - \nu^{КР}$

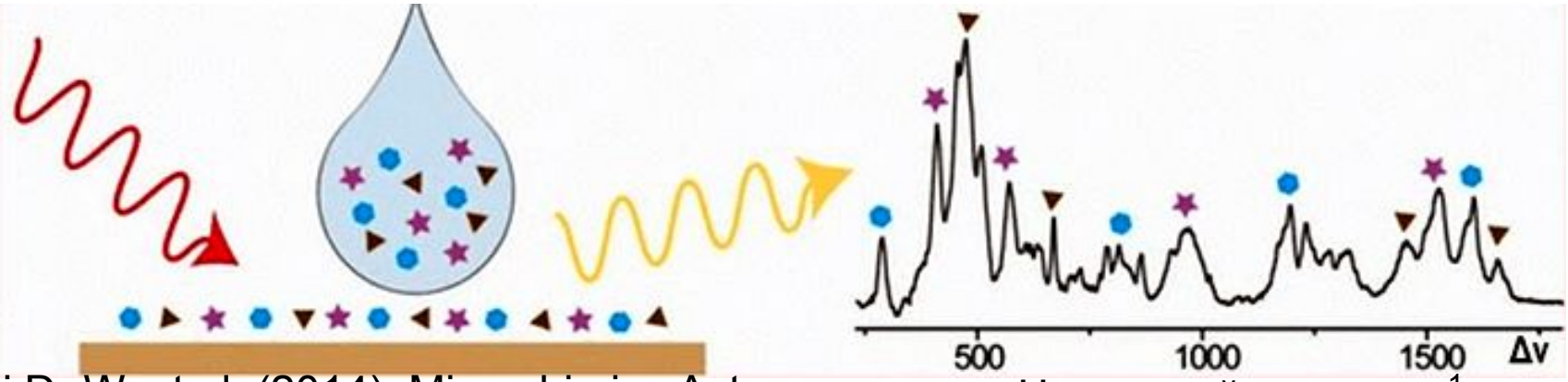
Частотный сдвиг, см$^{-1}$

M.J. Baker et al. (2015) Chem

Какую информацию извлекают из спектров КР

Спектр КР несет информацию о переходах между колебательными подуровнями, то есть о колебаниях атомов. Следовательно:

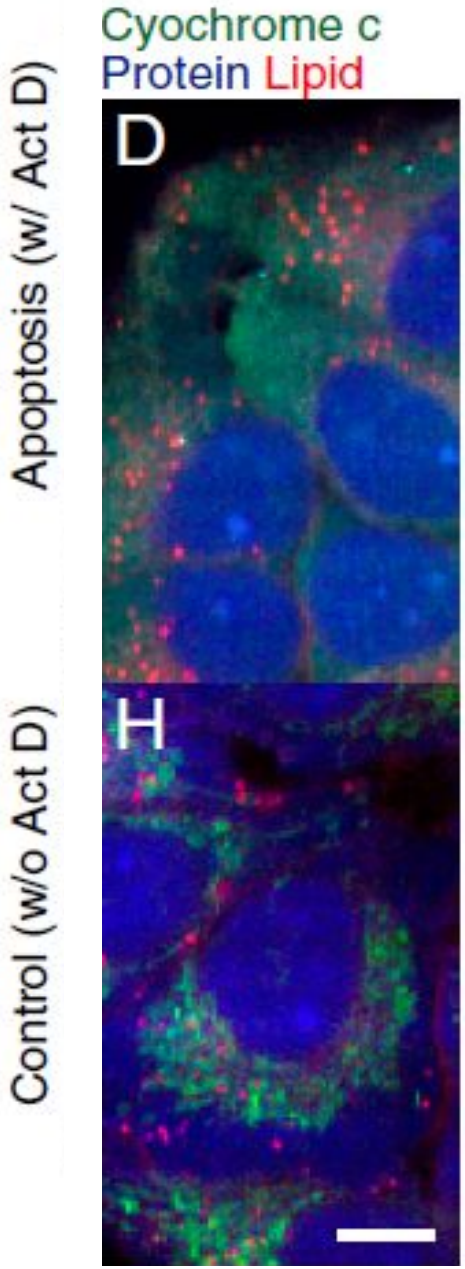
1) Каждому колебанию атомов в молекуле соответствует свой пик на спектре КР
2) КР уникален для каждой молекулы, т.е. представляет собой «молекулярные отпечатки»
3) По спектрам КР можно оценить конформационные перестройки в молекулах и изменения микроокружения групп атомов



Li D.-W. et al. (2014). Microchimica Acta

Частотный сдвиг, $см^{-1}$

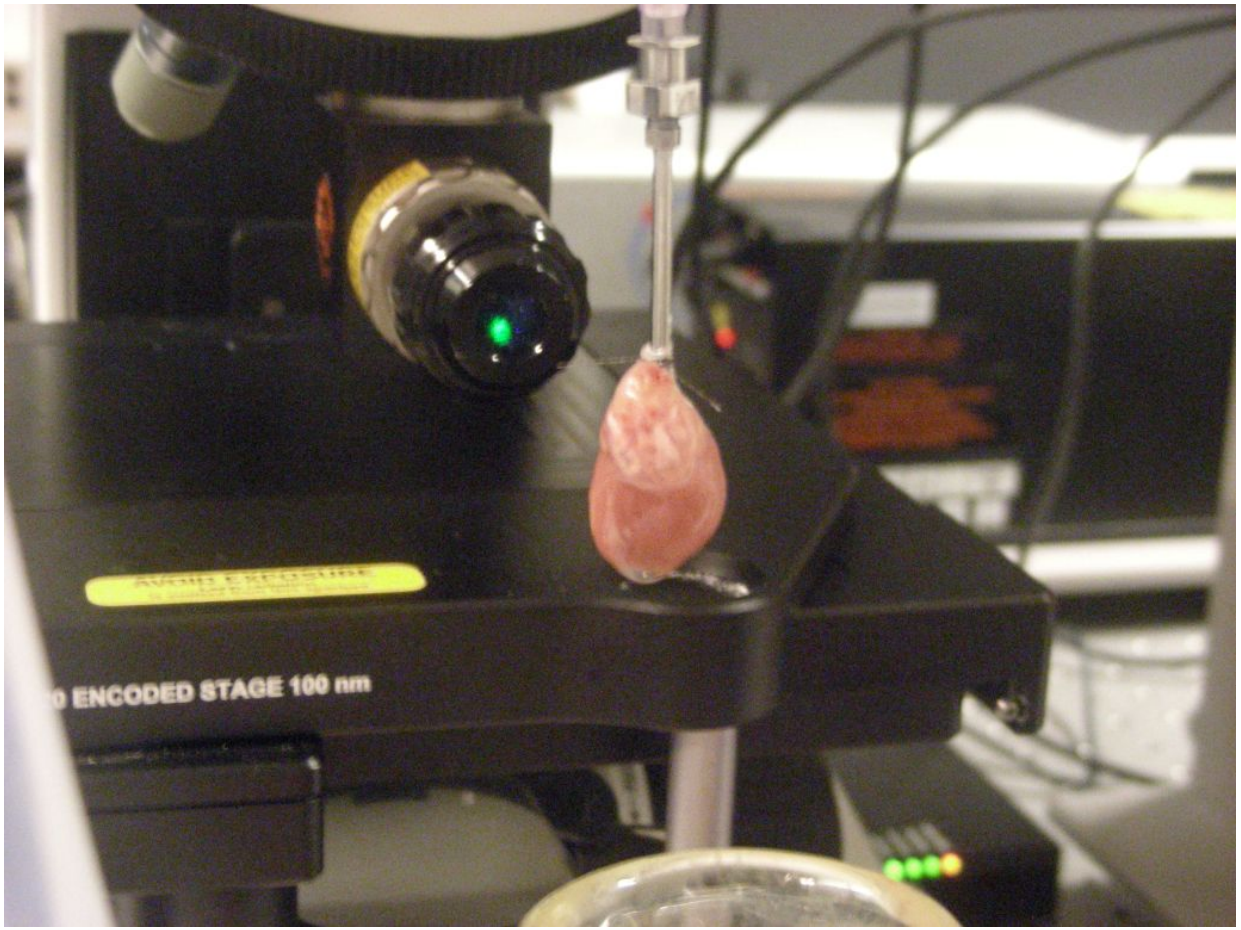
Возможности КР: картирование клеток label-free



КР-карта распределения веществ в клетке в псевдо-цвете в норме и при апоптозе: цитохром С, белки, липиды

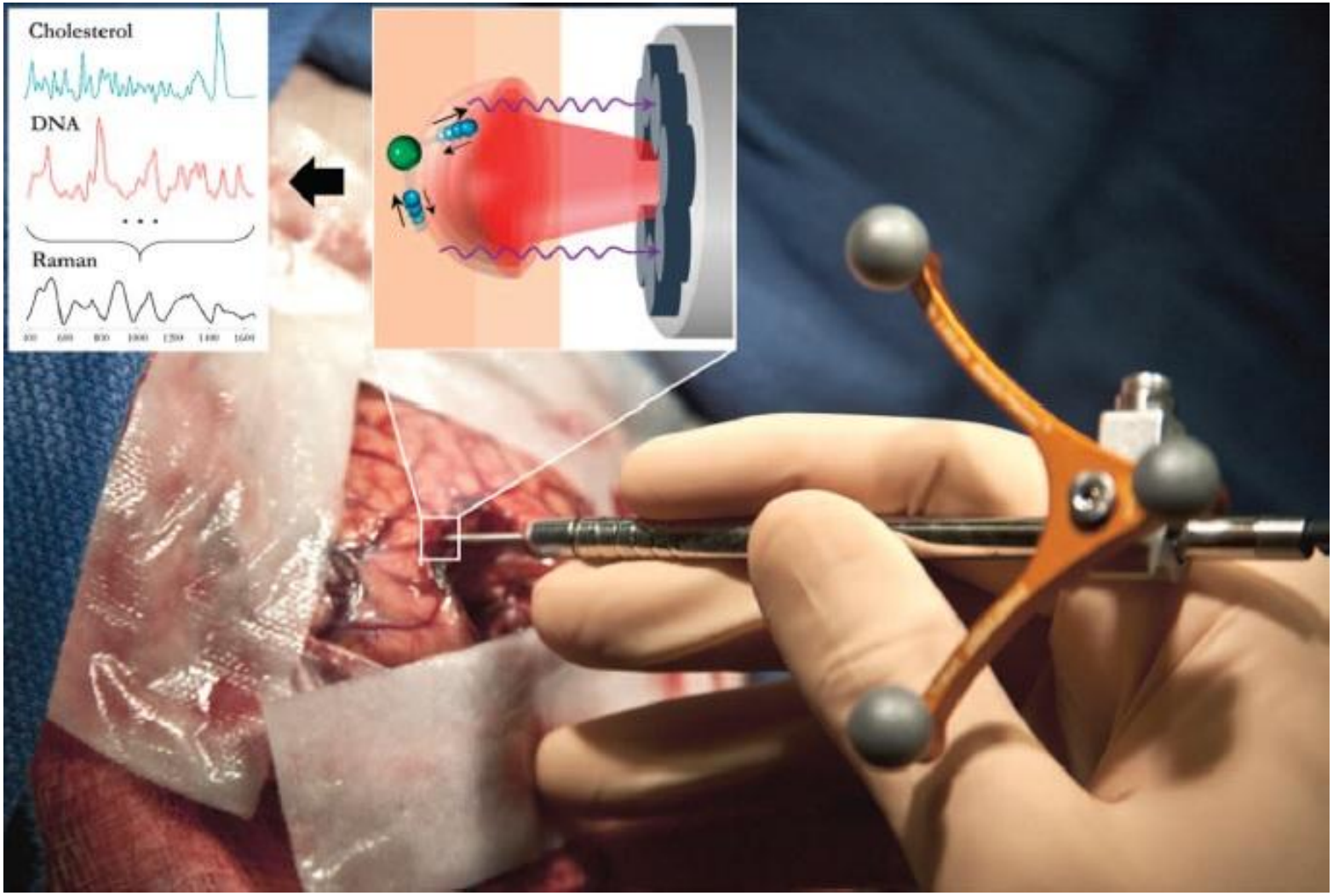
Okada et al., PNAS, 2012

КР позволяет исследовать молекулы даже в целых органах *ex vivo*



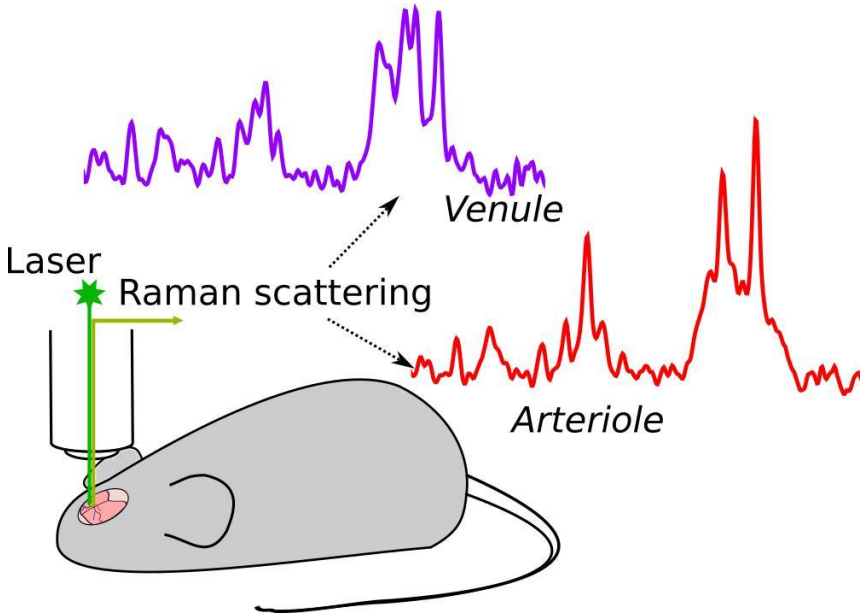
N.A. Brazhe et al., 2013

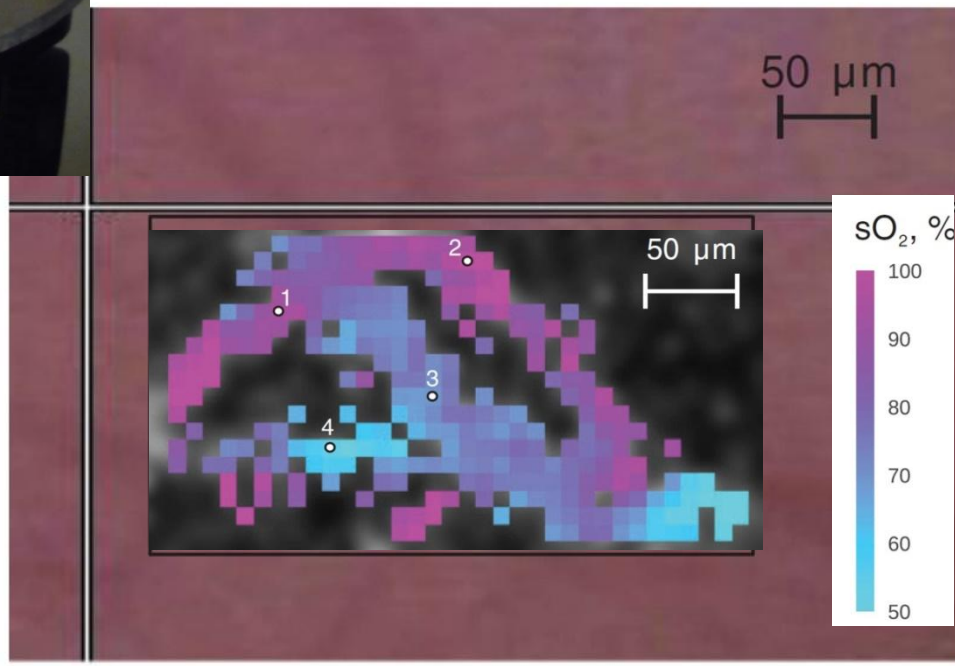
КР позволяет исследовать молекулы даже в целых органах *in situ*



M, Jermyn et al.

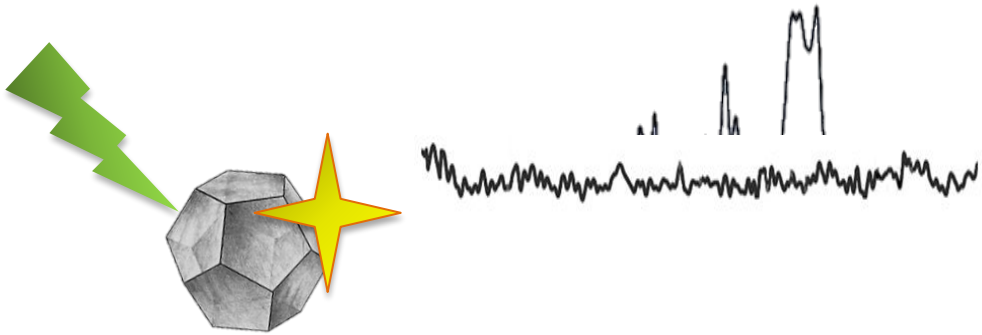
RENISHAW


Venule
Laser
Raman scattering
Arteriole


50 µm
50 µm
1
2
3
4
sO2, %
100
90
80
70
60
50

Brazhe et al.

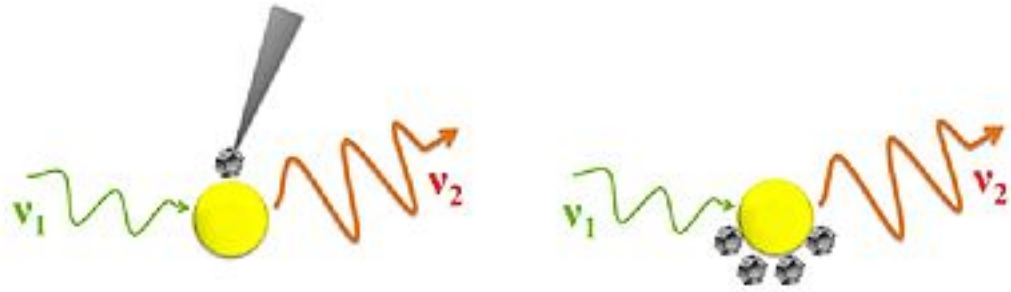
Основная проблема КР – низкая интенсивность



Гигантское комбинационное рассеяние (ГКР)
Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)

КР, усиленное наноструктурами металлов

ГКР позволяет получить огромное усиление КР до 14 порядков от молекул, помещенных в непосредственной близости (в т.ч. на поверхности) металлических наноструктур (Ag, Au, Pt, Cu).



TERS **SERS**

Усиления ГКР:

1) Электромагнитное

2) Химическое (при адсорбции молекул)

Преимущества ГКР

- ✔ Высокое разрешение (ГКР возникает локально – только на небольшом расстоянии от наночастиц);
- ✔ Огромное усиление спектров КР от молекул вблизи наноструктур;
- ✔ Возможность исследовать малейшие концентрации веществ и даже единичные молекулы;
- ✔ Нет выгорания (в отличие от флуоресценции);
- ✔ Не требует меток (*)

Трудности

Усиление сигнала ГКР от молекул может сильно варьировать во времени в связи с факторами:

1) Агрегация наночастиц
2) Изменение конформации молекулы при адсорбции на поверхность наночастицы
3) Наночастицы могут быть токсичны для клеток
4) Клетки и физиологические буферы могут «портить» наночастицы

К каждому новому объекту – новый подход…

SERS is pain!

Типы наноструктур

Наночастицы для усиления сигнала КР от молекул

Молекулярные сенсоры (с молекулой-репортером)

Работа с низкой концентрацией молекул

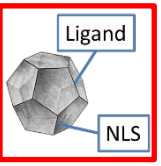
Молекулы внутри клеток и органелл!

Распределение молекул□ высокое разрешение!

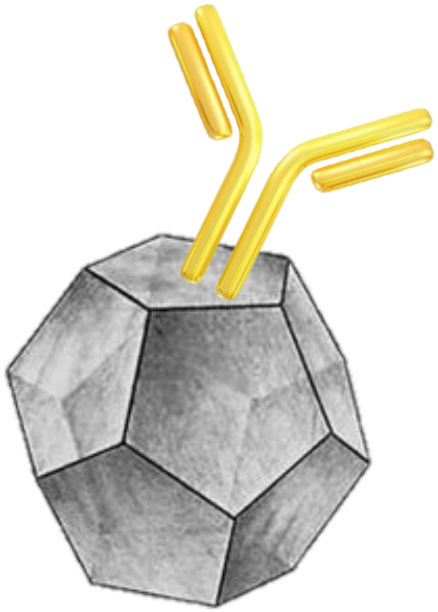
pH- и глюкозо-метры

iSERS (иммуноГКР)

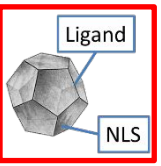
Никельшпарг Э.И. Спектроскопия КР: новые возможности старого метода/ биомолекула.ру



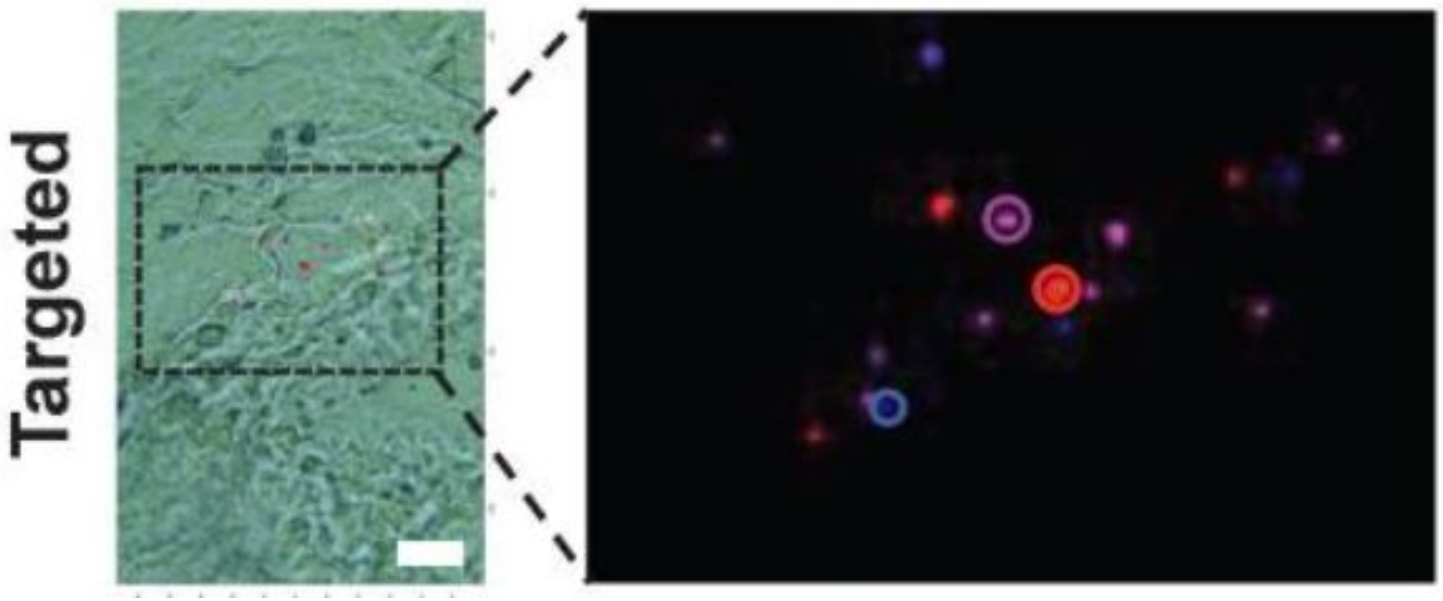
Иммуно-ГКР



Сочетает в себе специфичность иммунохимии и чувствительность ГКР



Иммуно-ГКР: трёхцветное ГКР-изображение срезов жировой ткани при внутривенном введении нано-меток

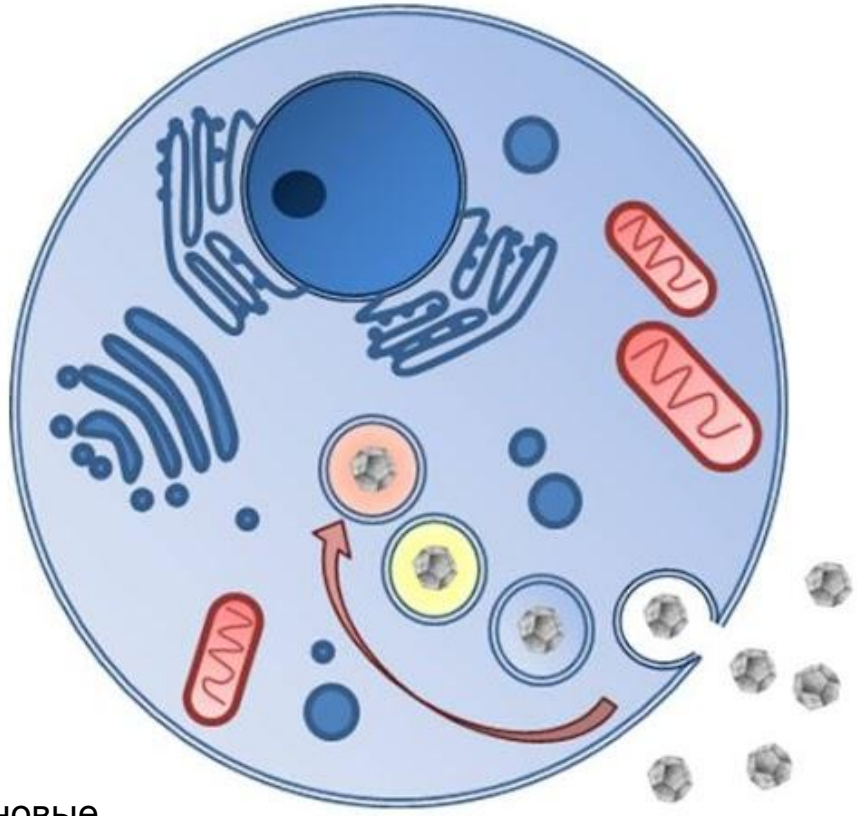


anti-ICAM-1 (purple), anti-VCAM-1 (red), and anti-P-selectin (blue)

J. Noonan et al., *Theranostics*, 2018

ГКР pH-метры

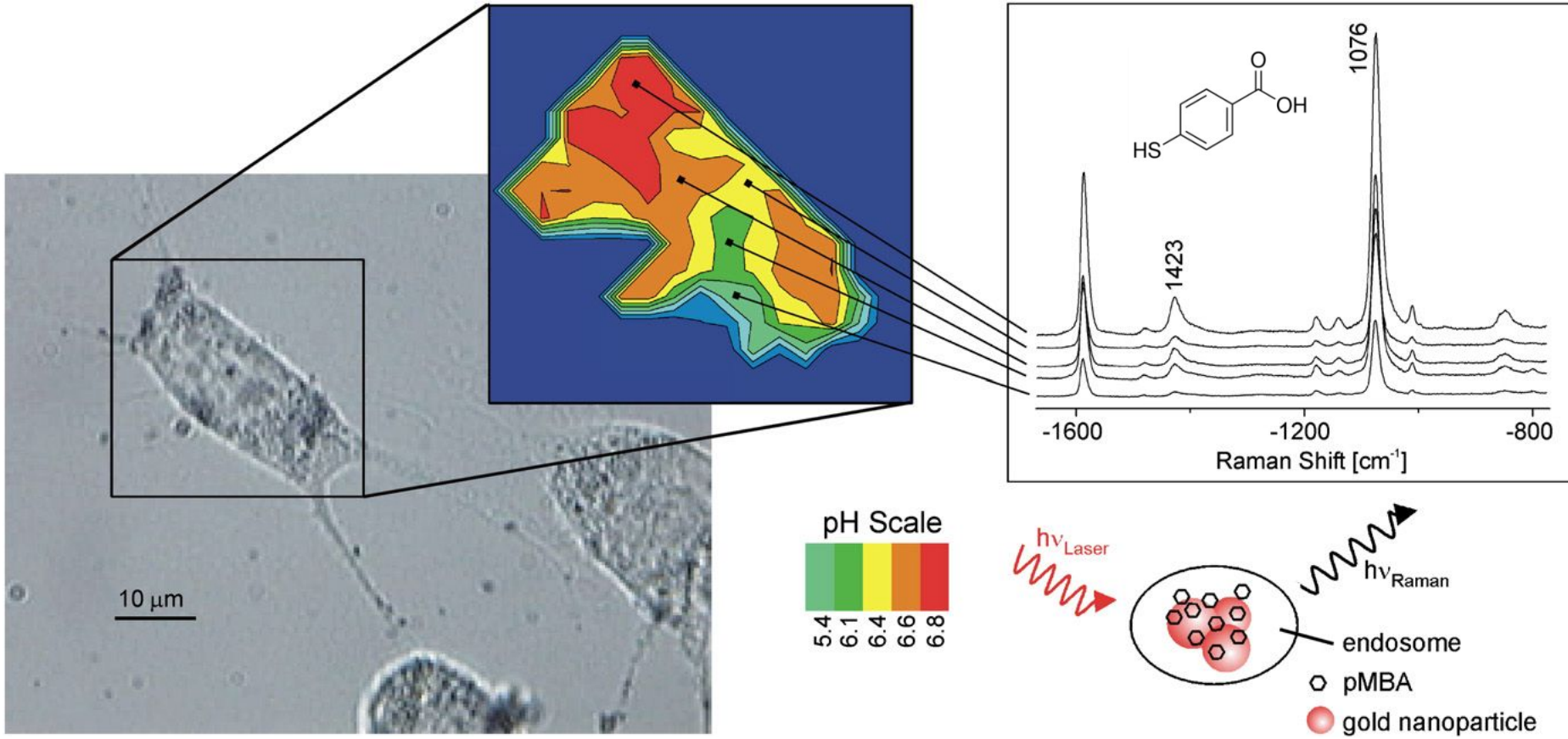
Картирование клеток с помощью молекул-репортеров, адсорбированных на наночастицы при эндосомальном введении



Никельшпарг Э.И. Спектроскопия КР: новые возможности старого метода/ биомолекула.ру

ГКР pH-метры

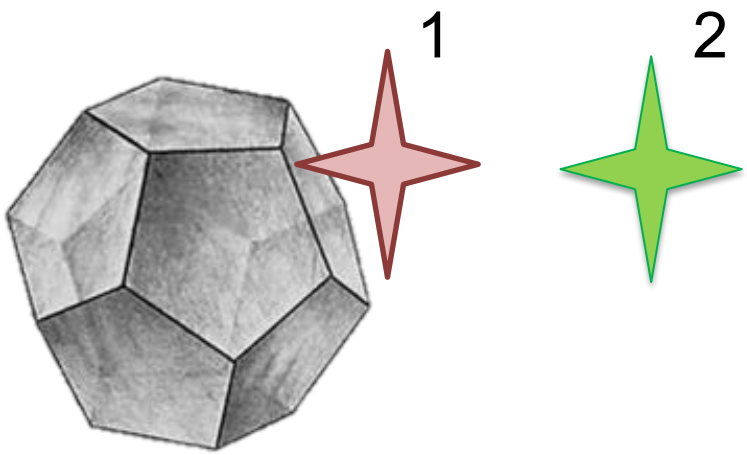
Картирование клеток по кислотности с помощью 4-меркаптобензойной кислоты, адсорбированной на золотые наношарики



J. Kneipp et al / Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 6 (2010) 214–226

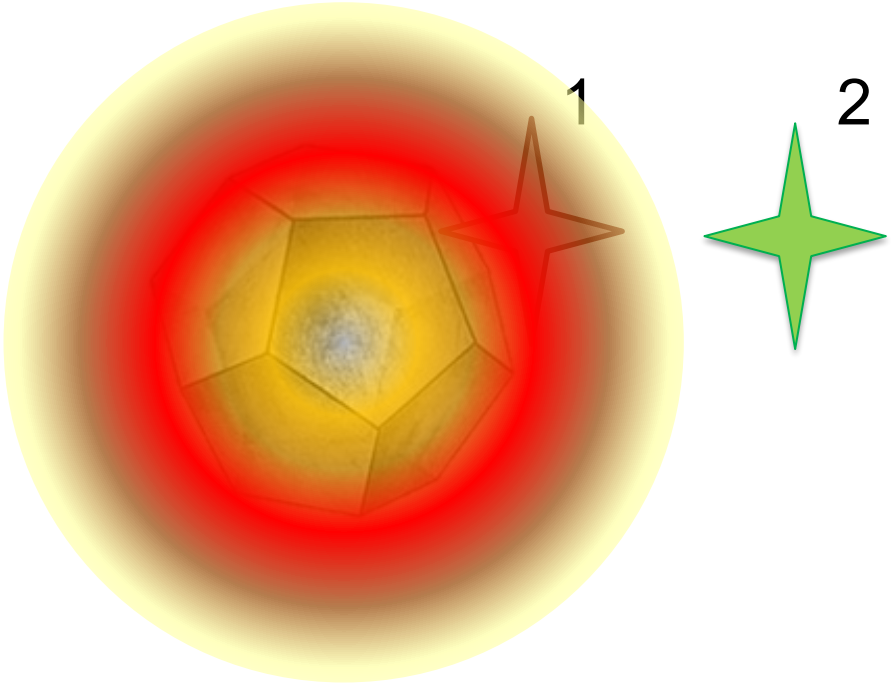
Основное ограничение ГКР – быстрое затухание усиления при удалении молекулы от наноструктуры

В зависимости от наноструктур от r^3 до r^{10}



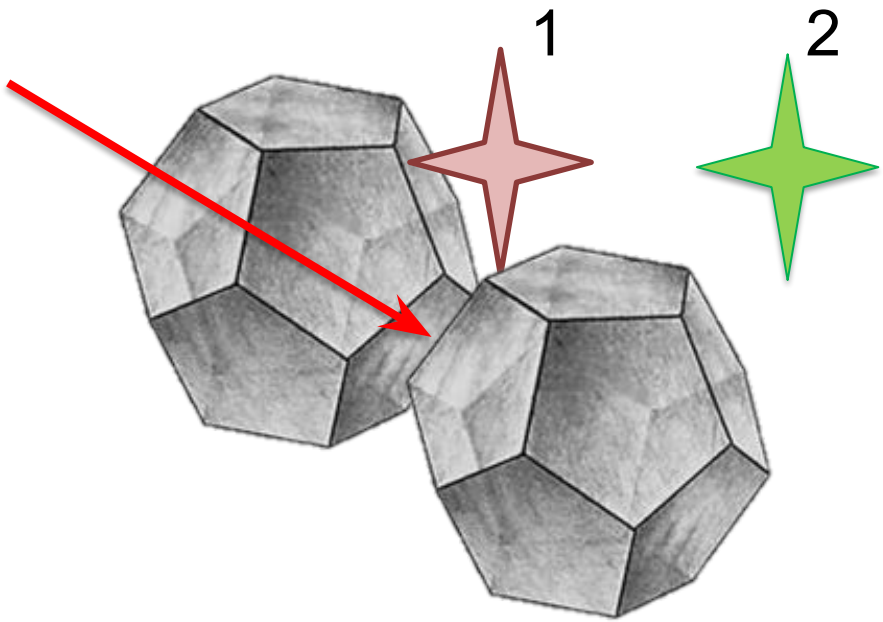
Основное ограничение ГКР – быстрое затухание усиления при удалении молекулы от наноструктуры

В зависимости от наноструктур от r^3 до r^{10}



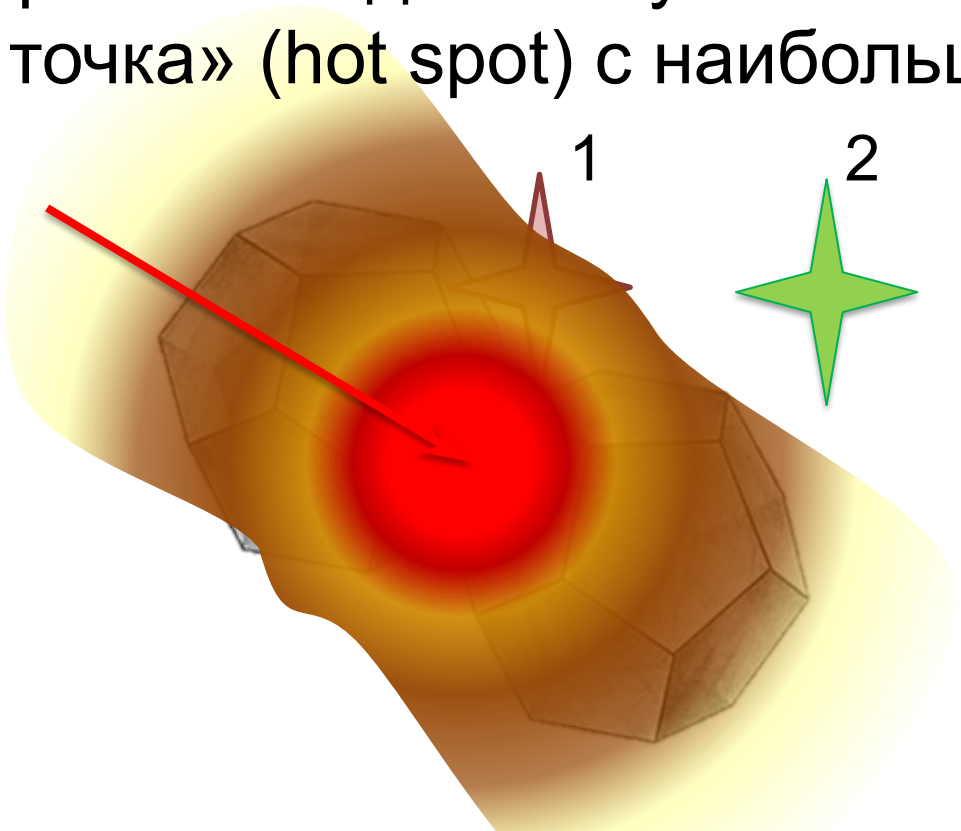
Основное ограничение ГКР – быстрое затухание усиления при удалении молекулы от наноструктуры

В месте соприкосновения наноструктур/острых граней/впадин/выпуклостей образуется т.н. «горячая точка» (hot spot) с наибольшим усилением сигнала

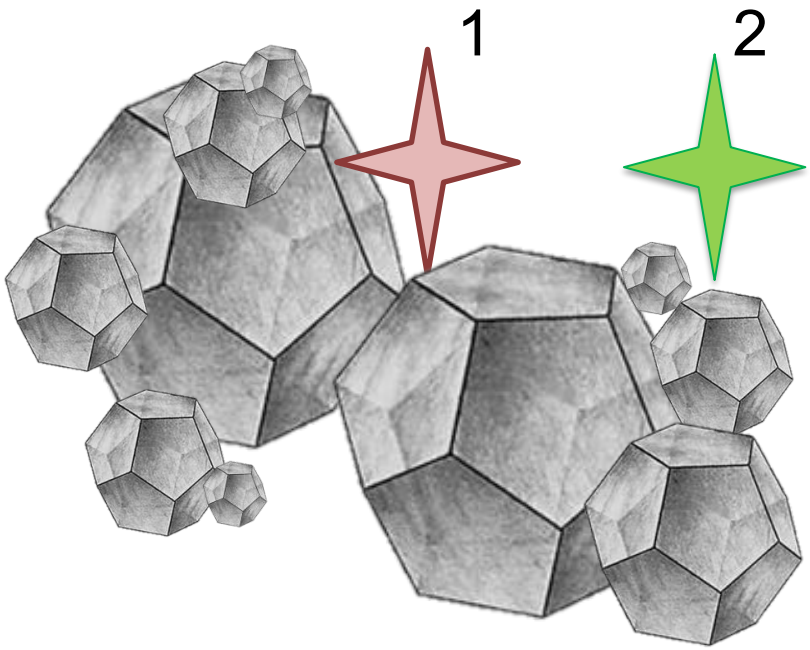


Основное ограничение ГКР – быстрое затухание усиления при удалении молекулы от наноструктуры

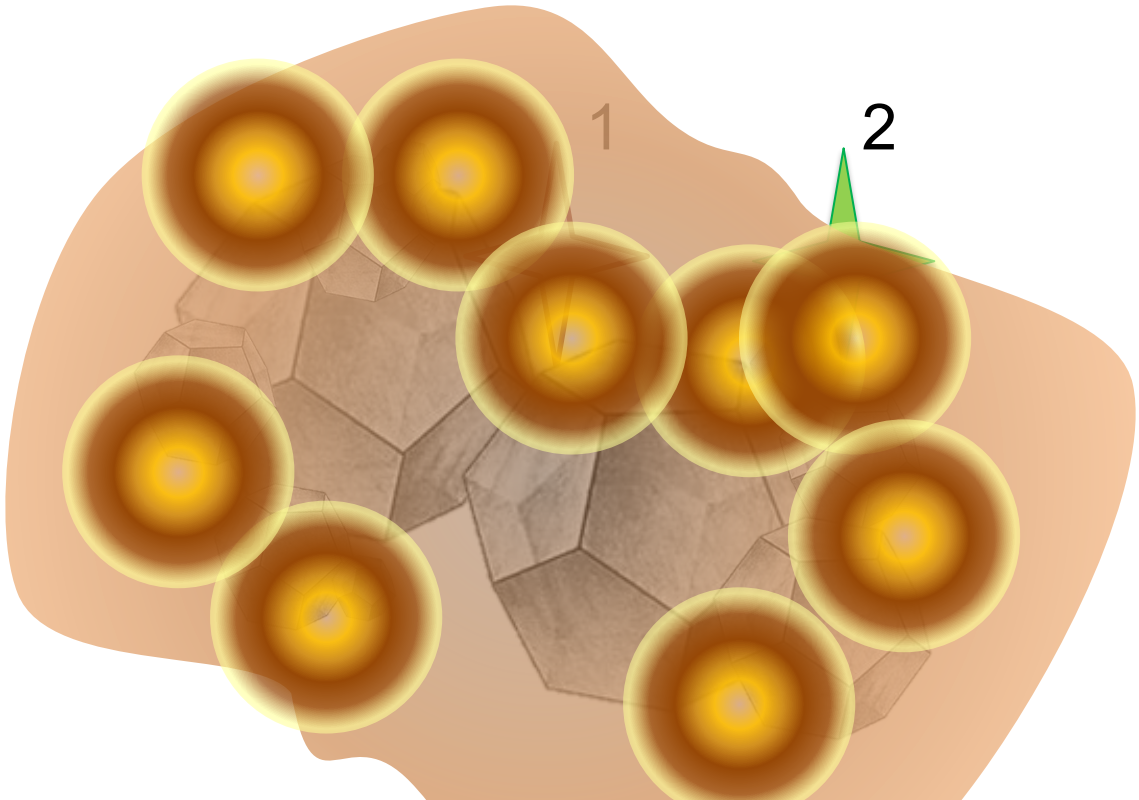
В месте соприкосновения наноструктур/острых граней/впадин/выпуклостей образуется т.н. «горячая точка» (hot spot) с наибольшим усилением сигнала

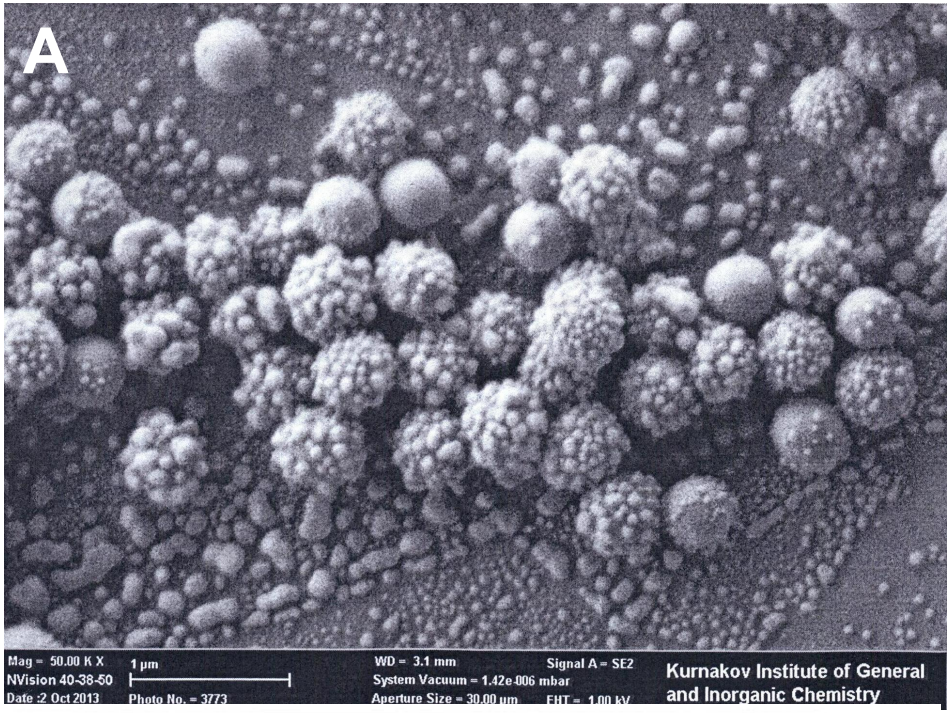


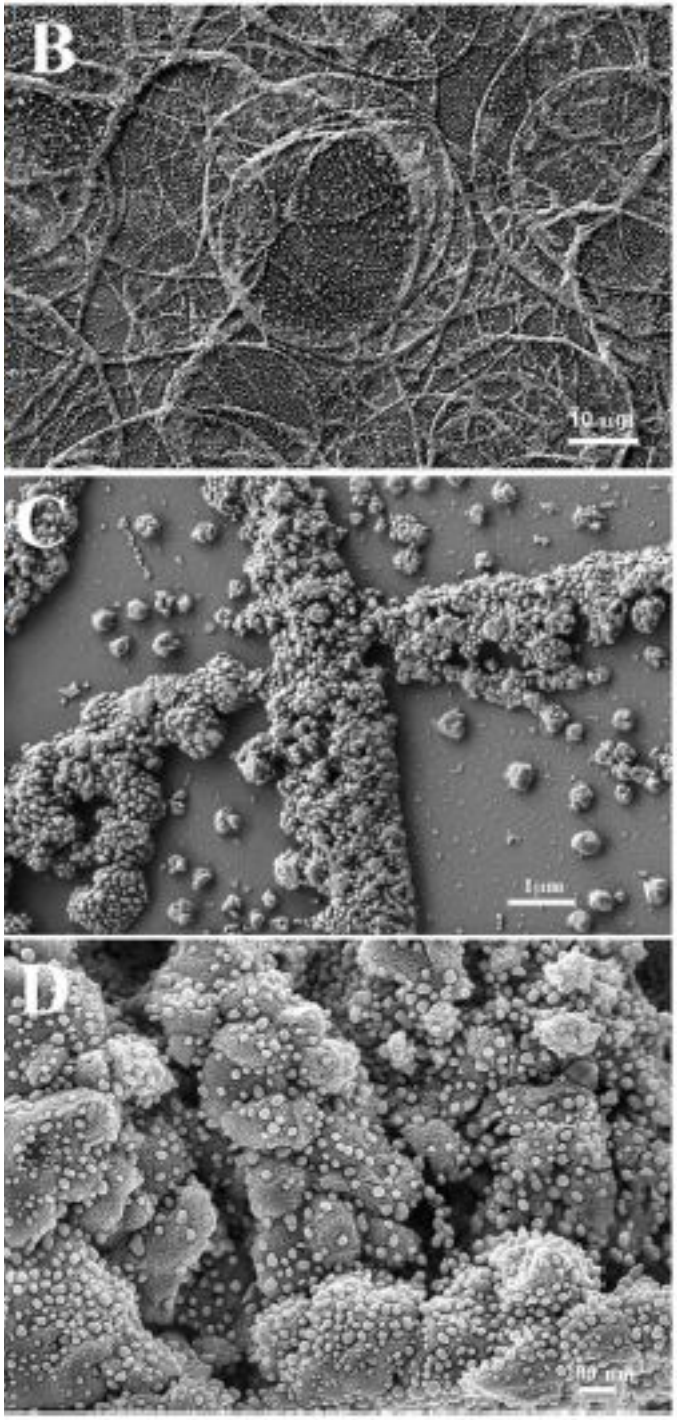
Можно создать иерархические наноструктуры со множеством горячих точек и дальнодействующим усилением!



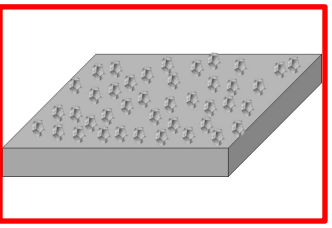
Можно создать иерархические наноструктуры со множеством горячих точек и дальнодействующим усилением!





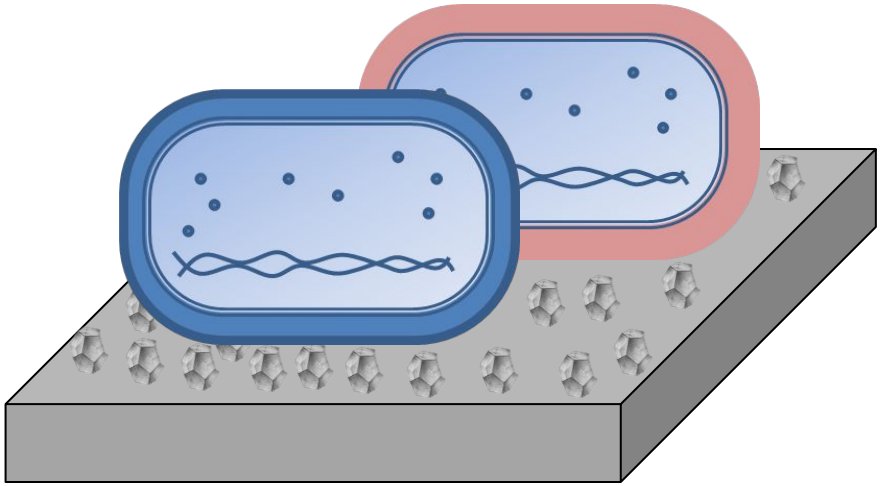


Semenova et al. (2012, 2016), Brazhe (2015), Sarycheva et al. (2016)

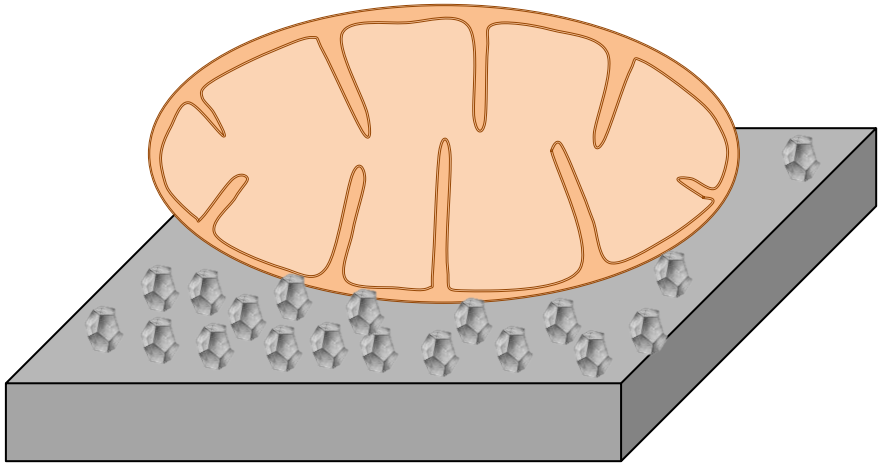


Наноструктурированные поверхности

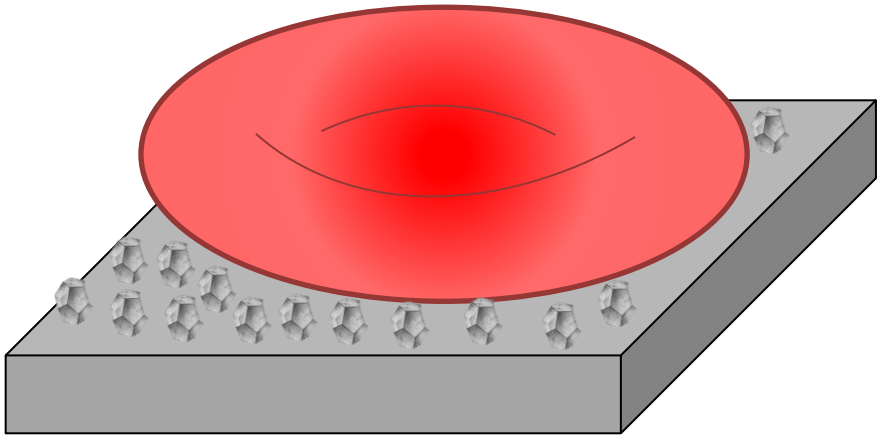
- ✔ Получение дальнодействующего усиления сигнала за счет плазмонного резонанса.
- ✔ Меньше требований к токсичности (ничего не проникает в клетку/органеллу)



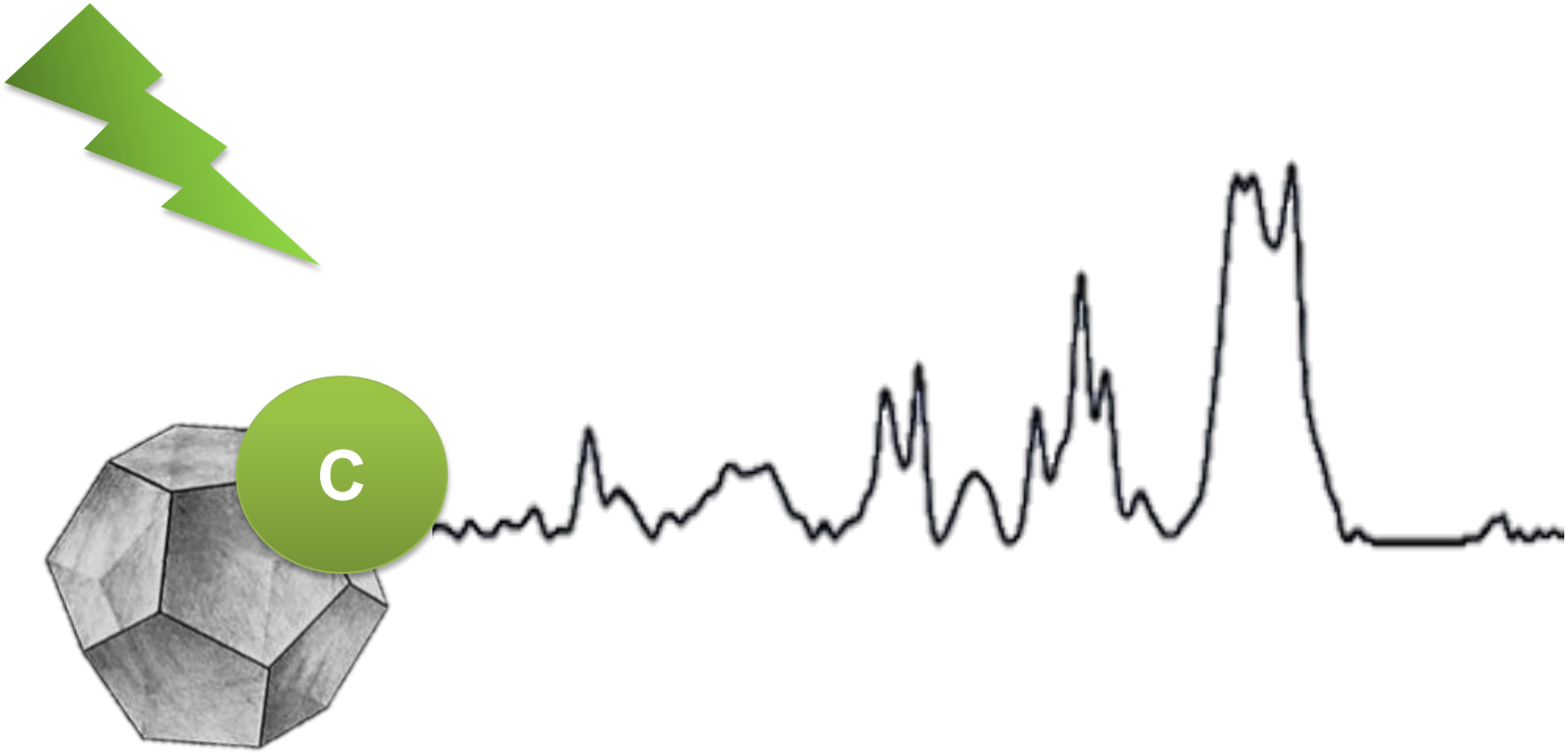
Детекция бактерий

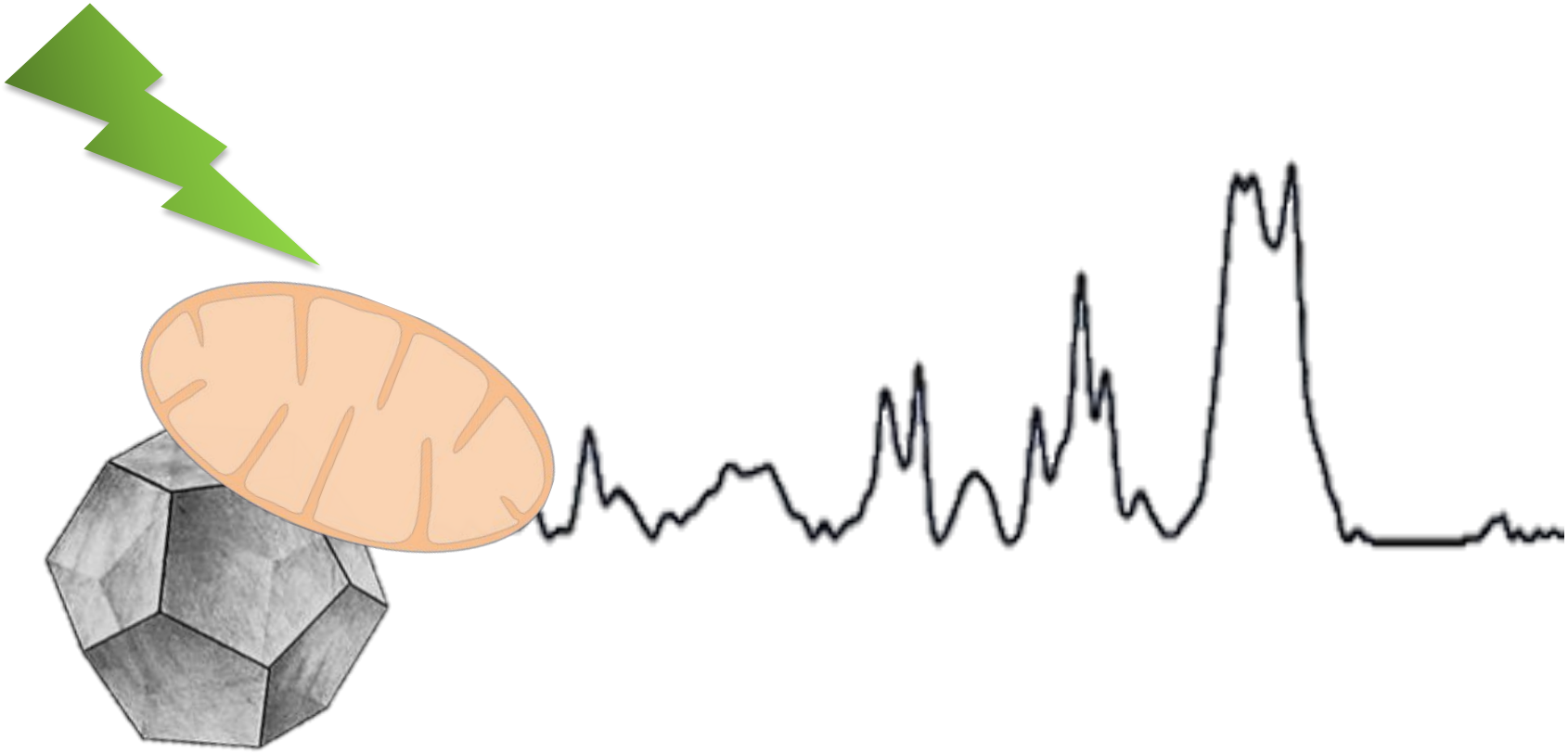


Исследование митохондрий

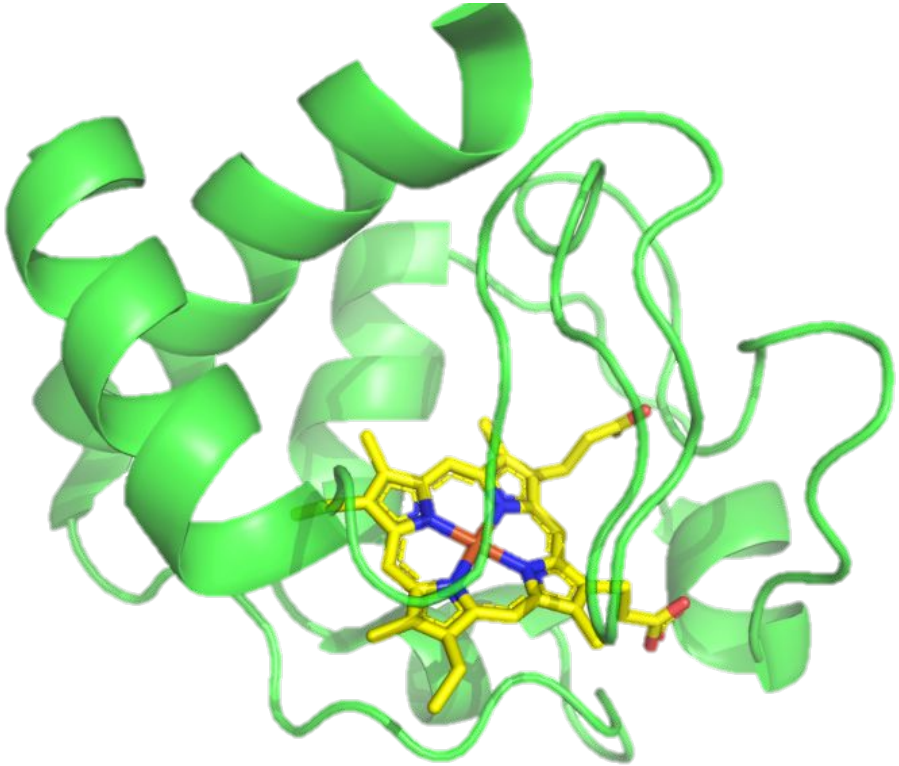


Эритроцитов

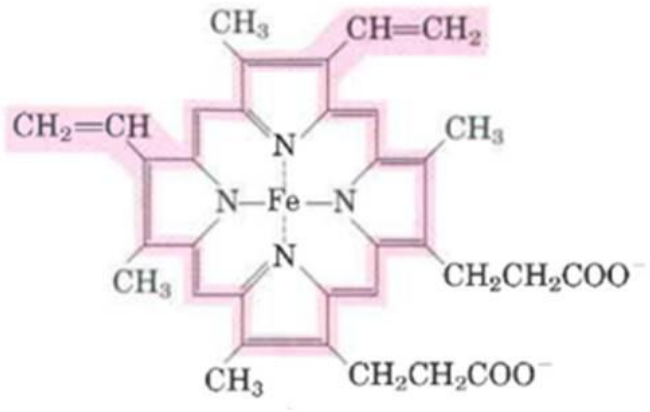

C



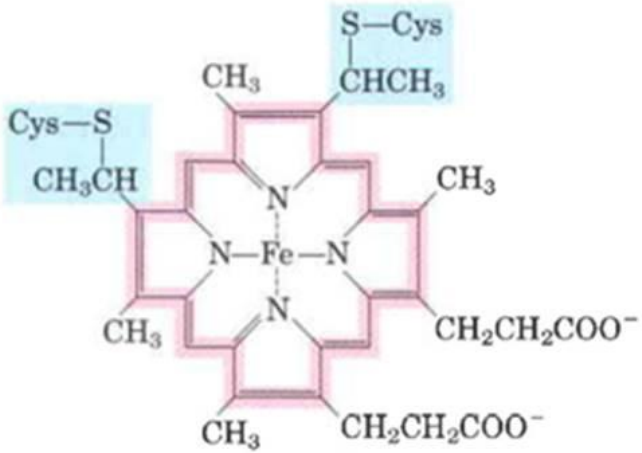
Цитохромы состоят из белковой части и гема



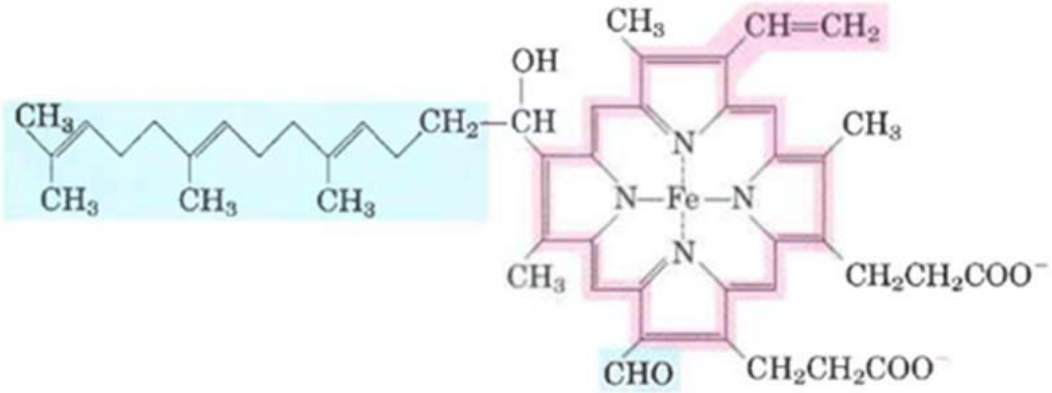
Гемы различных цитохромов очень похожи:
порфириновое кольцо с железом + боковые радикалы



Гем *b*



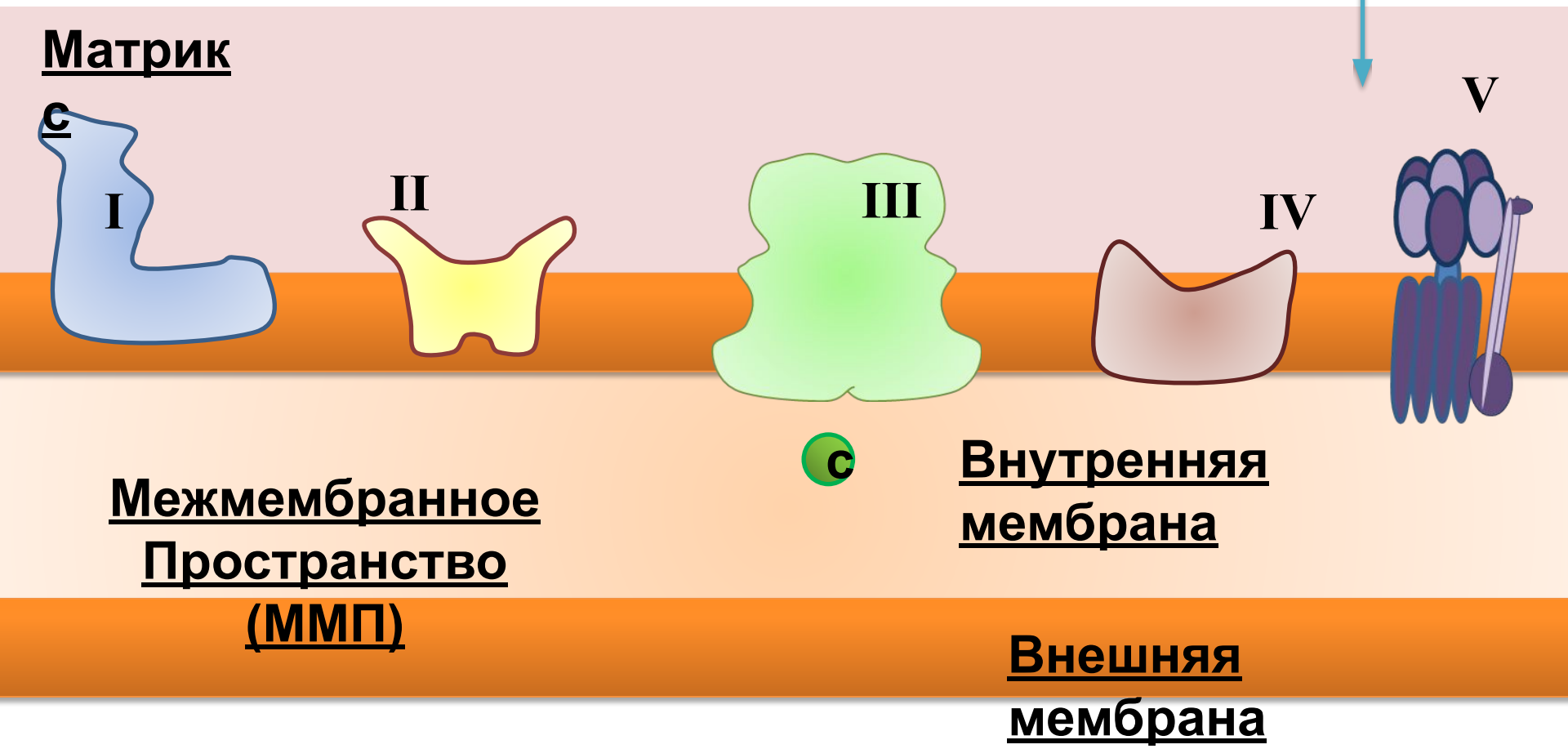
Гем *c*



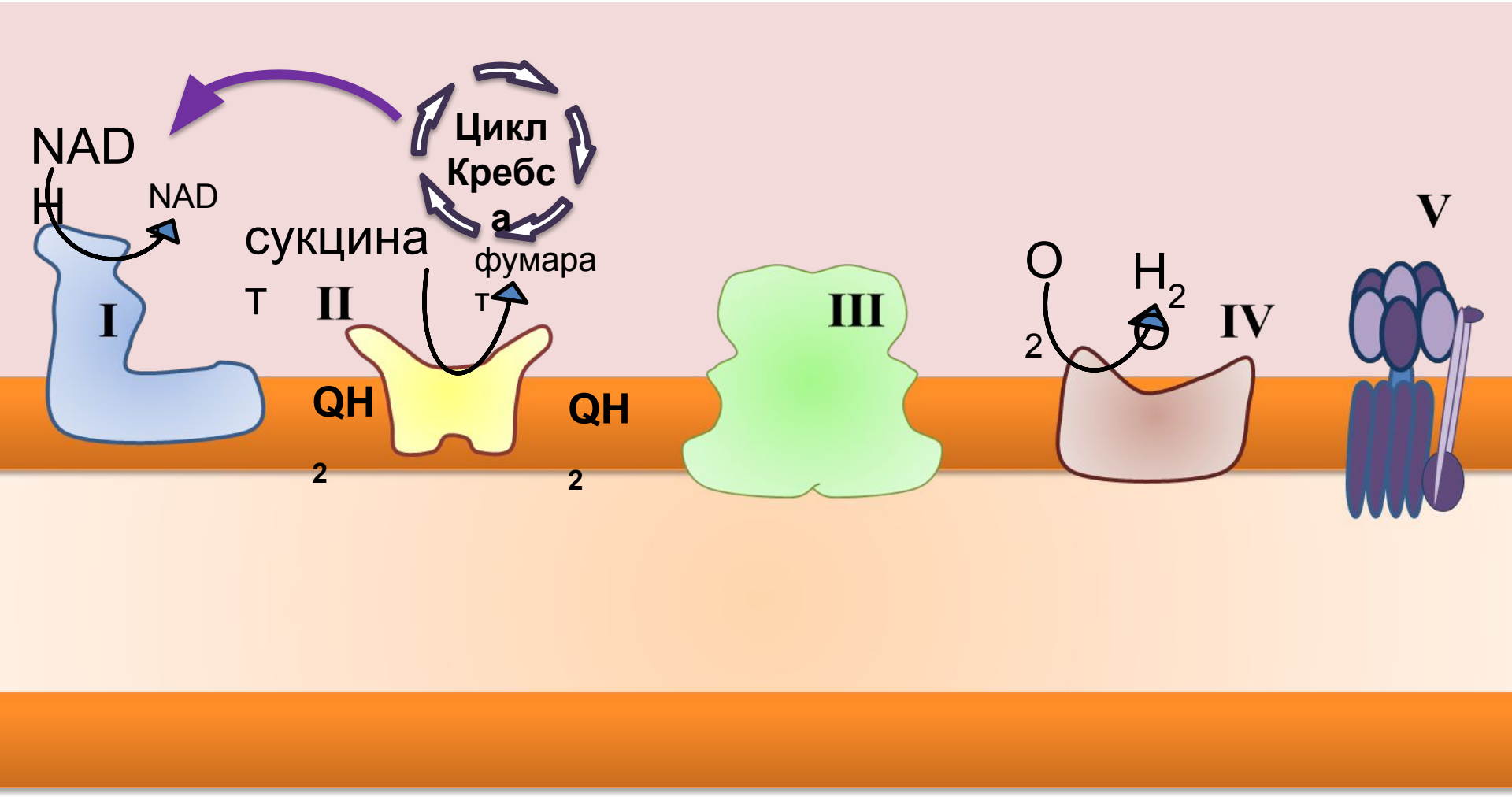
Гем *a*

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*.

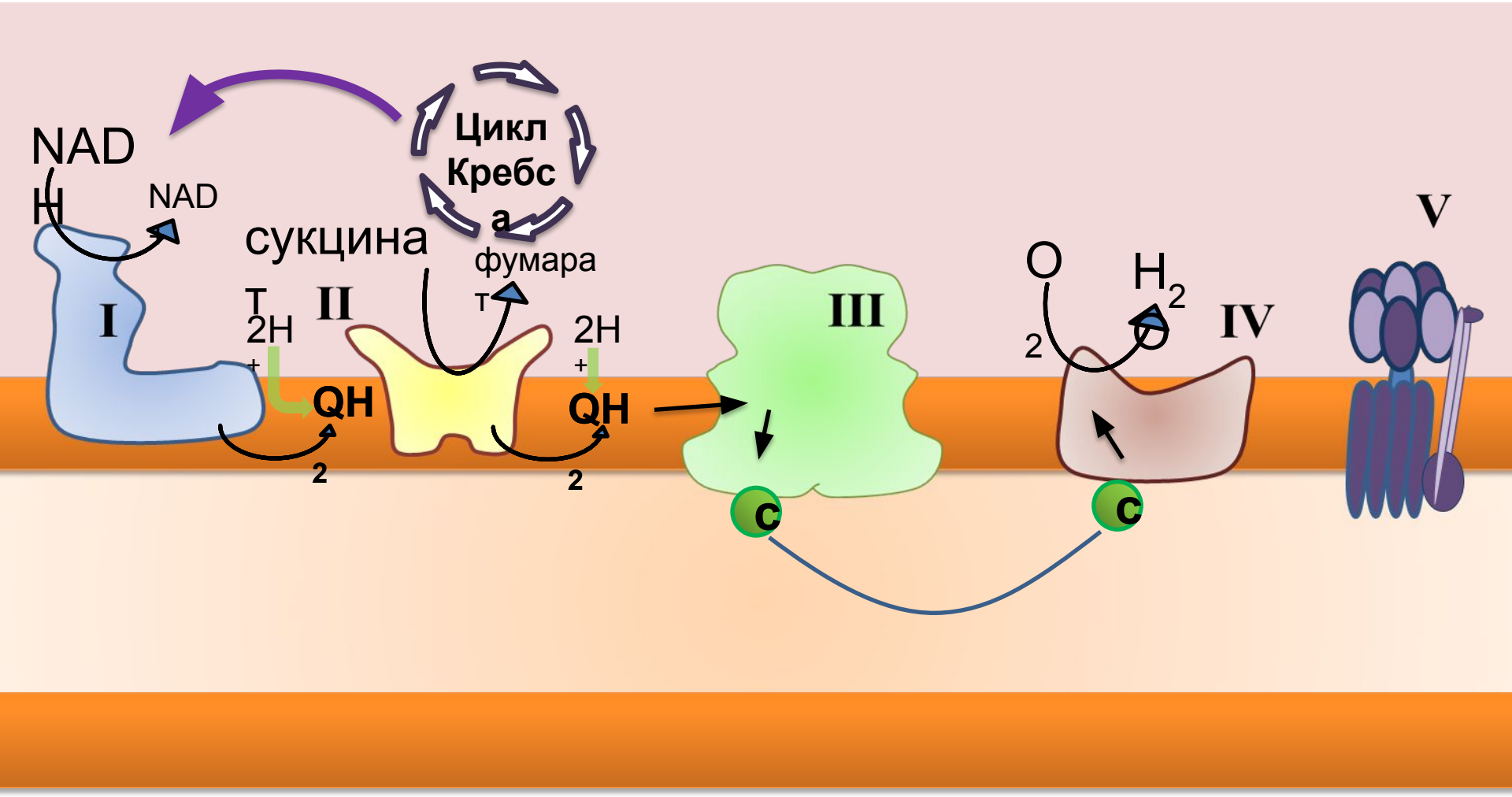
Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ)



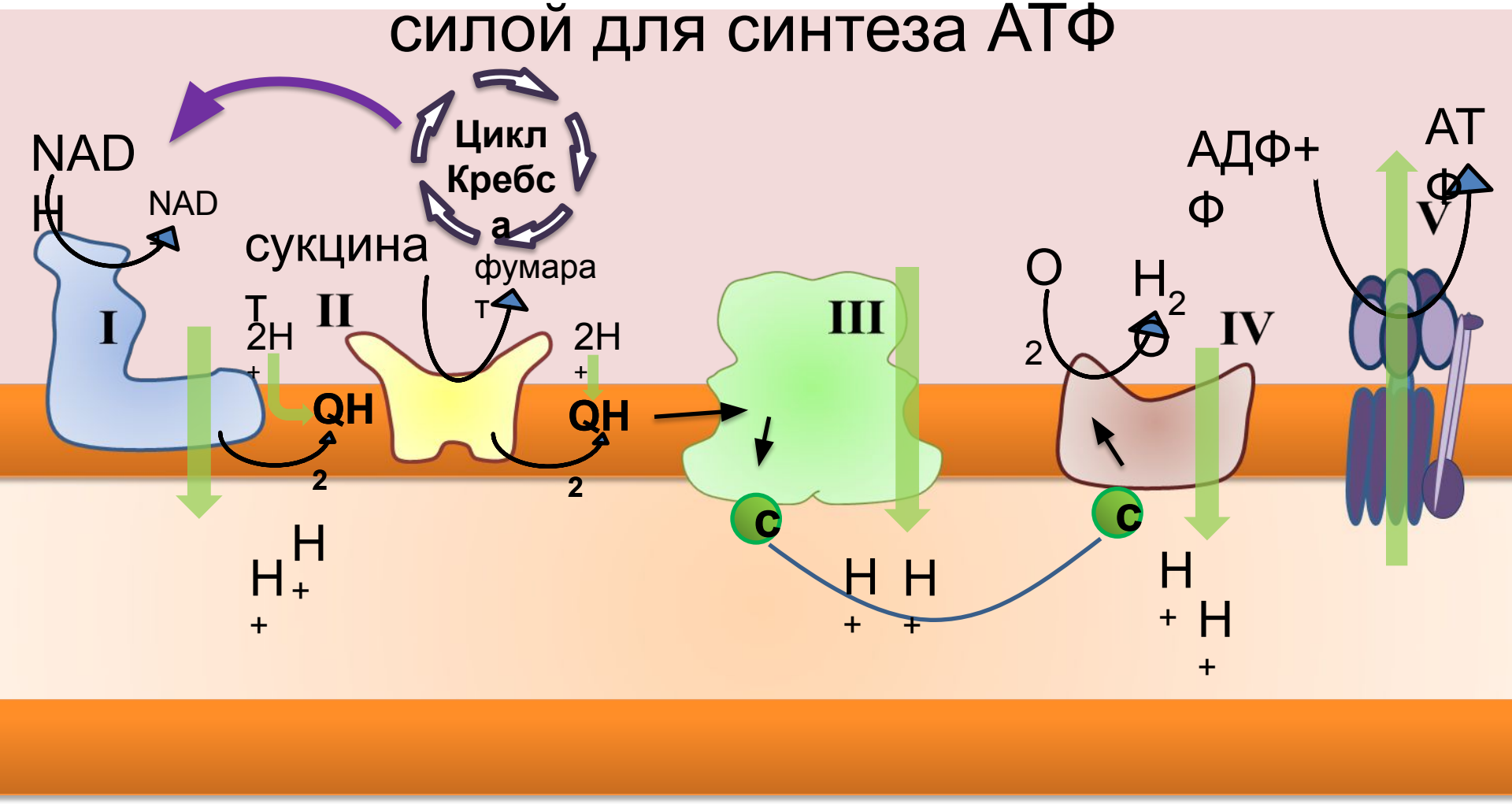
ЭТЦ получает электроны от цикла Кребса через КI (NADH) и КII (сукцинат)



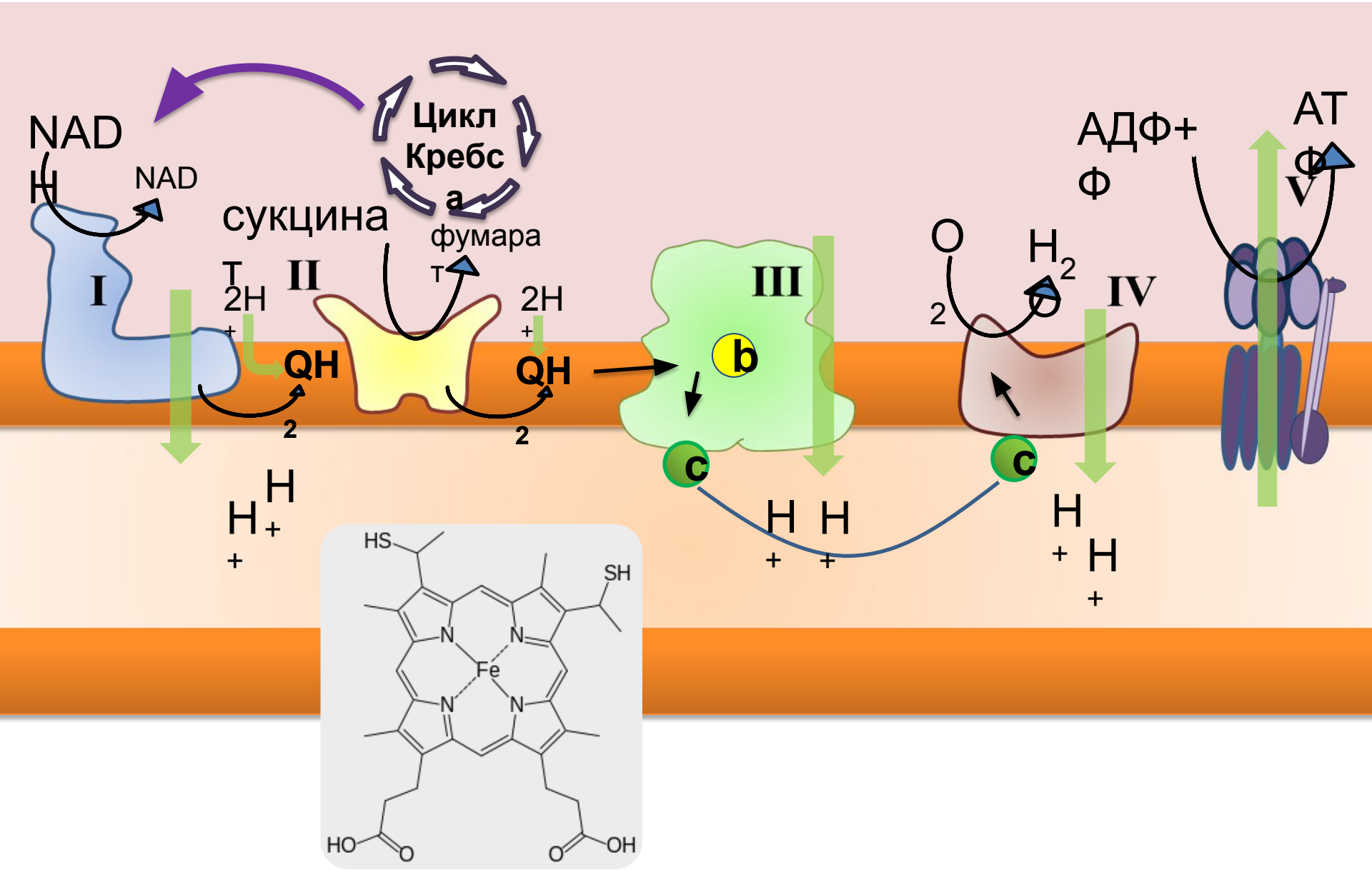
ЭТЦ получает электроны от цикла Кребса через КI (NADH) и КII (сукцинат)



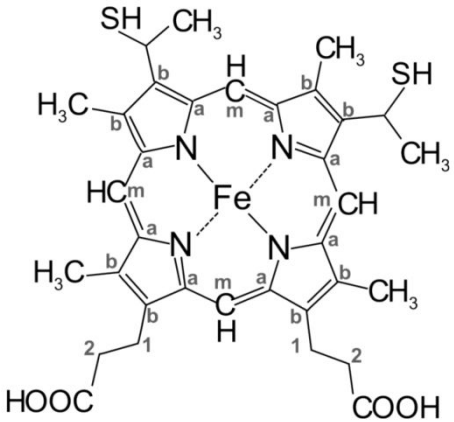
Перенос электронов сопровождается переносом протонов, что является движущей силой для синтеза АТФ



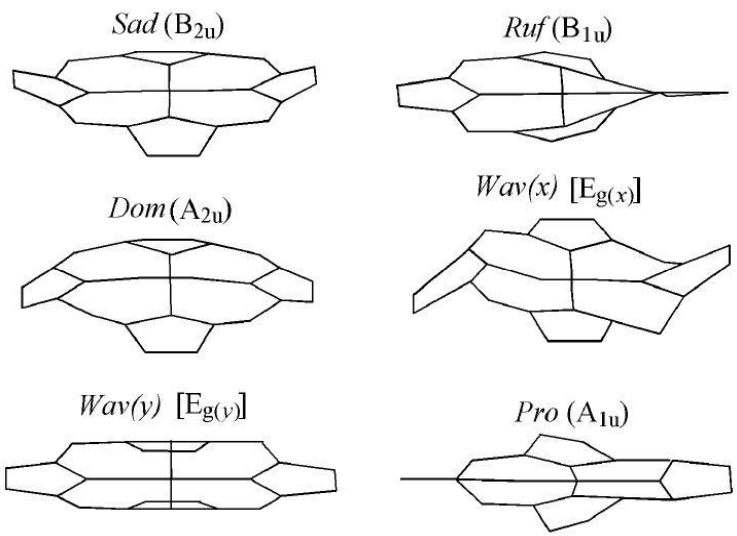
Цитохромы (переносчики электронов) – гемовые белки; обладают интенсивным КР



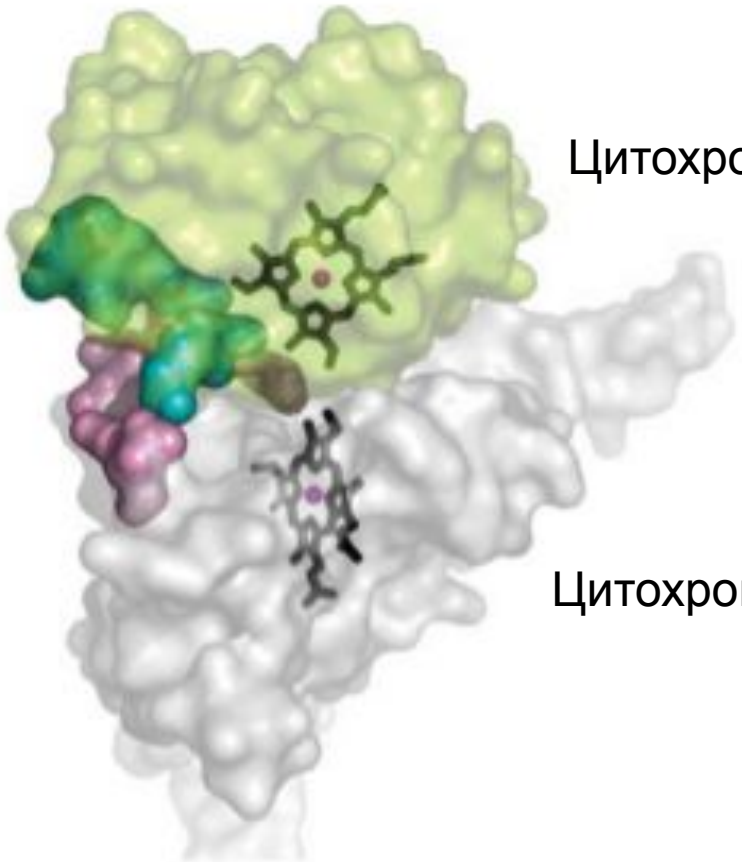
Белок → Конформация гема → Ориентация → Перенос электрона



Гем С



Ma et. al., Biochemistry. 1998

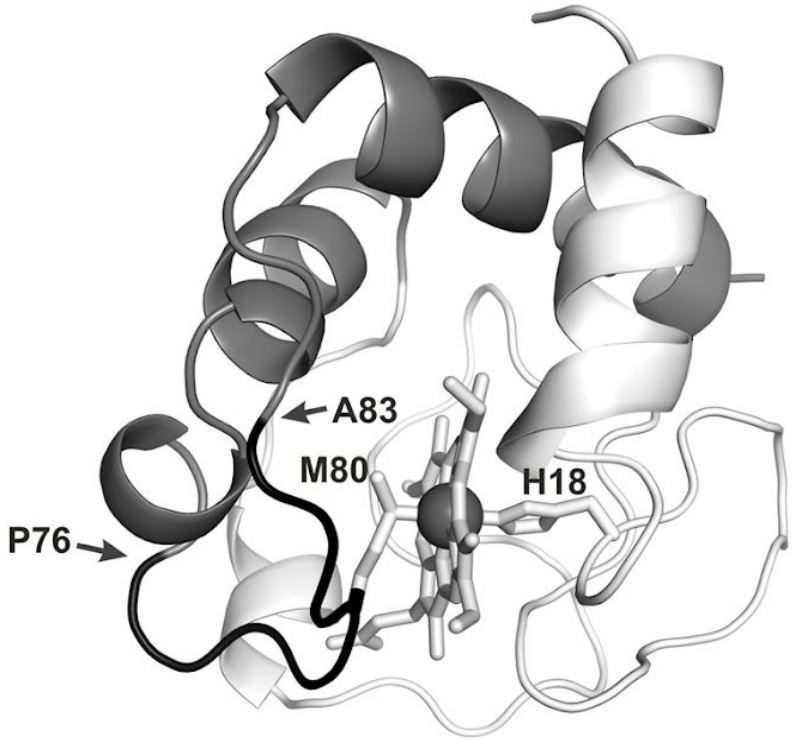


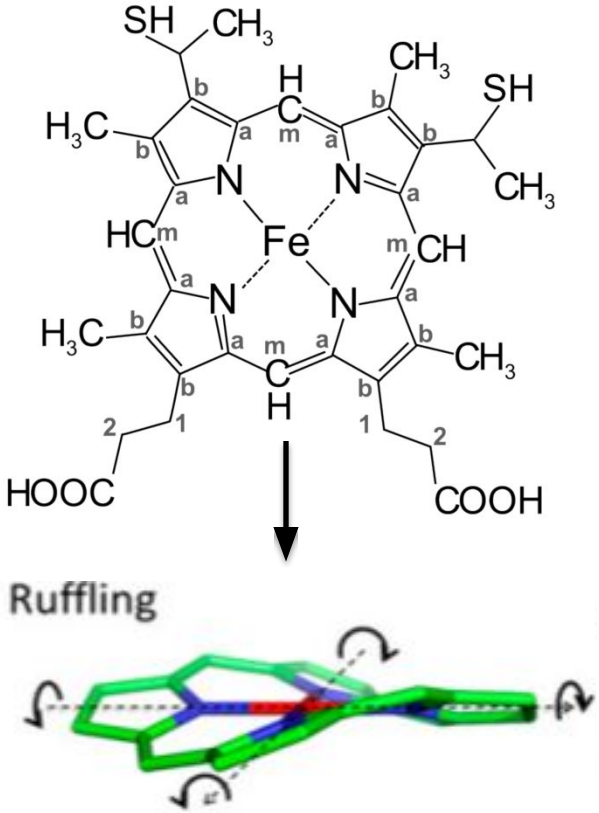
Цитохром *c*

Цитохром c_1

Solmaz S.R.N. and Hunte C.

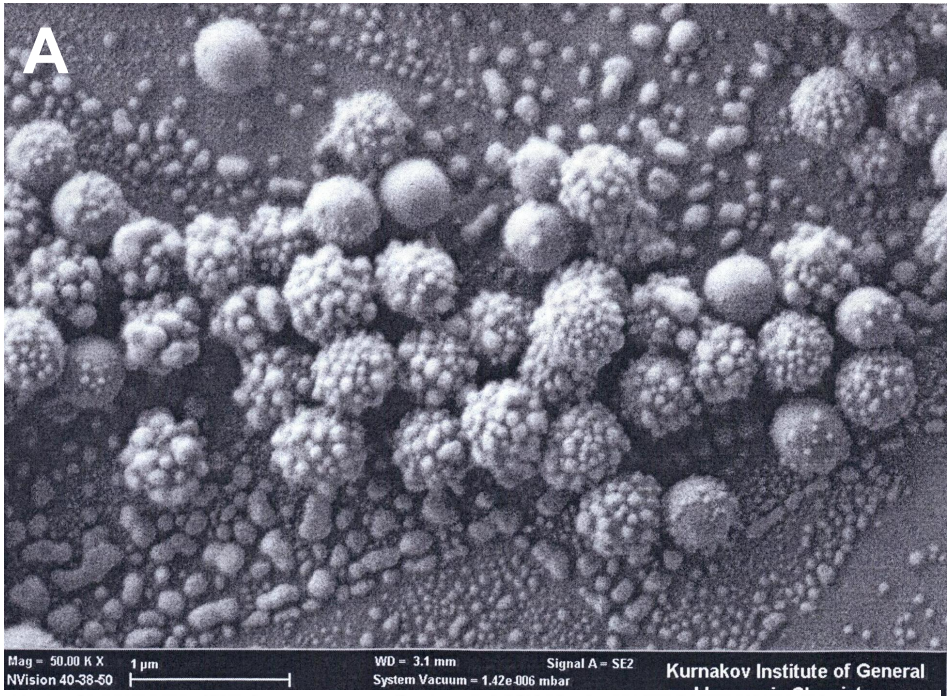
Чем более скручен гем – тем хуже он переносит электроны

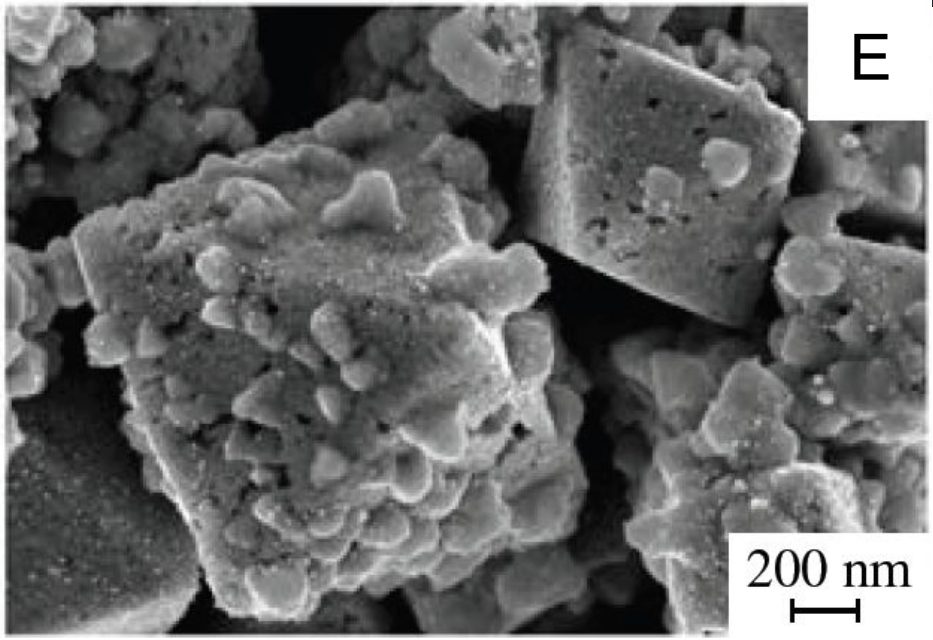


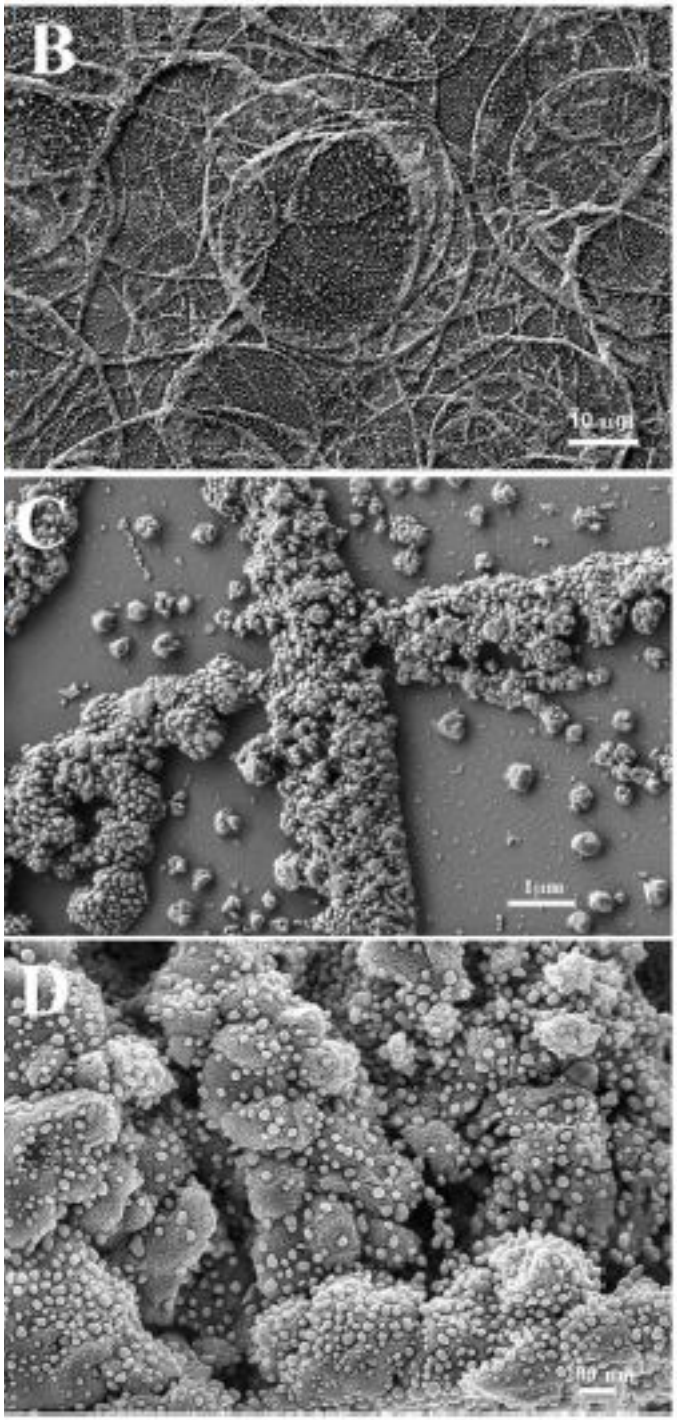


Скрученная конформация
Sun et al. PNAS, 2014

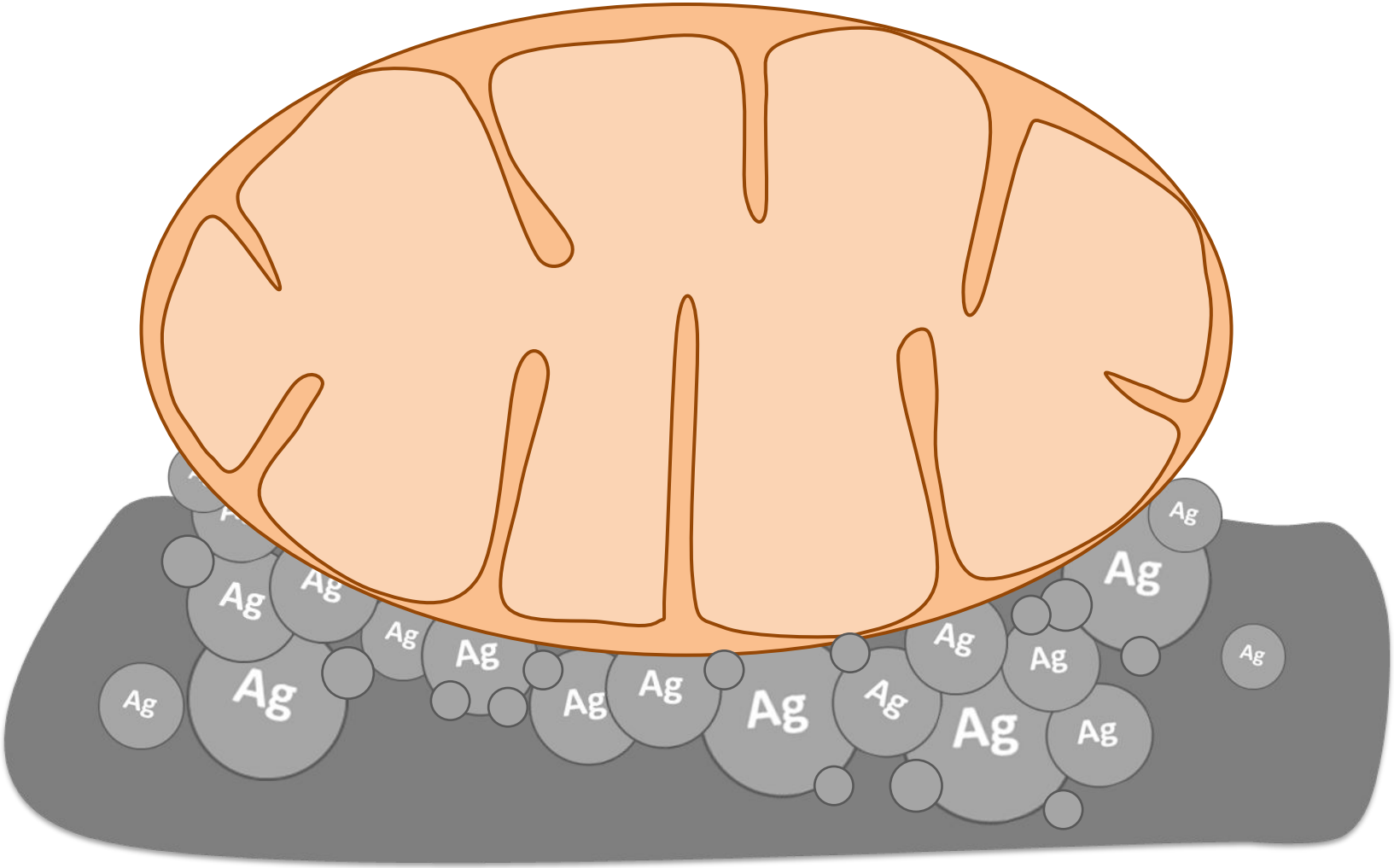
R.V. Chertkova et al., PLoS One, 2017



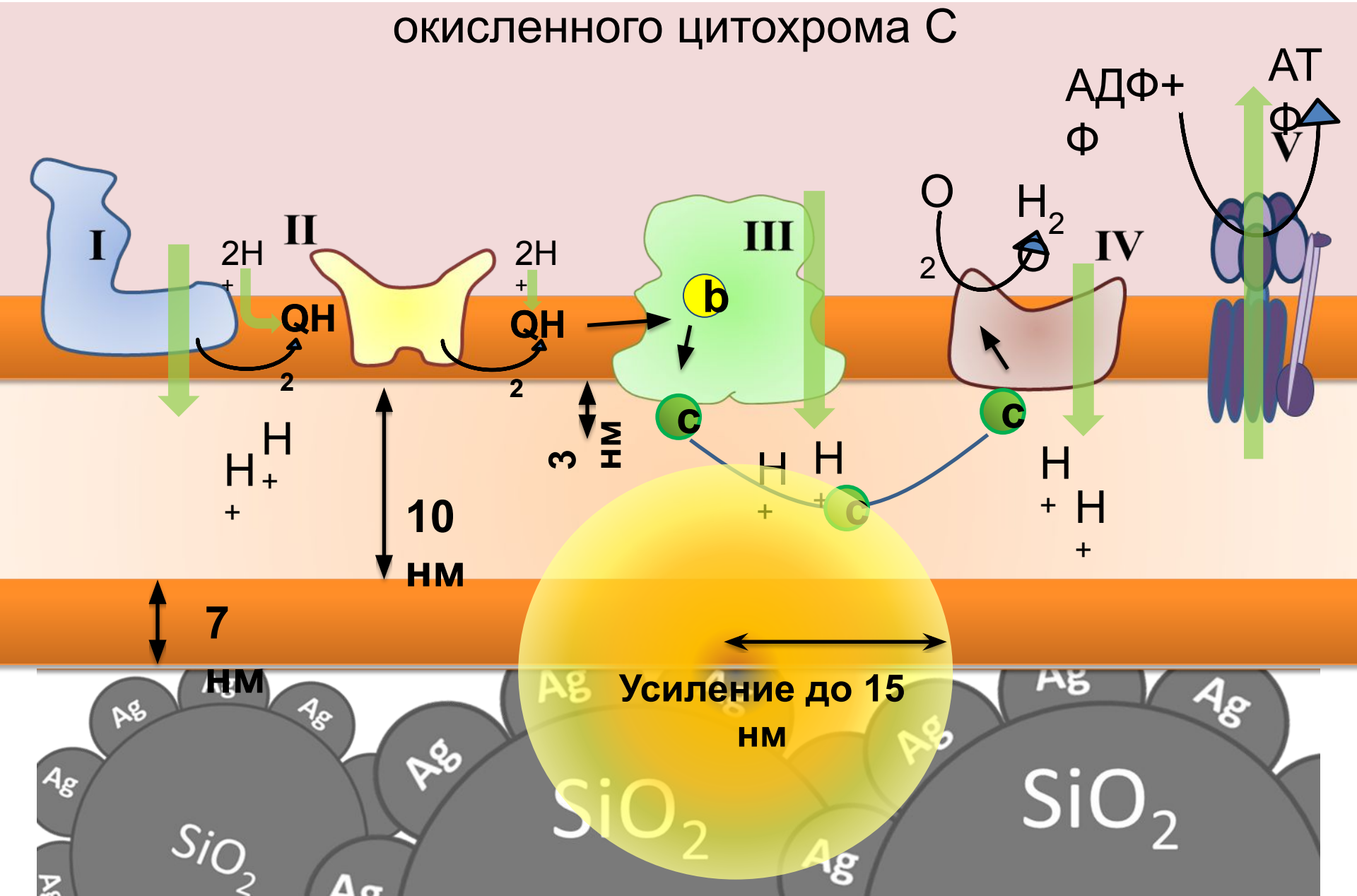




Semenova et al. (2012, 2016), Brazhe (2015), Sarycheva et al. (2016)

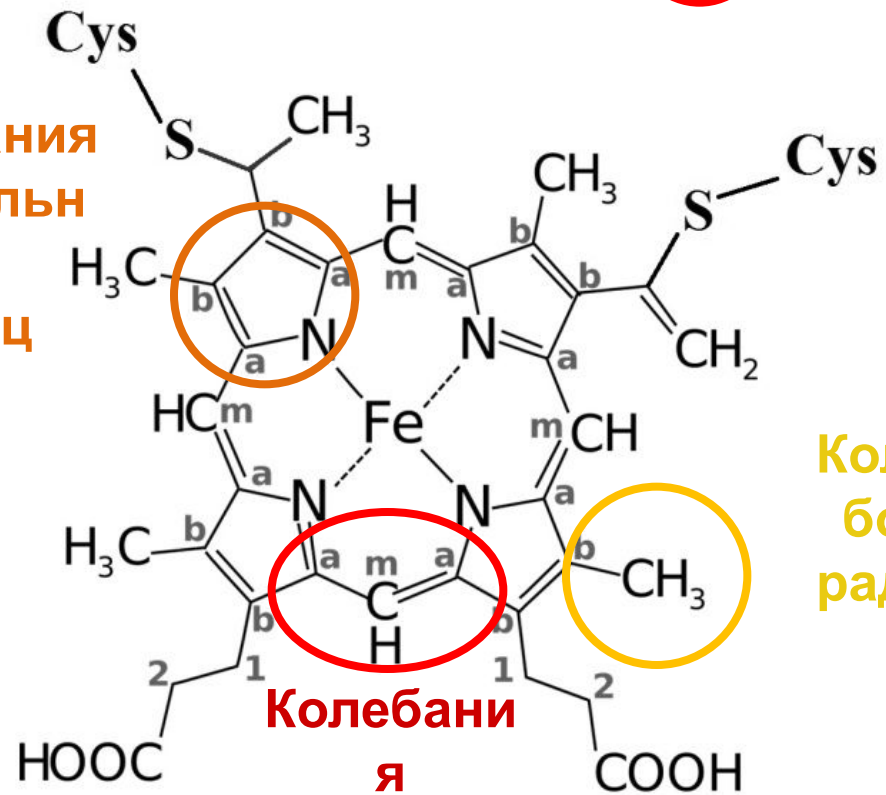

Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag
Ag

Дальнодействующее усиление сигнала позволило зарегистрировать спектры ГКР только от окисленного цитохрома С



Спектр гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) цитохрома С

Колебания пирролных колец

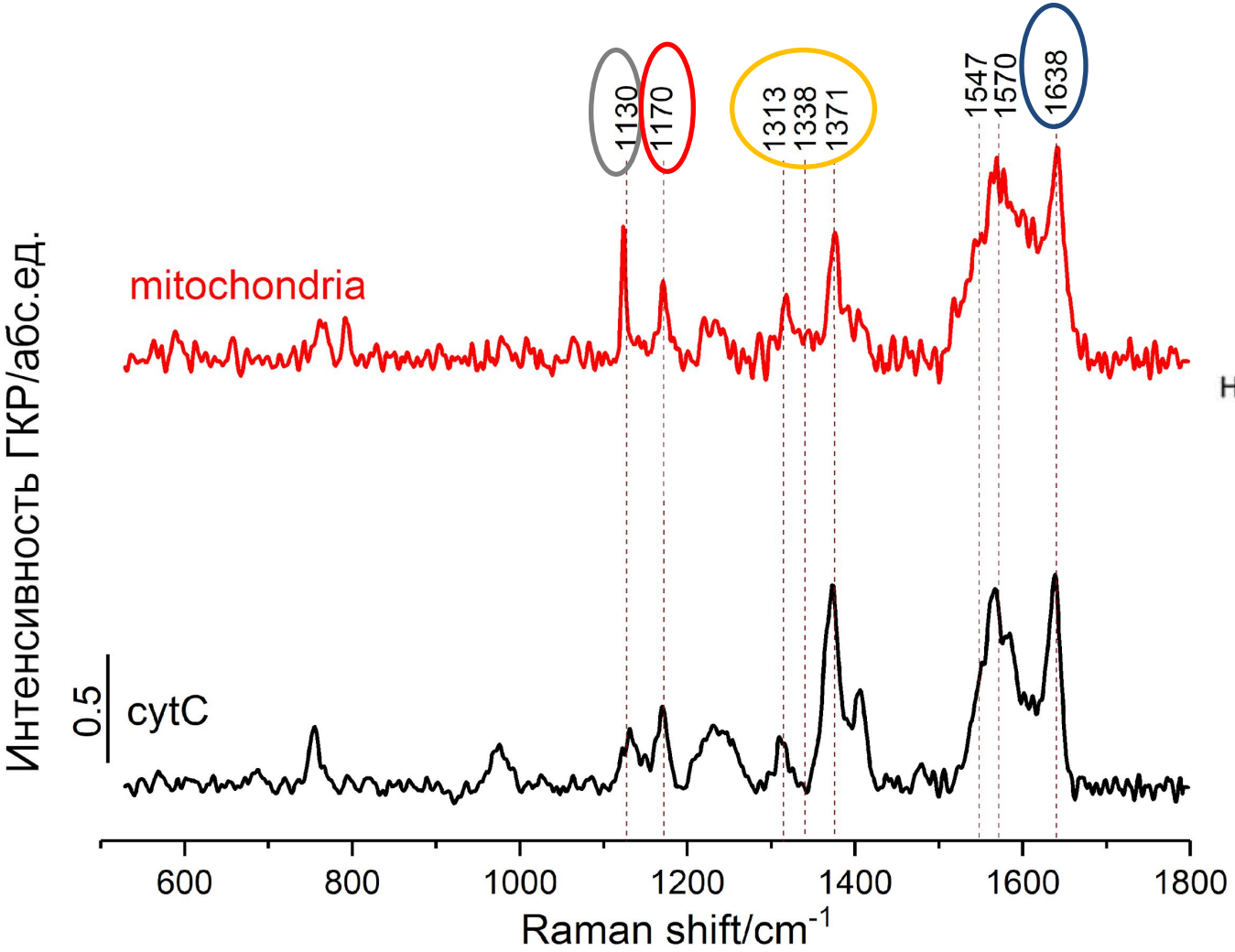


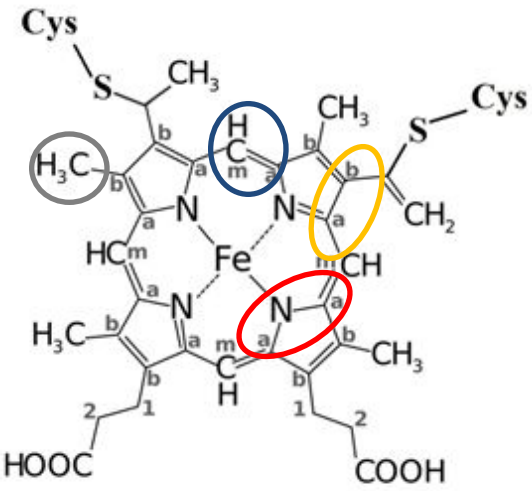
Колебания боковых радикалов

Колебания метиновы

Гем цитохрома *c*

Спектр гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) митохондрий является спектром окисленного гема цитохрома С





Предложенный подход на основе ГКР

- ✔ Позволяет регистрировать сигнал от окисленного цитохрома С внутри интактных митохондрий;
- ✔ Предоставляет уникальную информацию о конформации гема в цитохроме С внутри функционирующей митохондрии, что невозможно получить другими методами;
- ✔ Чувствителен к функциональному состоянию митохондрий;

Brazhe et al. (2015) *Scientific reports*

Заключение

1. Комбинационное рассеяние позволяет детектировать молекулы с большой чувствительностью;
2. Для каждой молекулы уникальный спектр КР - «Молекулярный отпечаток»;
3. По спектрам КР можно выявить изменения конформации молекулы;
4. Гигантское комбинационное рассеяние – это КР, усиленное наноструктурами металлов;
5. ГКР предоставляет большие возможности для изучения внутриклеточных молекул и значительный диагностический потенциал, но успех во многом зависит от оптимизации наноструктур.

Спасибо за внимание!