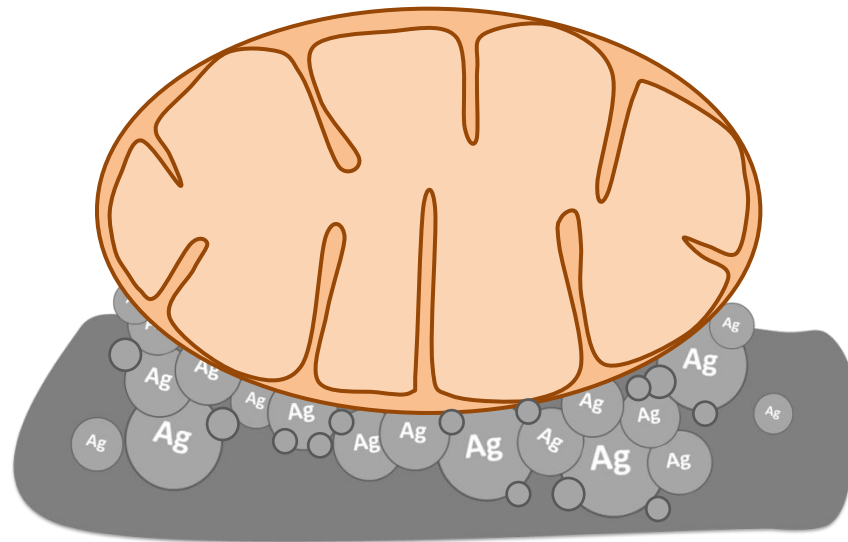


Как заглянуть в МИТОХОНДРИЮ с помощью наночастиц



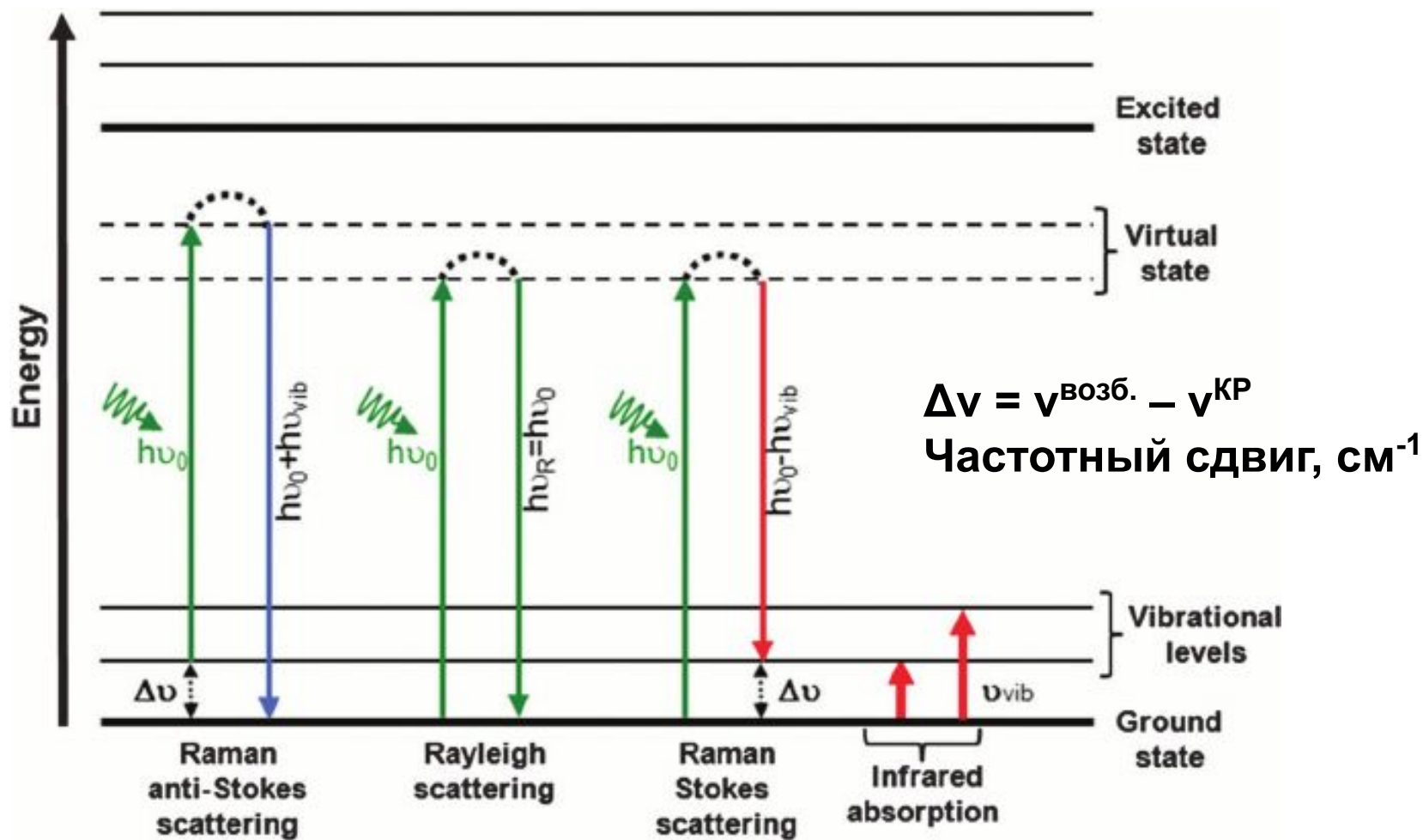
Никельшпарг Эвелина Ильинична
Кафедра биофизики биологического факультета МГУ

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 дальнедействующего усиления на
примере изучения митохондрий

Комбинационное рассеяние (КР, или эффект Рамана)

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

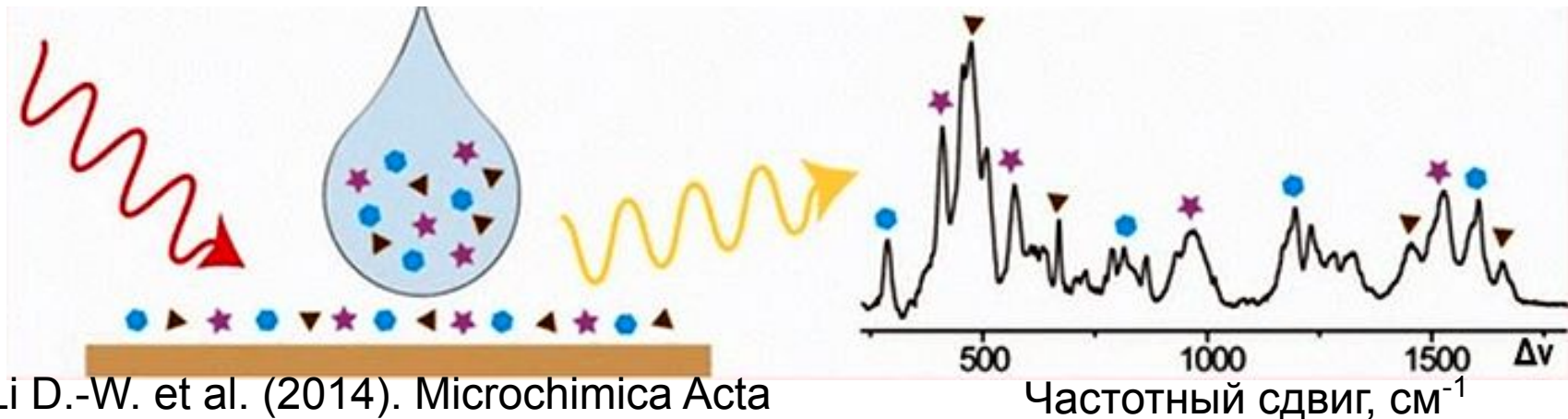


Какую информацию извлекают из спектров КР

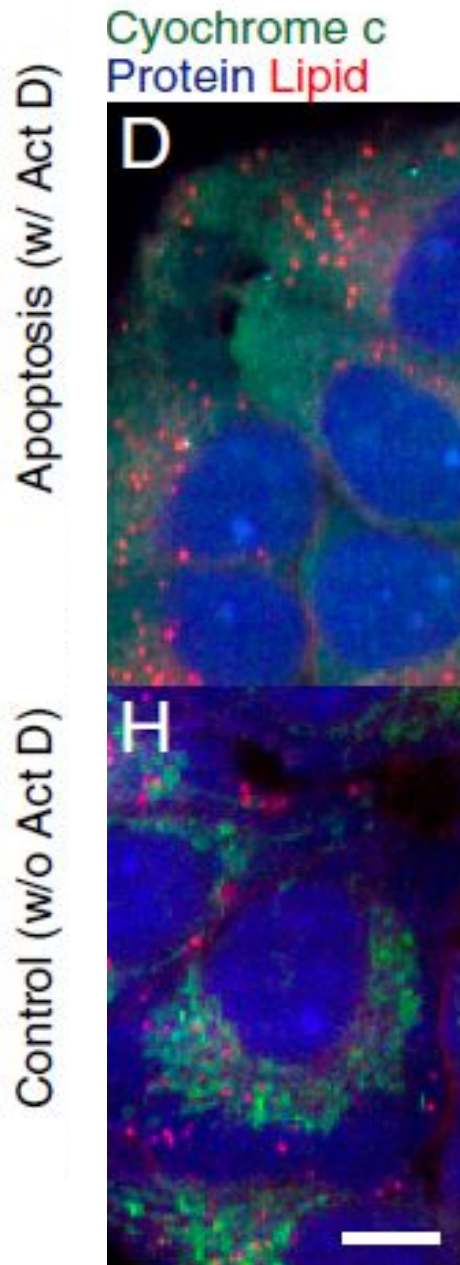
Спектр КР несет информацию о переходах между колебательными подуровнями, то есть о колебаниях атомов.

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

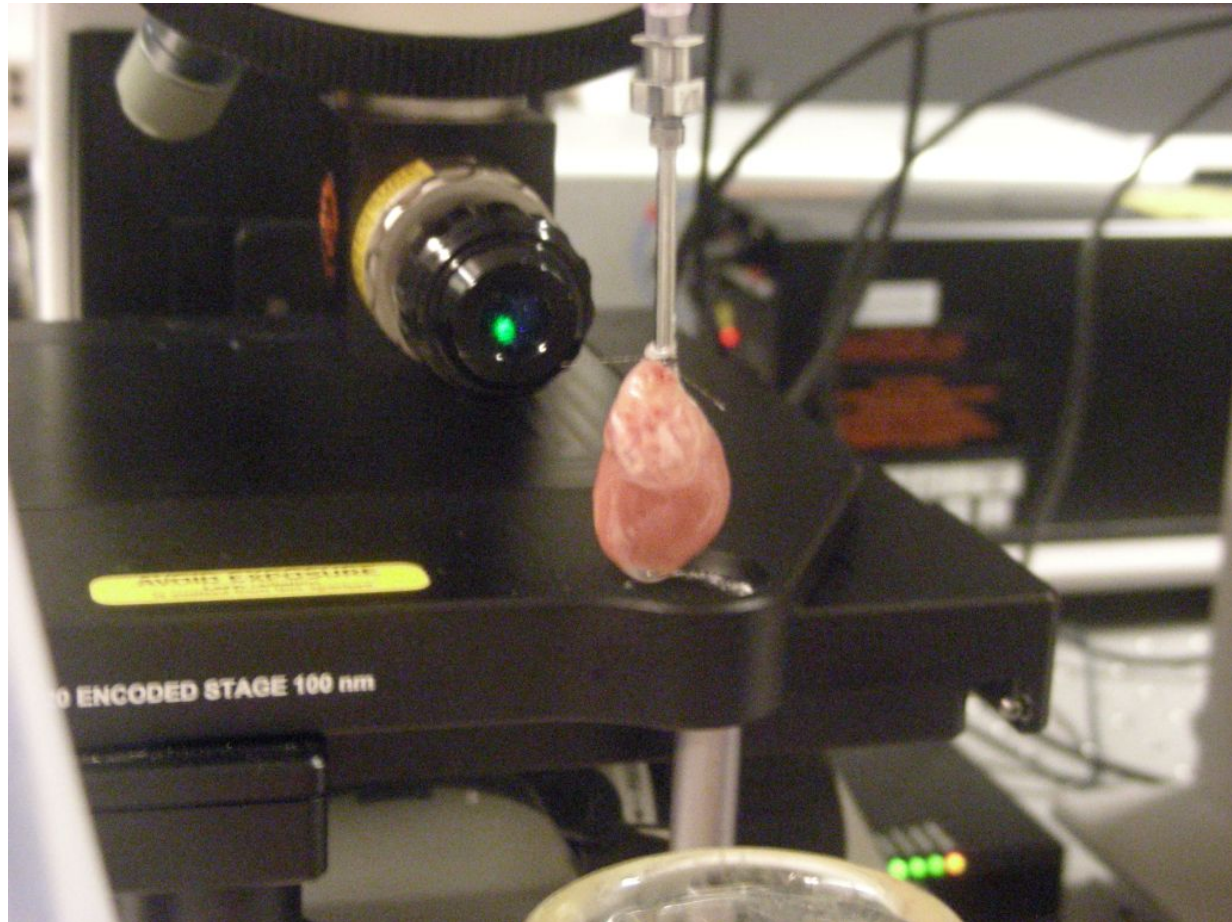


Возможности КР: картирование клеток label-free



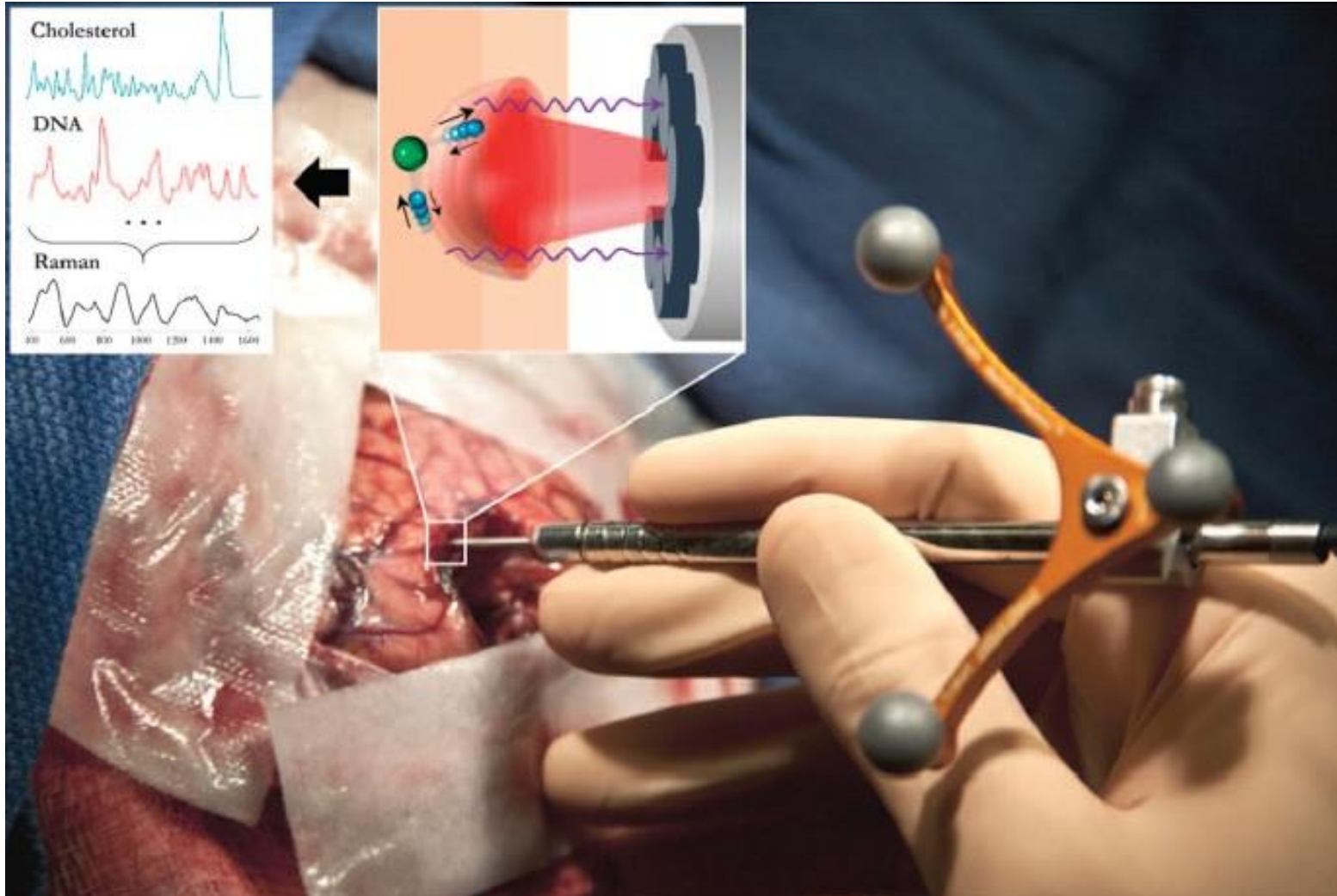
КР-карта распределения
веществ в клетке в псевдо-
цвете в норме и при апоптозе:
цитохром С, белки, липиды

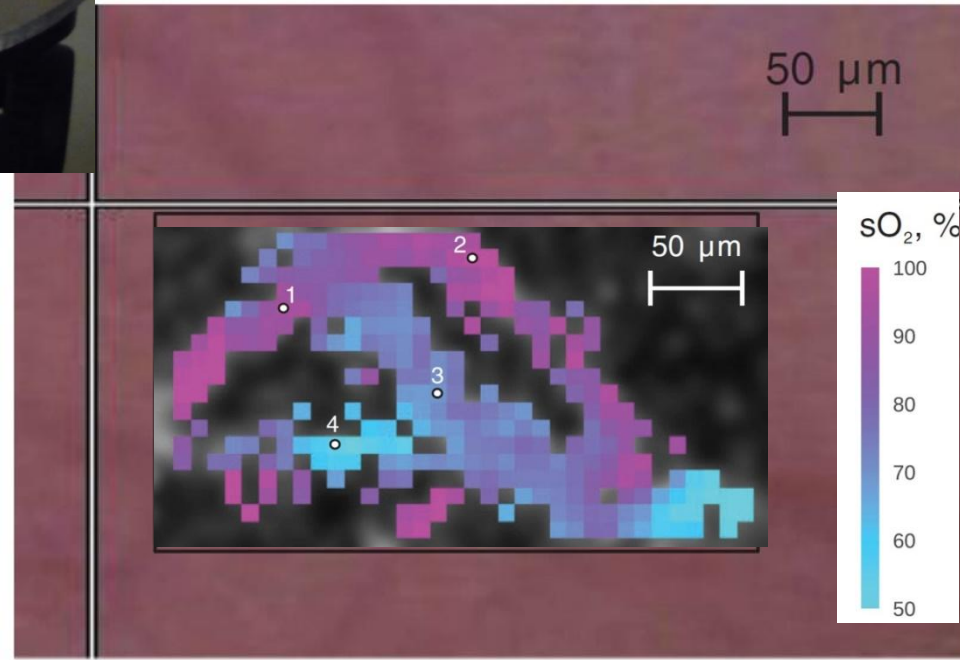
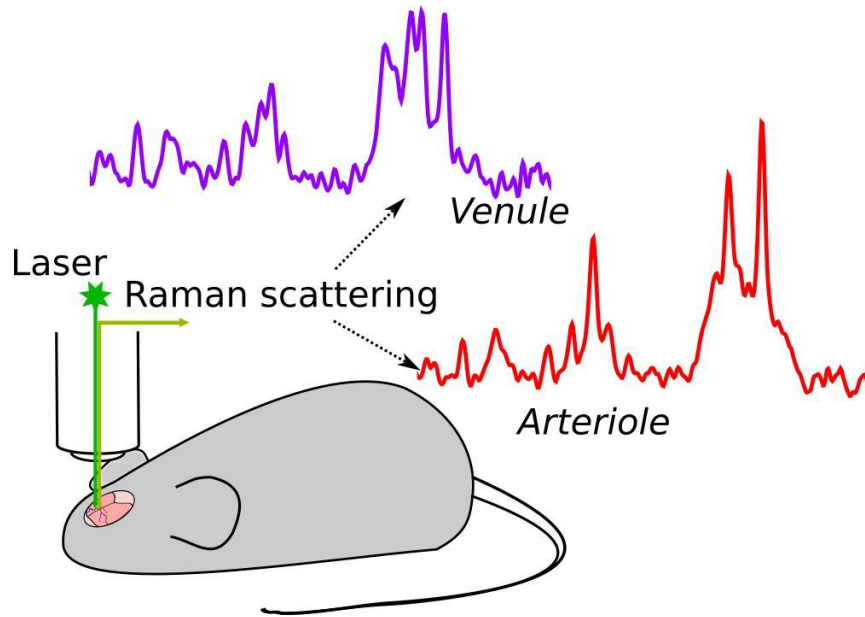
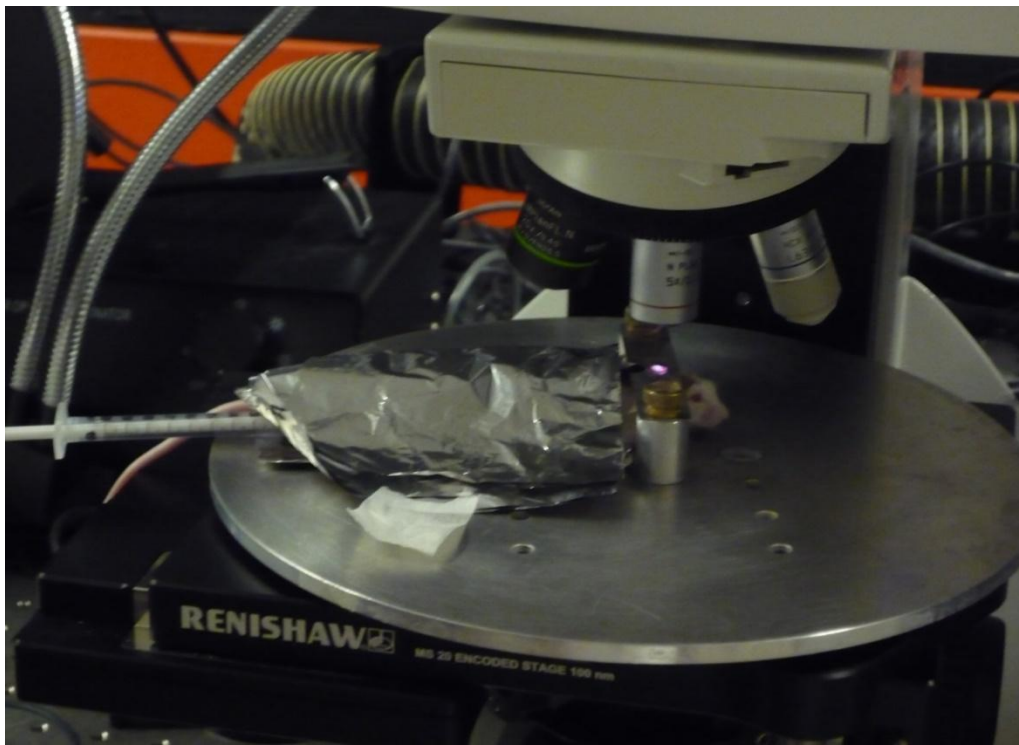
КР позволяет исследовать молекулы даже в целых органах *ex vivo*



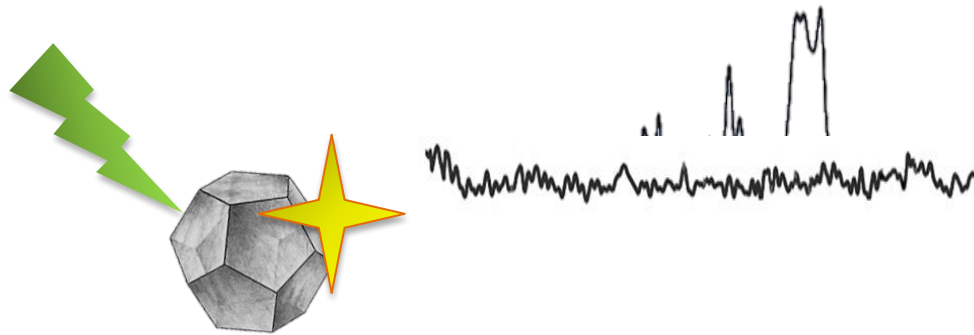
N.A. Brazhe et al., 2013

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





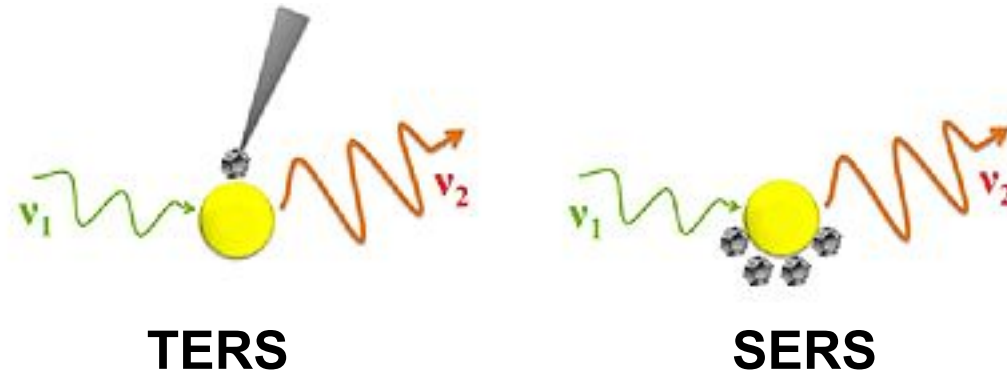
Основная проблема КР – низкая интенсивность



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).



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

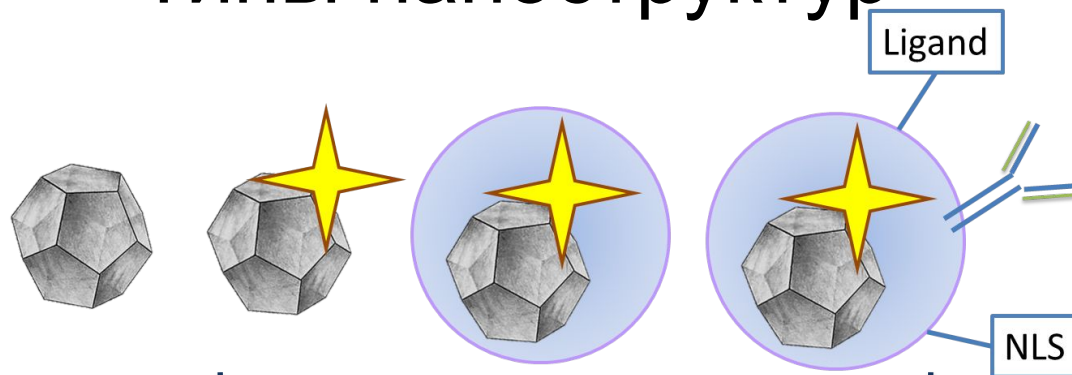
Усиление сигнала ГКР от молекул может сильно варьировать во времени в связи с факторами:

- 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

Работа с низкой концентрацией молекул

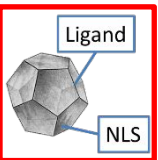
Молекулы внутри клеток и органелл!

Молекулярные сенсоры (с молекулой-репортером)

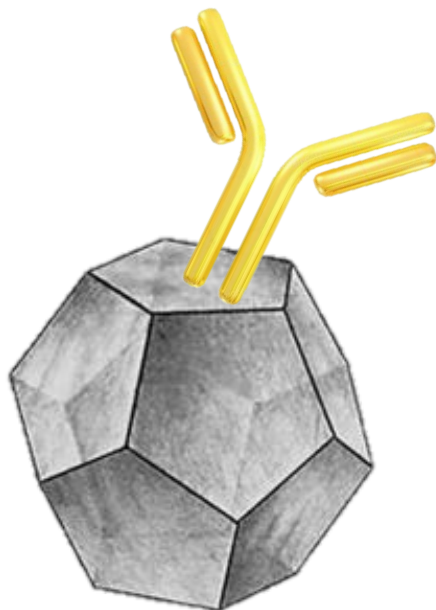
Распределение молекул
высокое разрешение!

pH- и глюкозо-метры

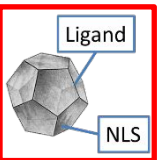
iSERS
(иммуноКР)



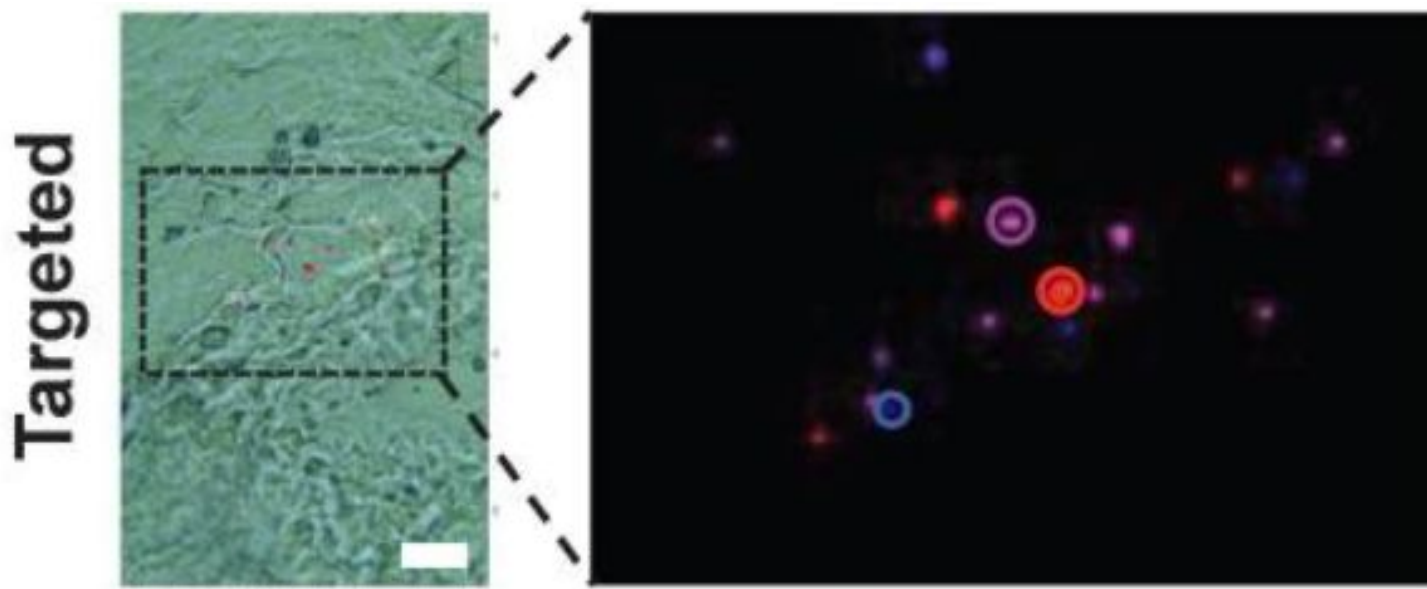
Иммуно-ГКР



Сочетает в себе специфичность
иммунохимии и чувствительность ГКР



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

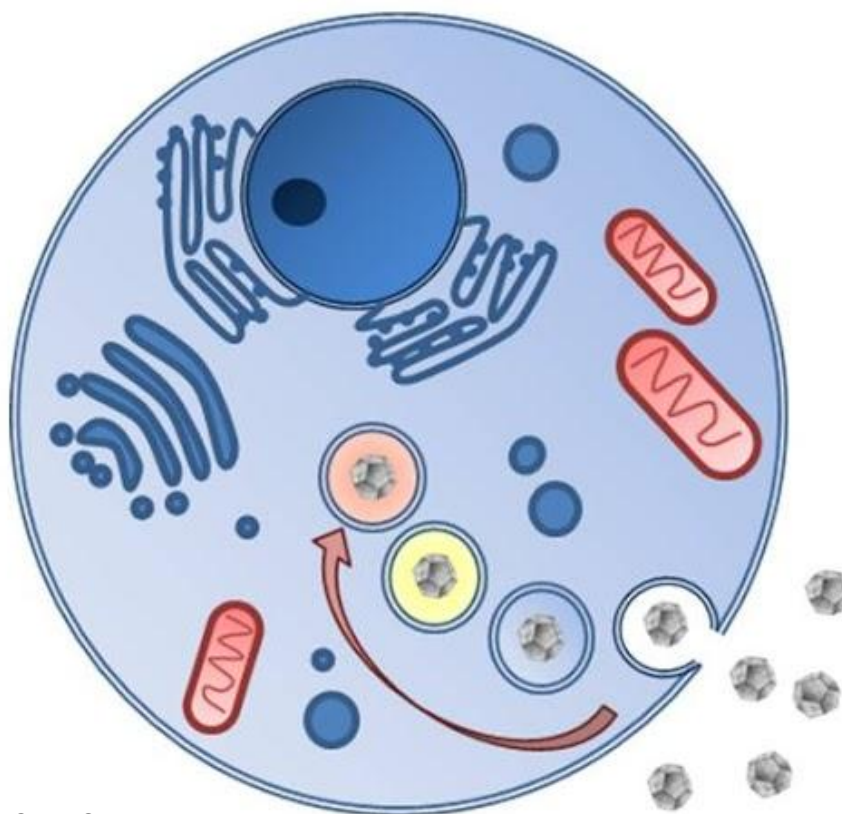


anti-ICAM-1 (purple), anti-VCAM-1 (red), and anti-P-selectin (blue)



ГКР рН-метры

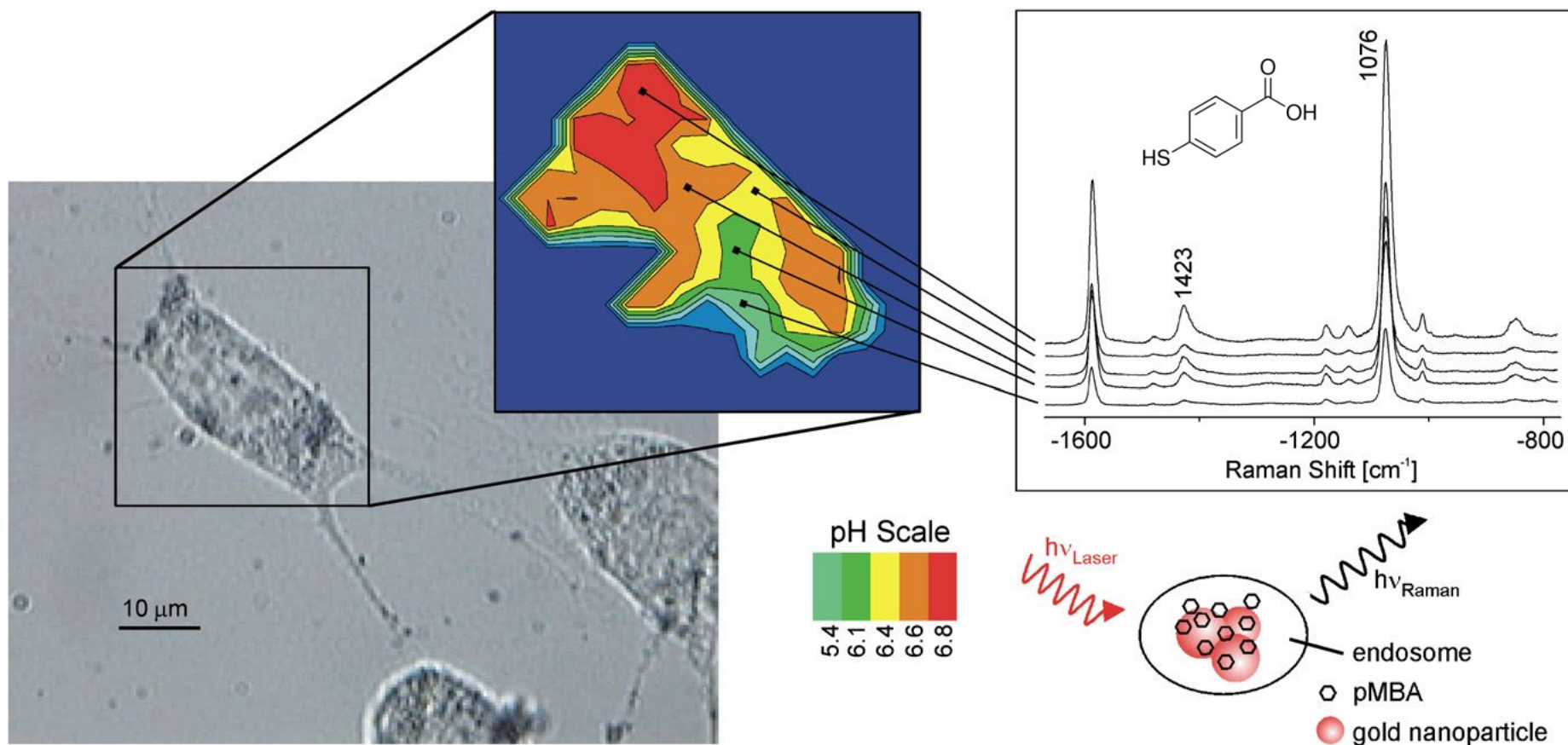
Картирование клеток с помощью молекул-репортеров, адсорбированных на наночастицы при эндосомальном введении





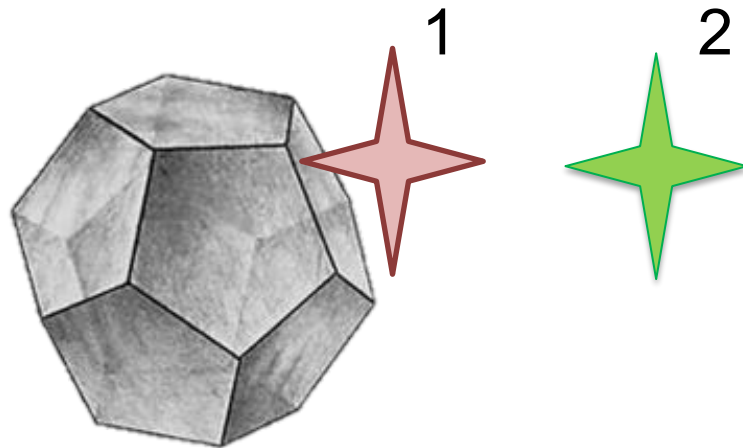
ГКР рН-метры

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



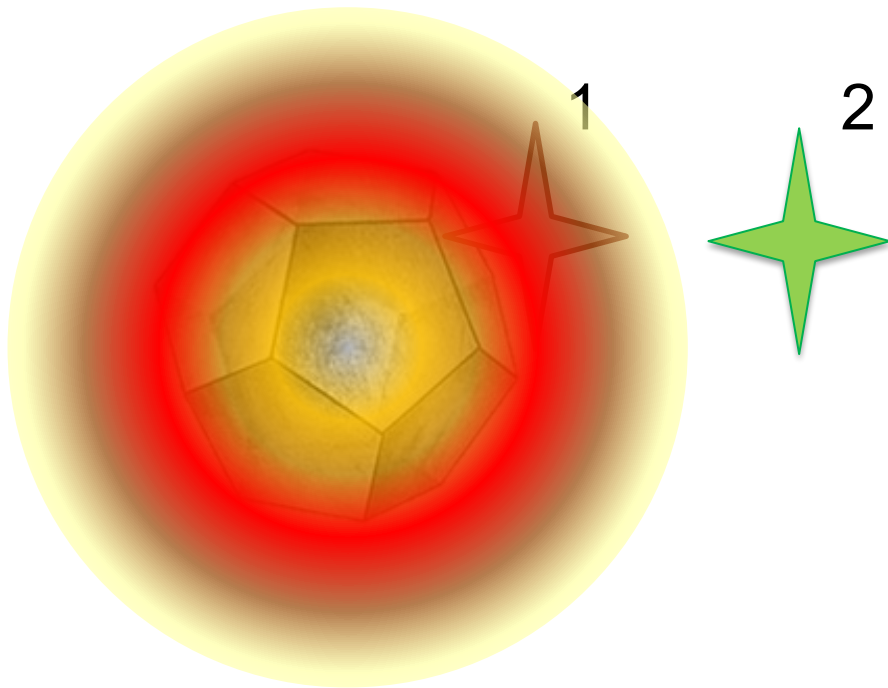
Основное ограничение ГКР – быстрое затухание усиления при удалении молекулы от наноструктуры

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



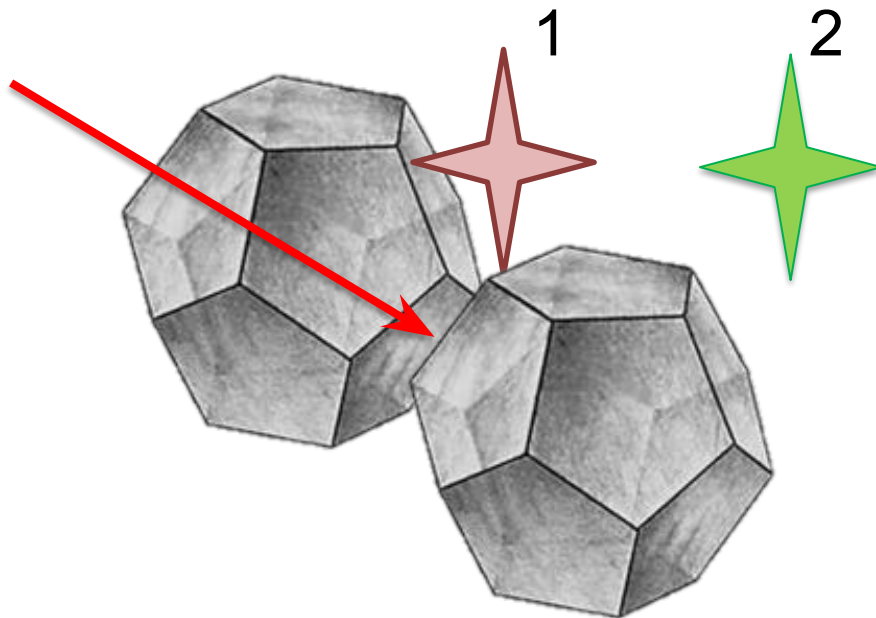
Основное ограничение ГКР – быстрое
затухание усиления при удалении
молекулы от наноструктуры

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



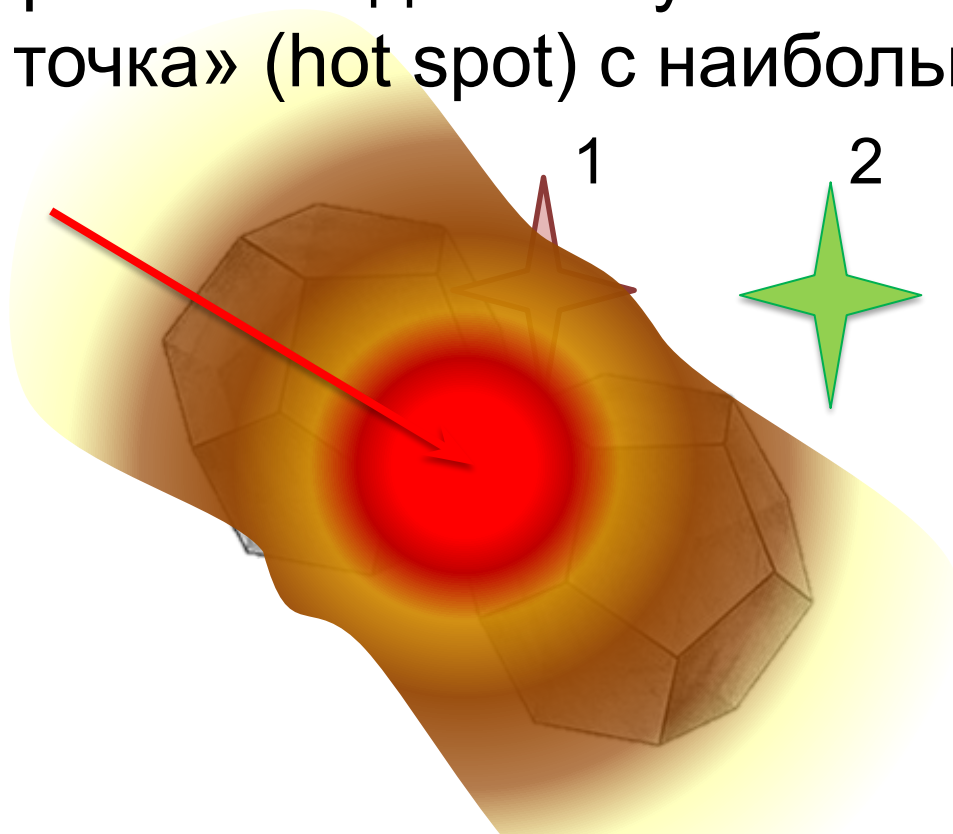
Основное ограничение ГКР – быстрое затухание усиления при удалении молекулы от наноструктуры

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

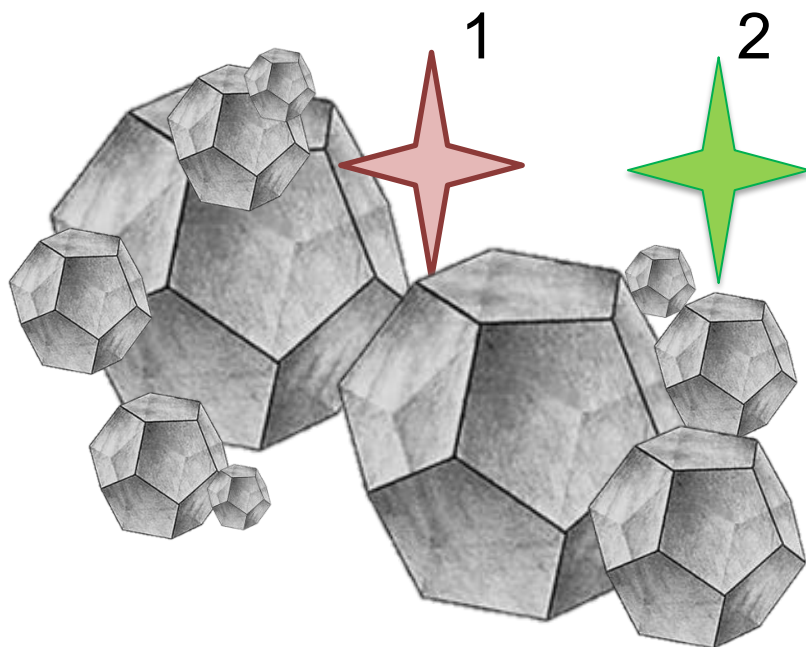


Основное ограничение ГКР – быстрое затухание усиления при удалении молекулы от наноструктуры

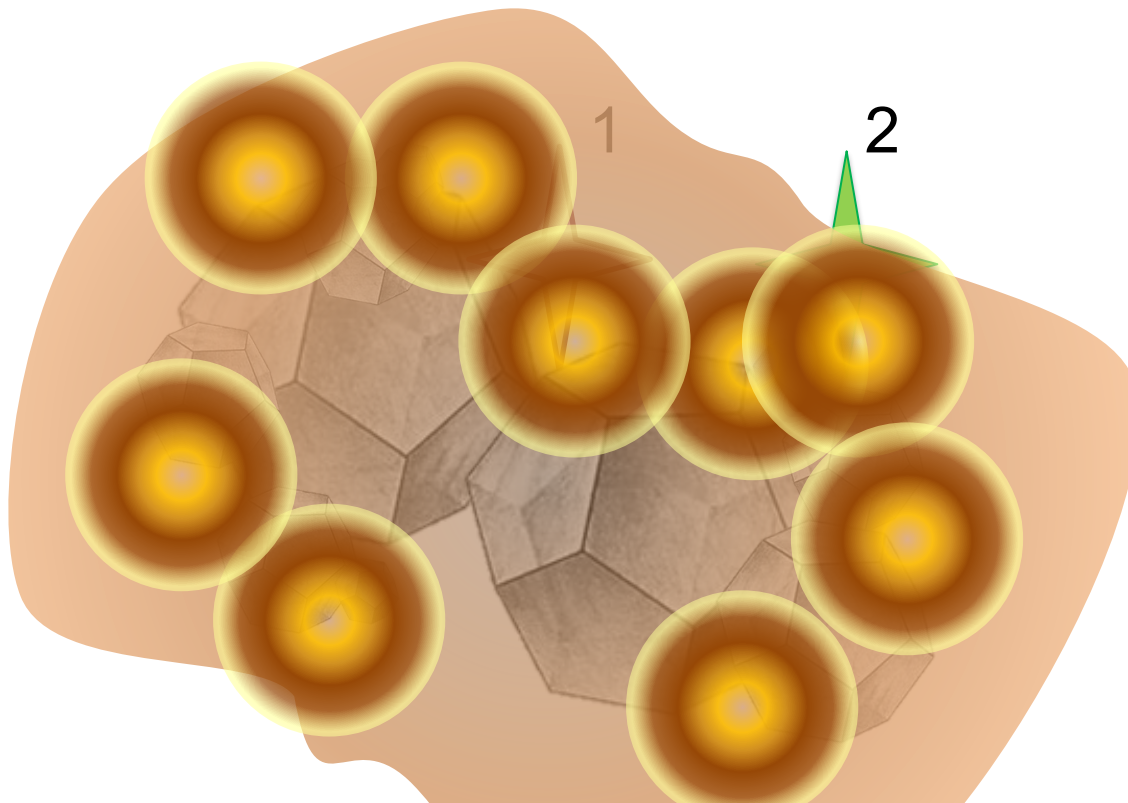
В месте соприкосновения наноструктур/острых граней/впадин/выпуклостей образуется т.н. «горячая точка» (hot spot) с наибольшим усилением сигнала

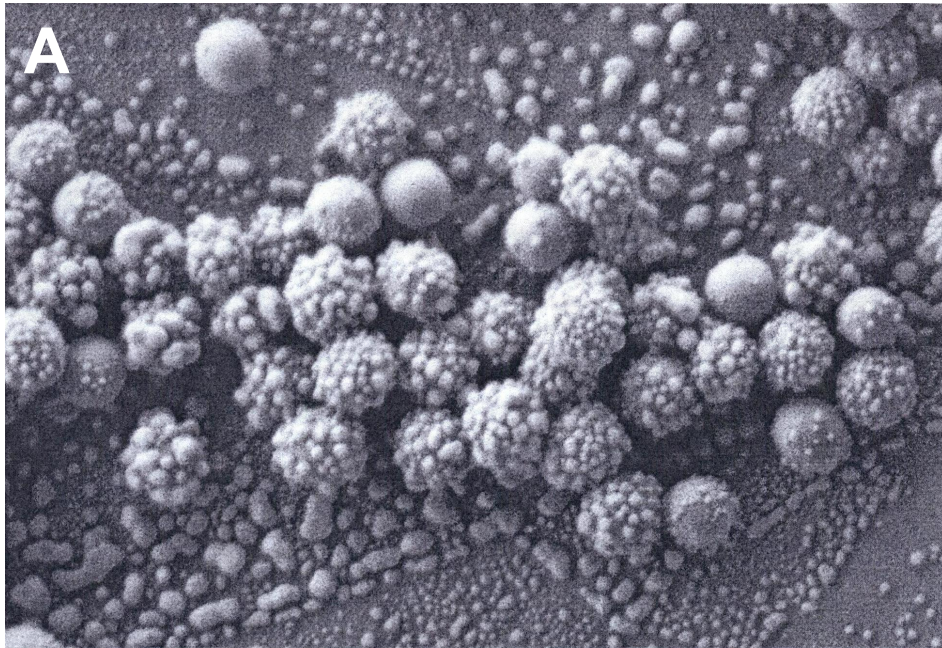


Можно создать иерархические
наноструктуры со множеством горячих
точек и далекодействующим усилением!



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

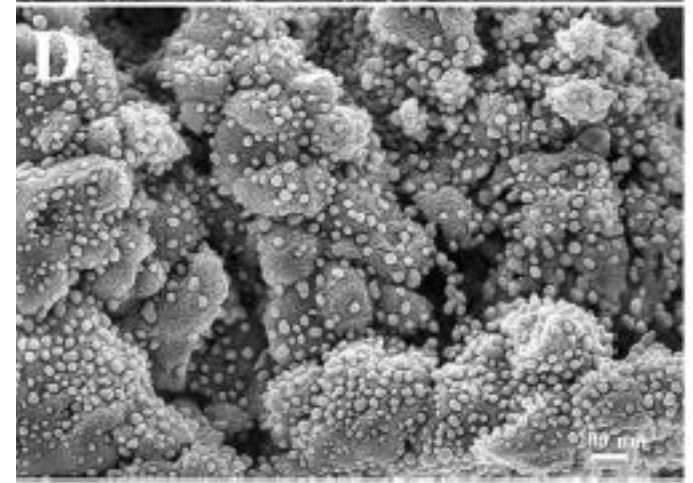
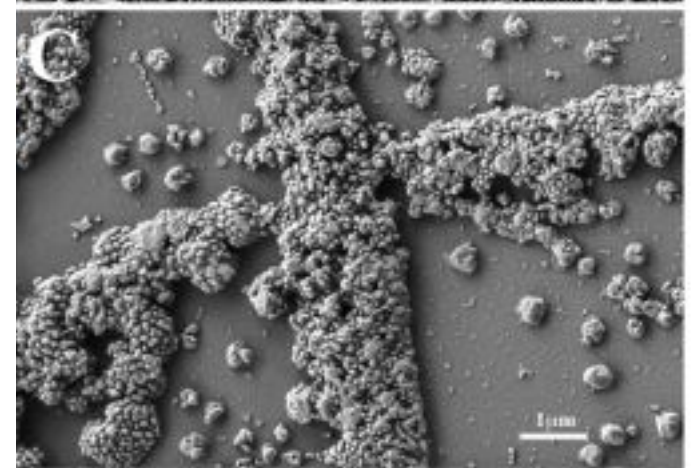
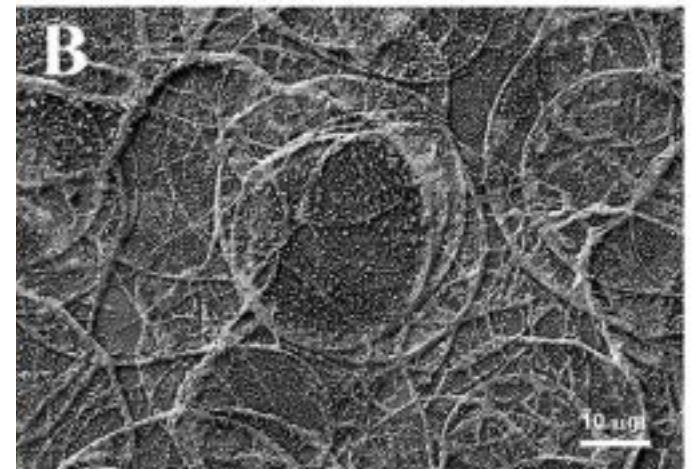




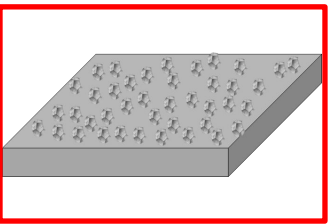
Mag = 50.00 K X 1 μm WD = 3.1 mm Signal A = SE2
NVision 40-38-50 System Vacuum = 1.42e-006 mbar Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry
Date: 2 Oct 2013 Photo No. = 3773 Aperture Size = 30.00 μm EHT = 1.00 kV



**Гладкая
поверхность не
дает усиления ГКР**

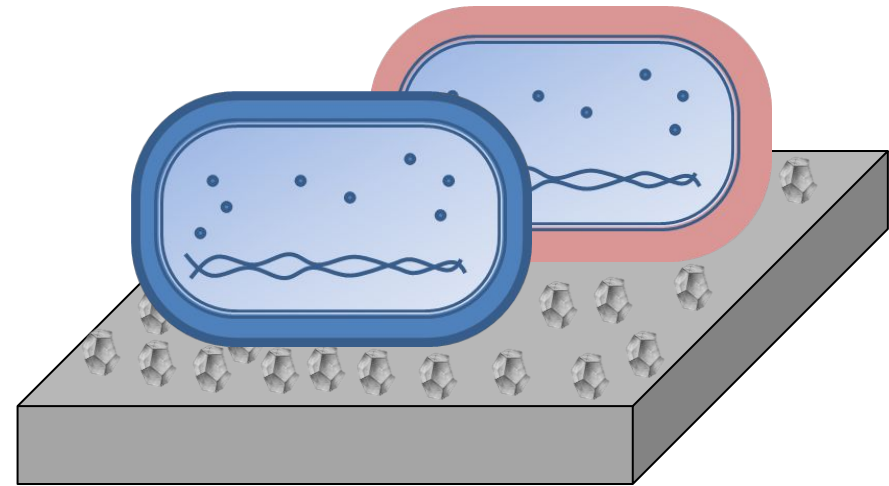


Semenova et al. (2012, 2016), Brazhe (2015), Sarycheva et al. (2016)

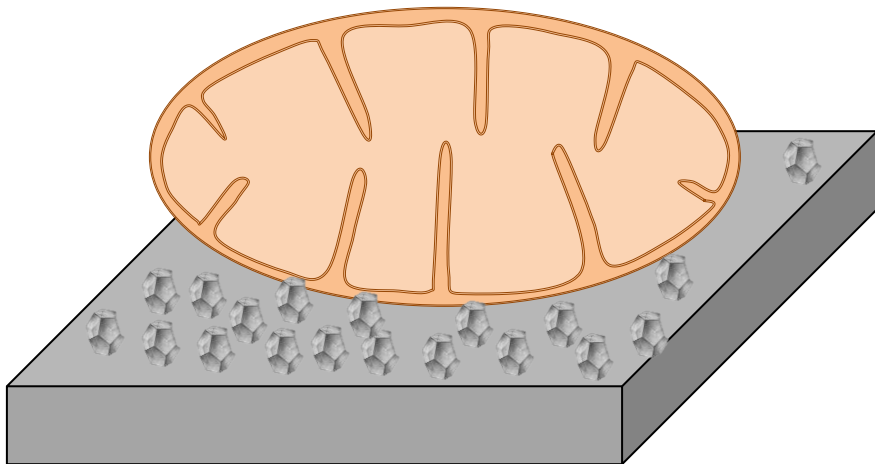


Наноструктурированные поверхности

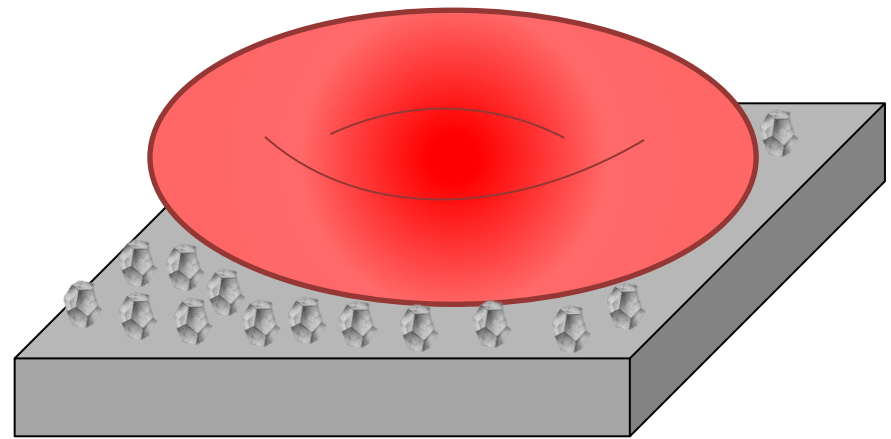
- ✓ Получение дальнедействующего усиления сигнала за счет плазмонного резонанса.
- ✓ Меньше требований к токсичности (ничего не проникает в клетку/органеллу)



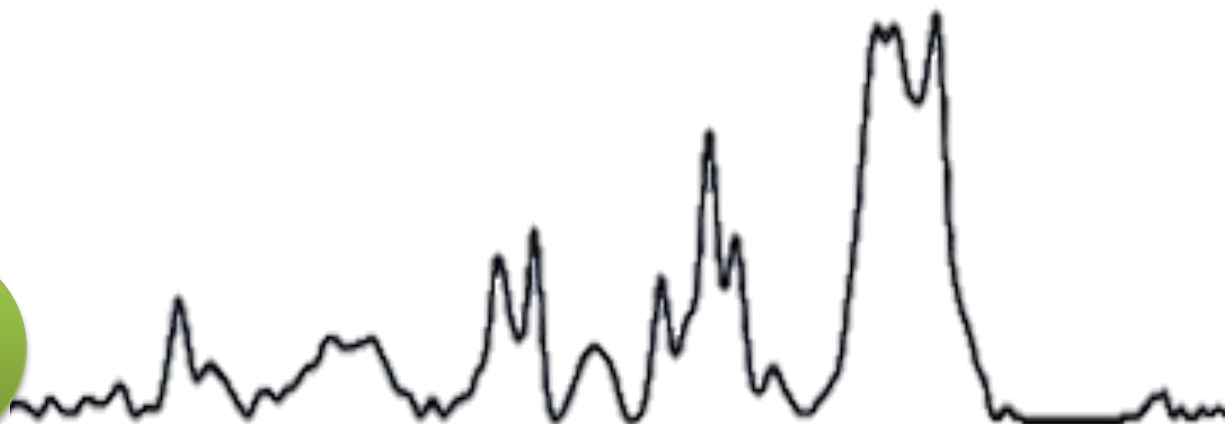
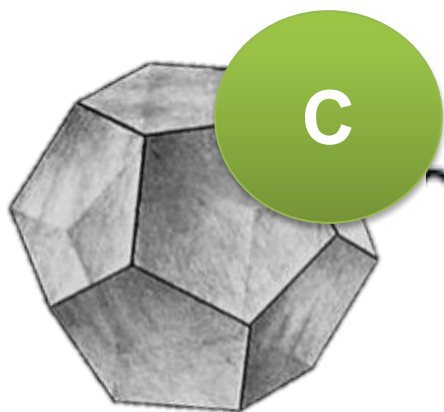
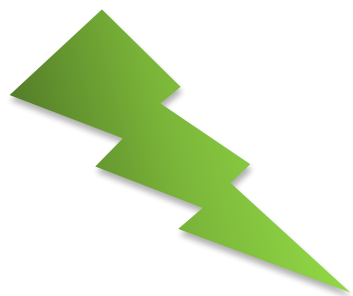
Детекция бактерий



Исследование митохондрий

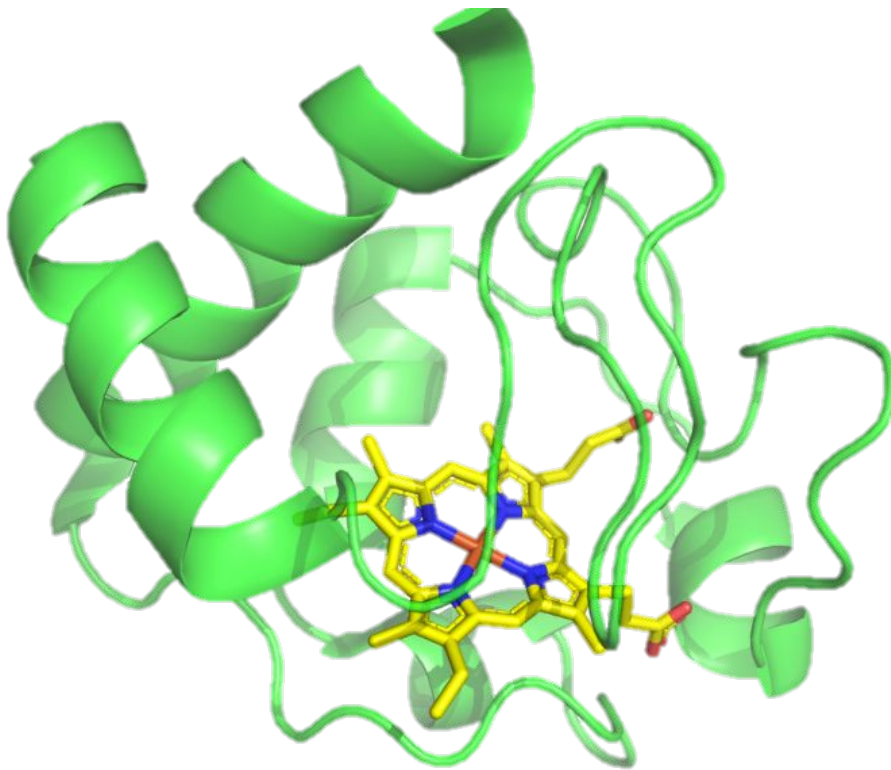


Эритроцитов





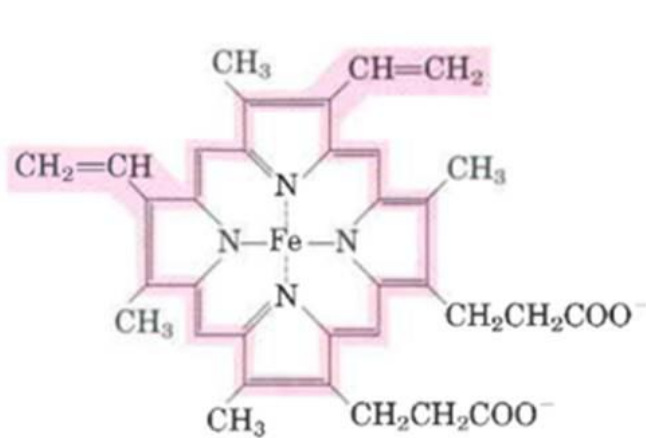
Цитохромы состоят из белковой части и гема



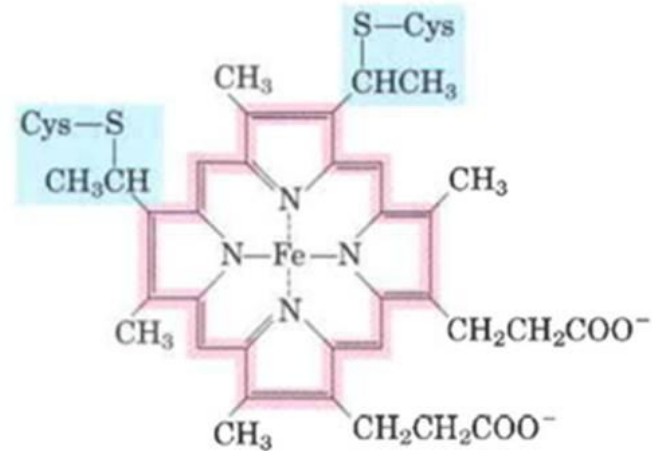
Белковая
часть

гем

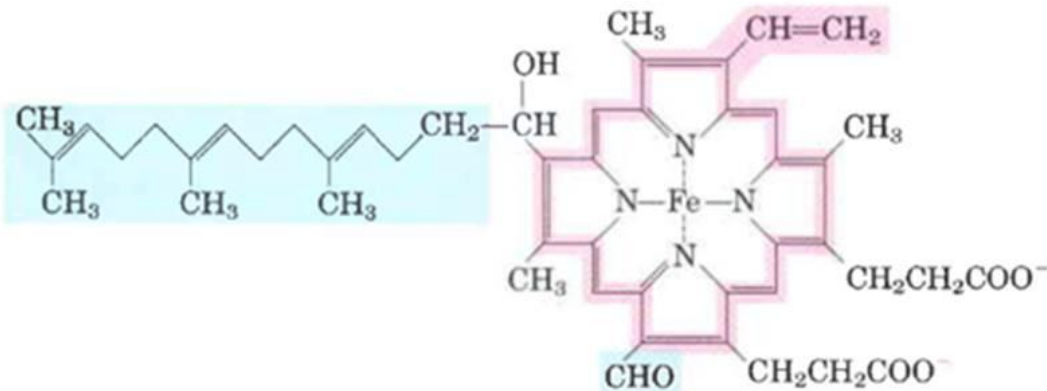
Гемы различных цитохромов очень похожи:
порфириновое кольцо с железом + боковые радикалы



Гем *b*

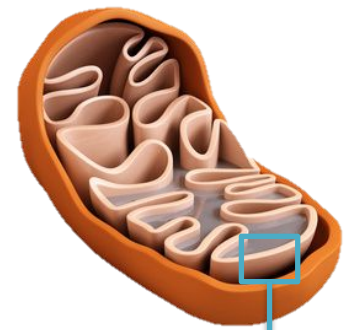


Гем *c*

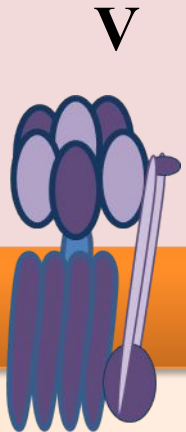
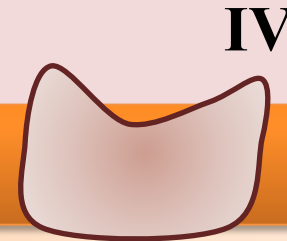
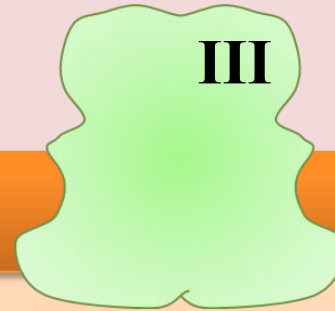
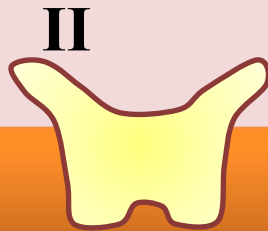
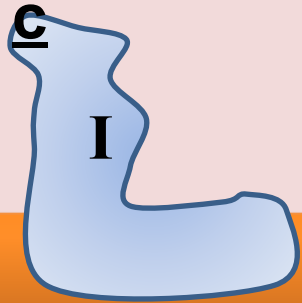


Гем *a*

Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ)



Матрик

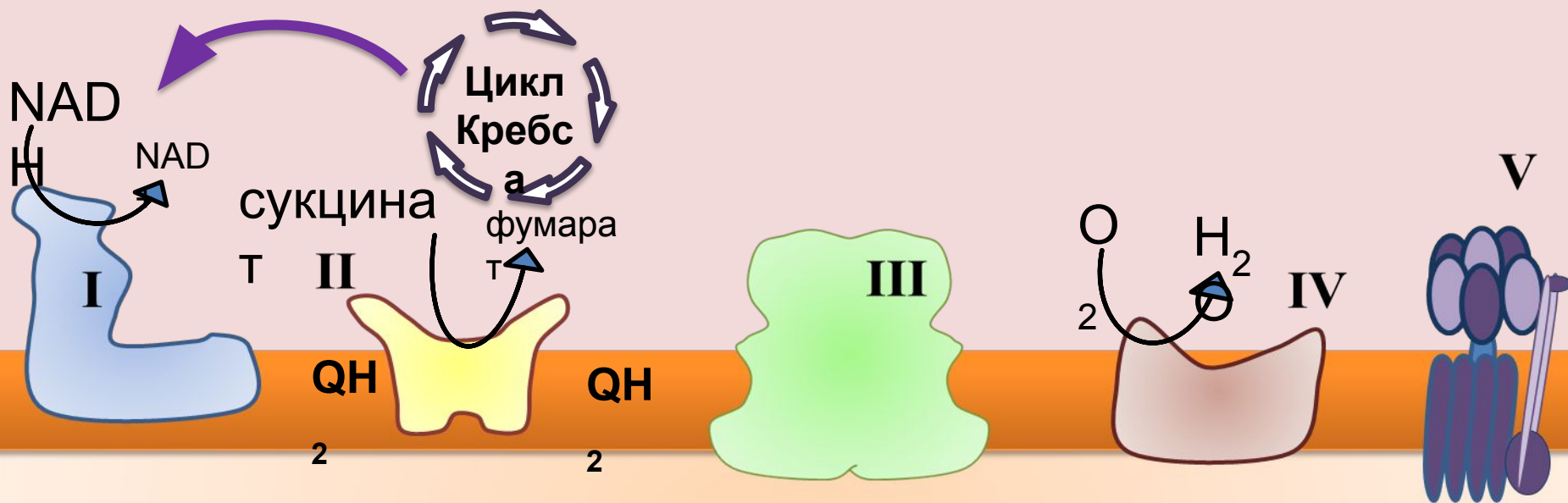


Межмембранное
Пространство
(ММП)

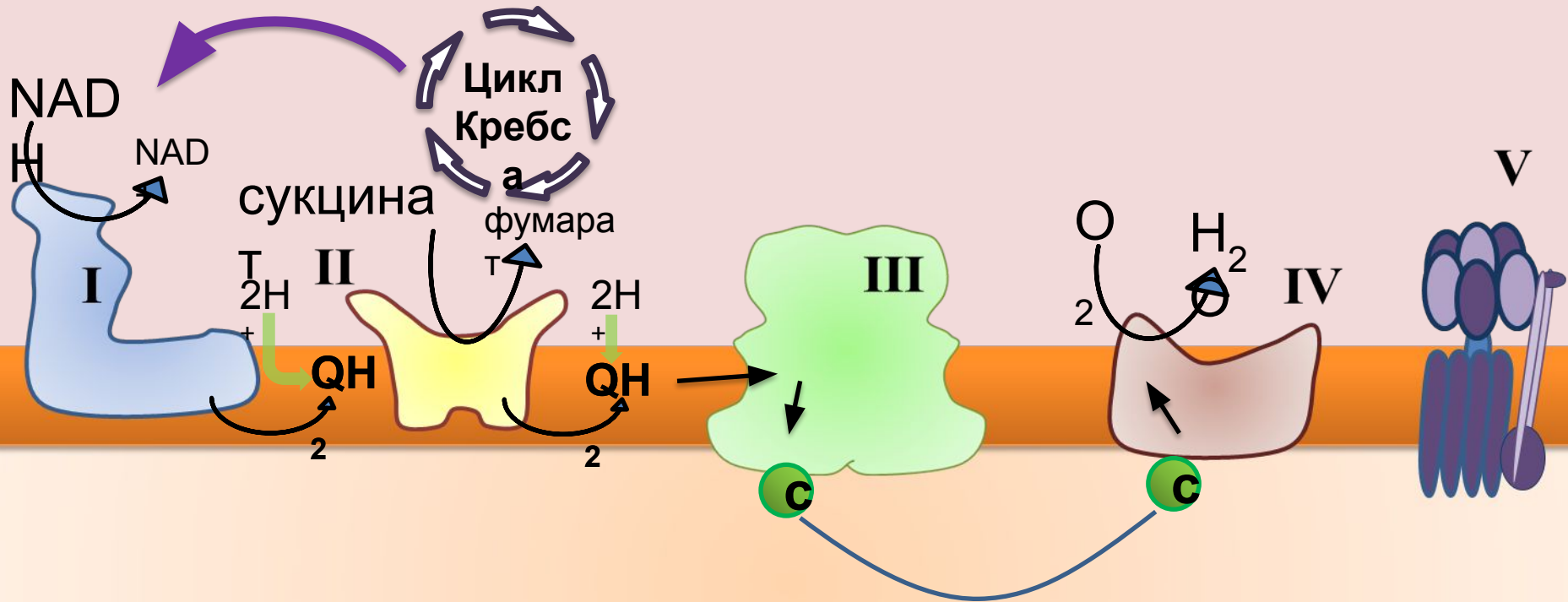
Внутренняя
мембрана

Внешняя
мембрана

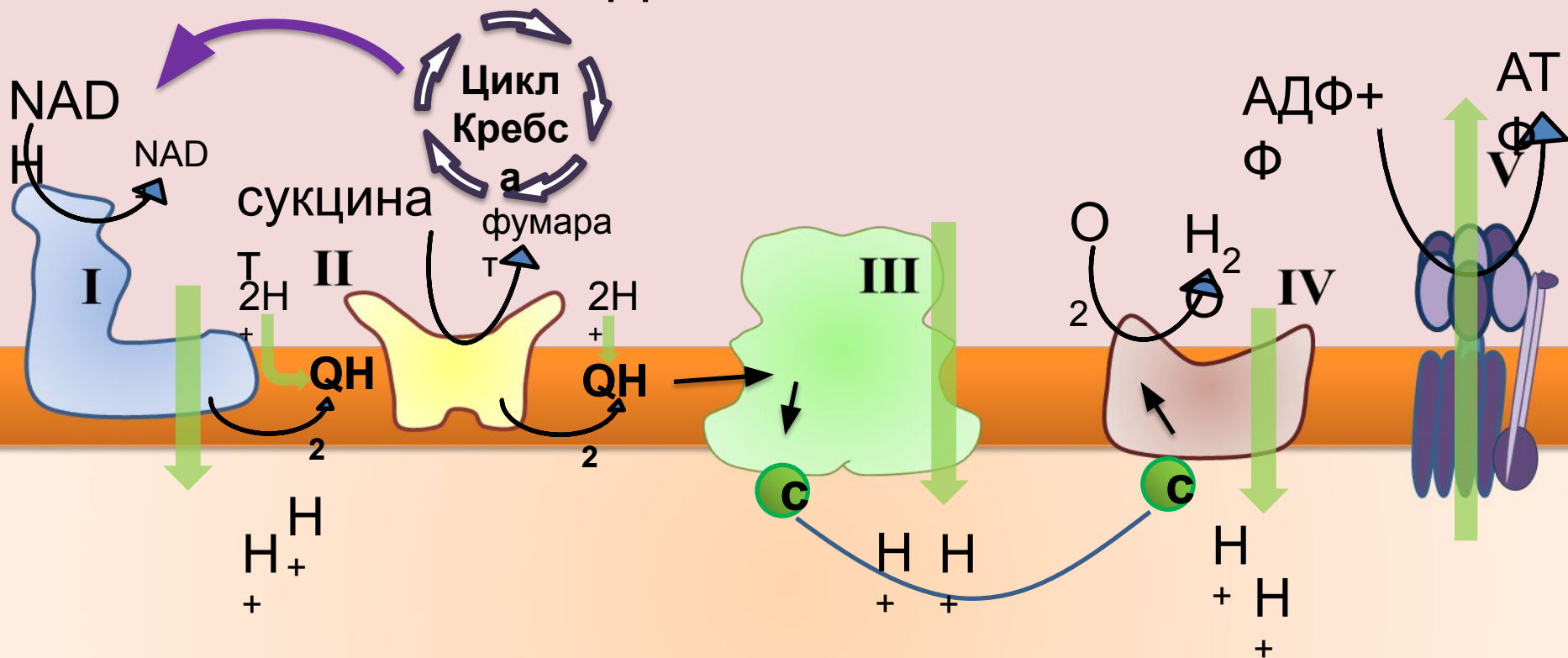
ЭТЦ получает электроны от цикла Кребса через КI (NADH) и КII (сукцинат)



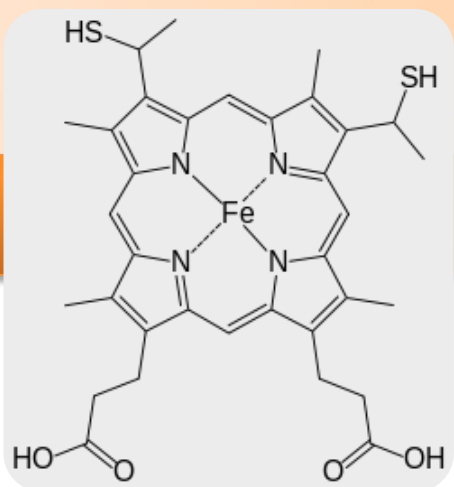
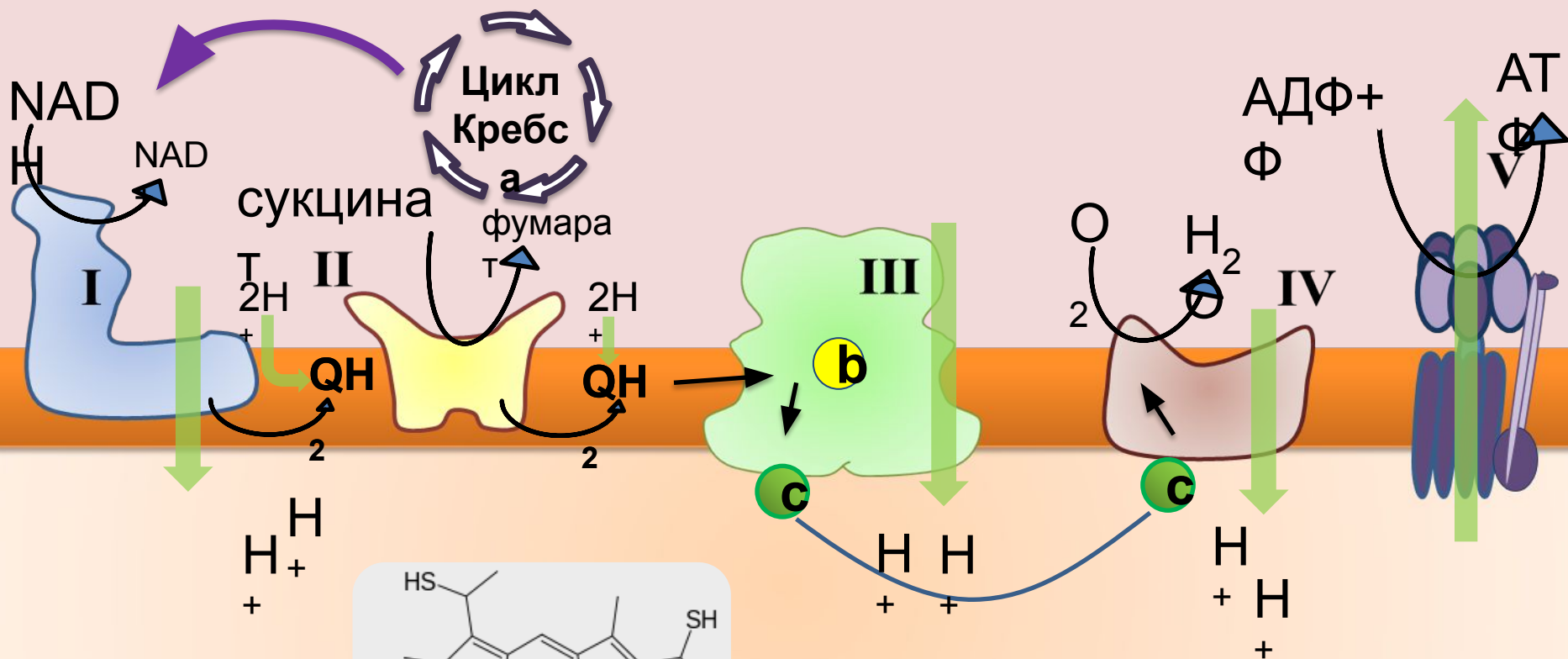
ЭТЦ получает электроны от цикла Кребса через КI (NADH) и КII (сукцинат)



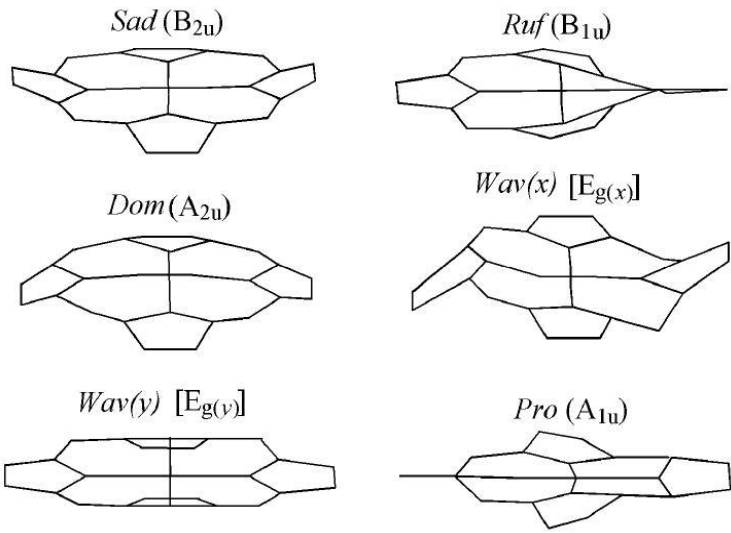
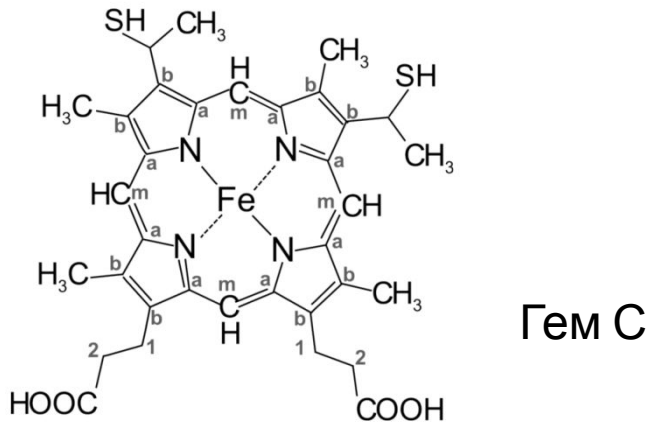
Перенос электронов сопровождается переносом протонов, что является движущей силой для синтеза АТФ



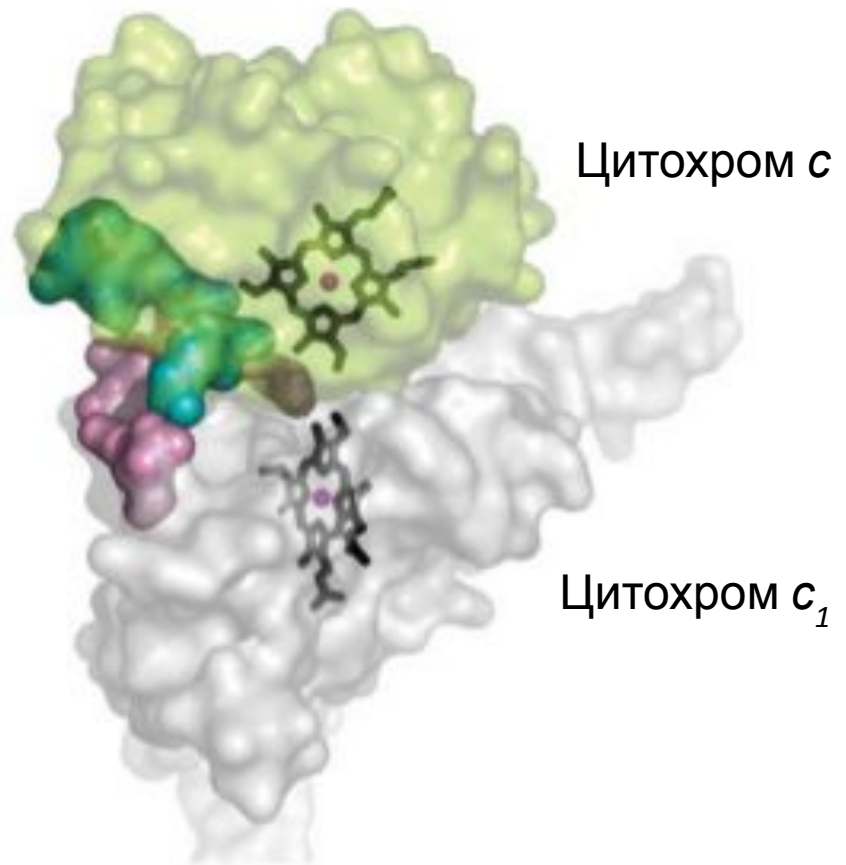
Цитохромы (переносчики электронов) – гемовые белки; обладают интенсивным КР



Белок → Конформация гема → Ориентация → Перенос электрона

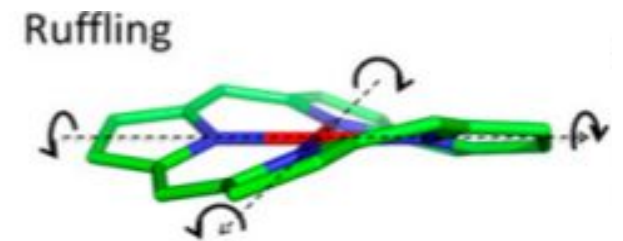
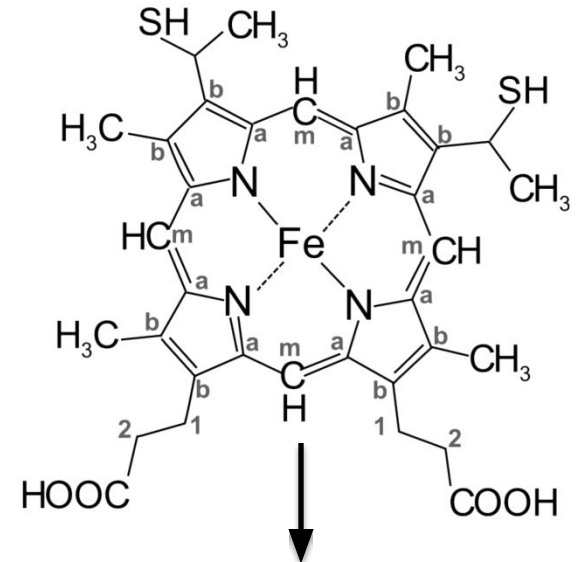
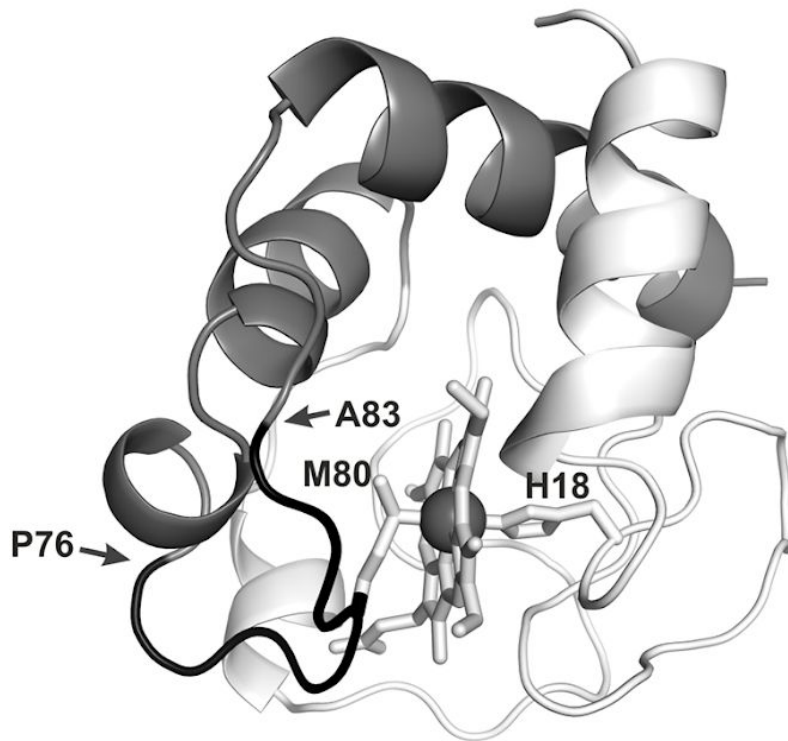


Ma et. al., Biochemistry. 1998

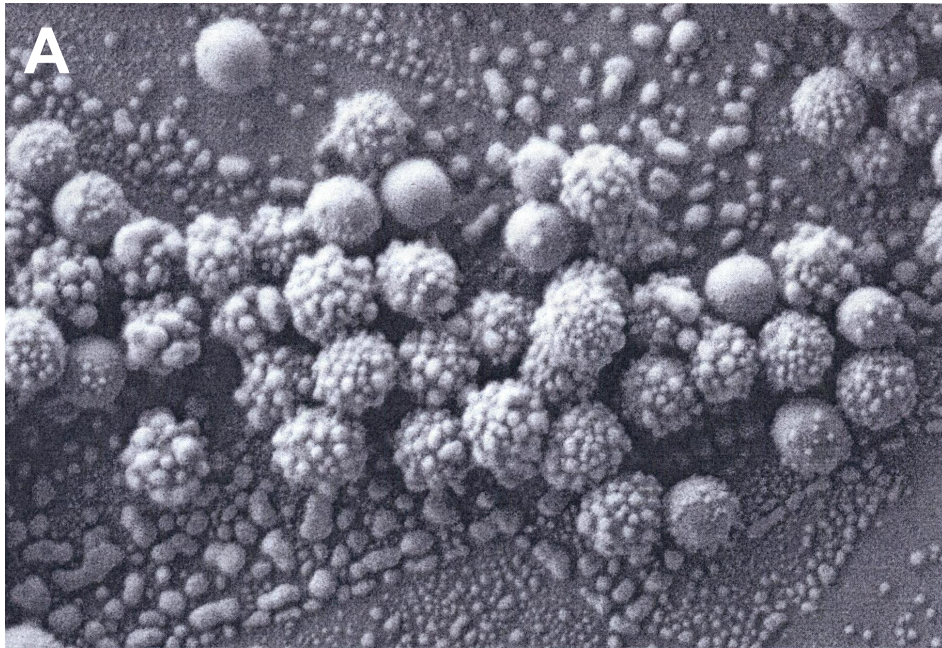


Solmaz S.R.N. and Hunte C.

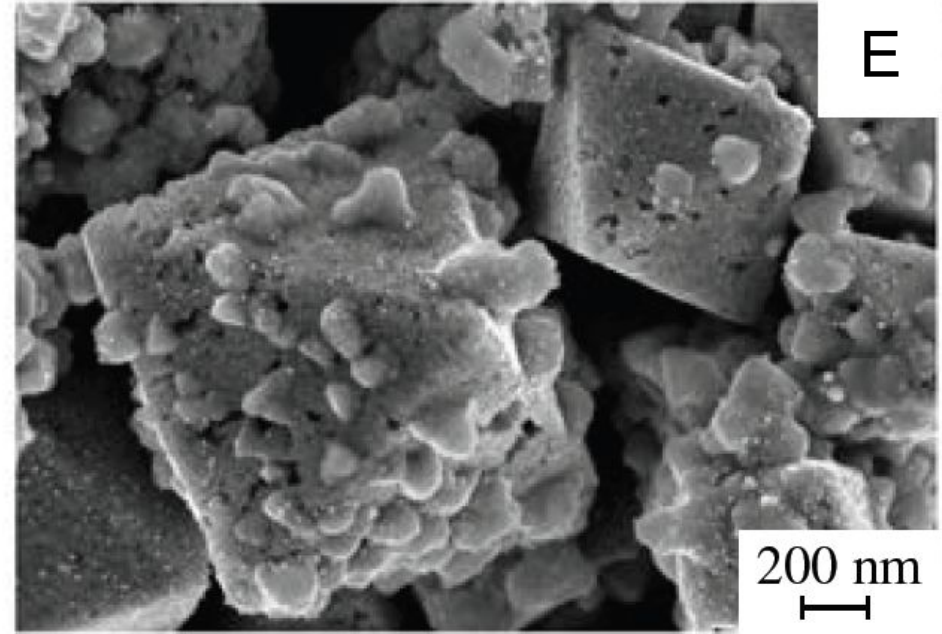
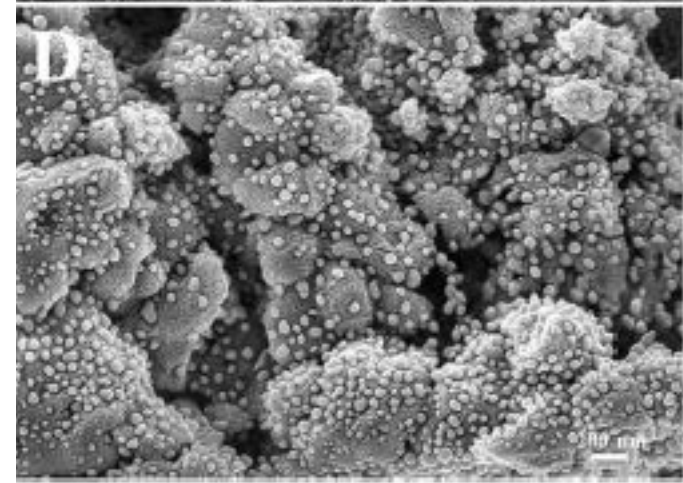
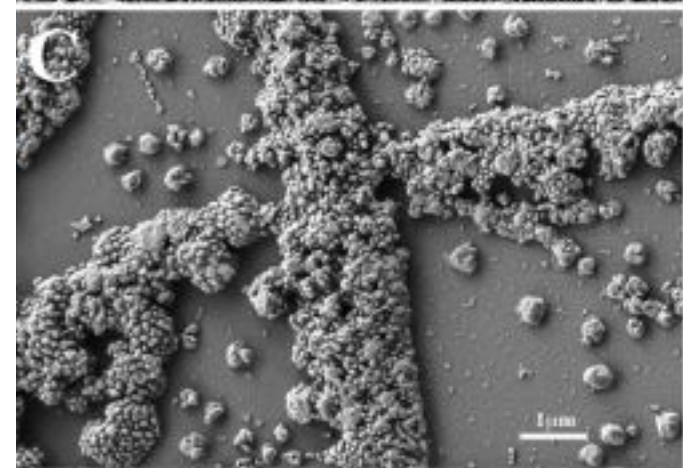
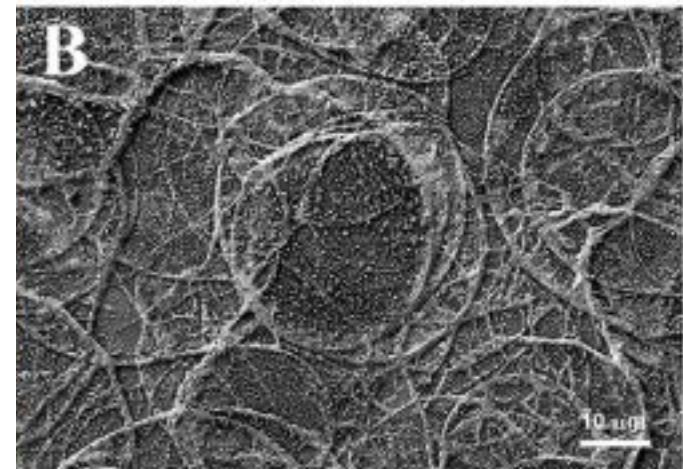
Чем более скручен гем – тем хуже он переносит электроны



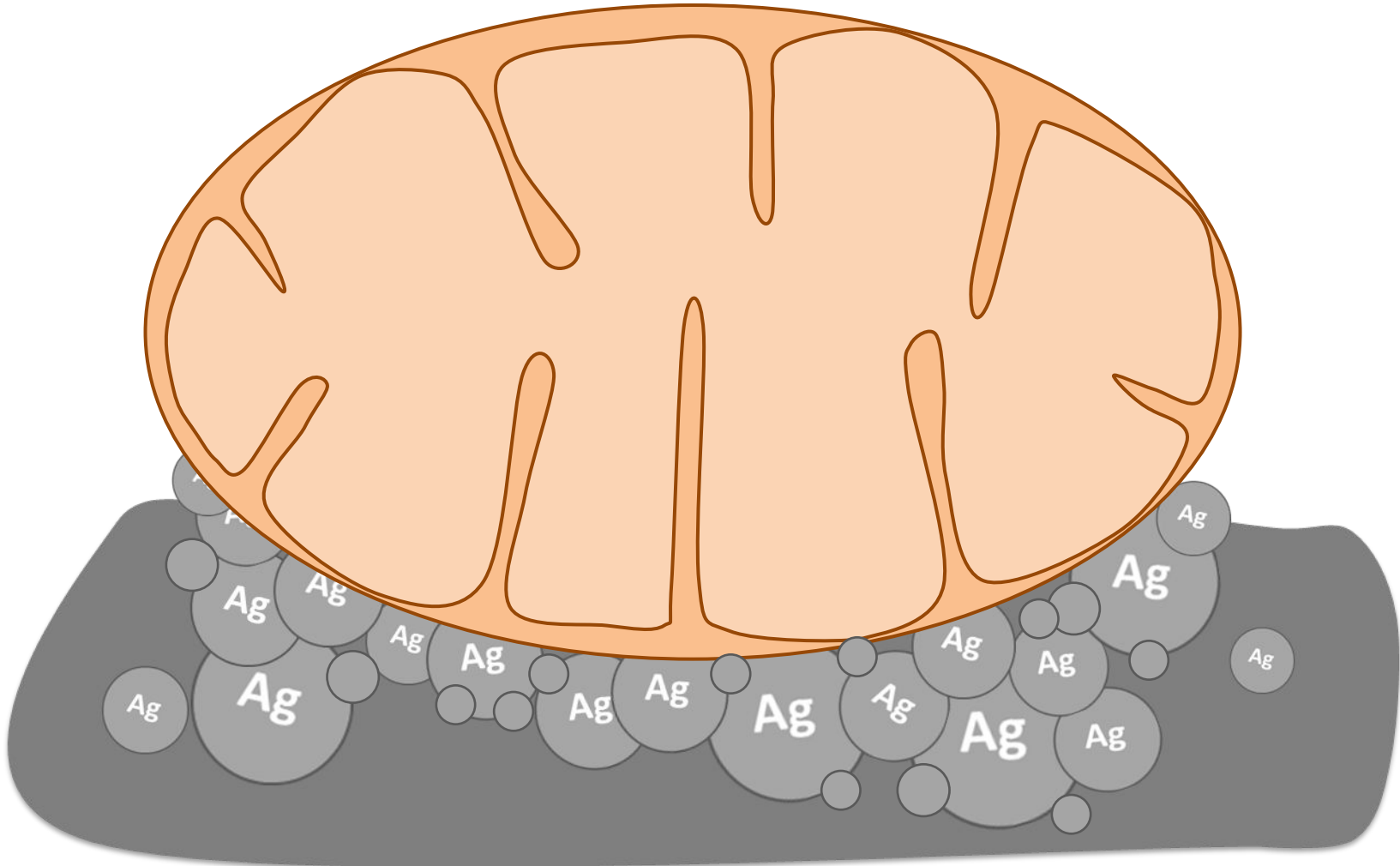
Скрученная конформация
Sun et al. PNAS, 2014



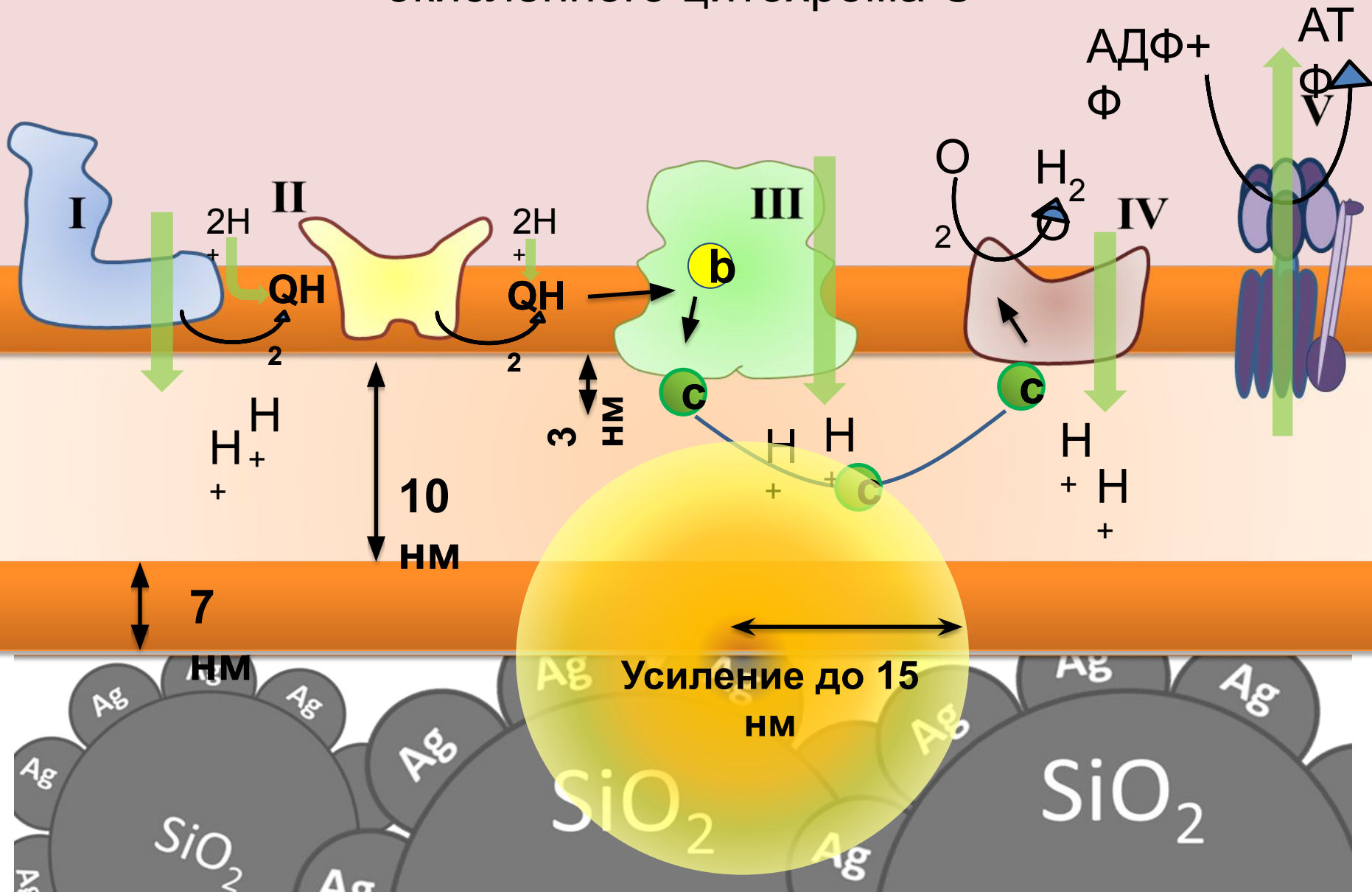
Mag = 50.00 K X 1 μm WD = 3.1 mm Signal A = SE2
NVision 40-38-50 System Vacuum = 1.42e-006 mbar Kurnakov Institute of General



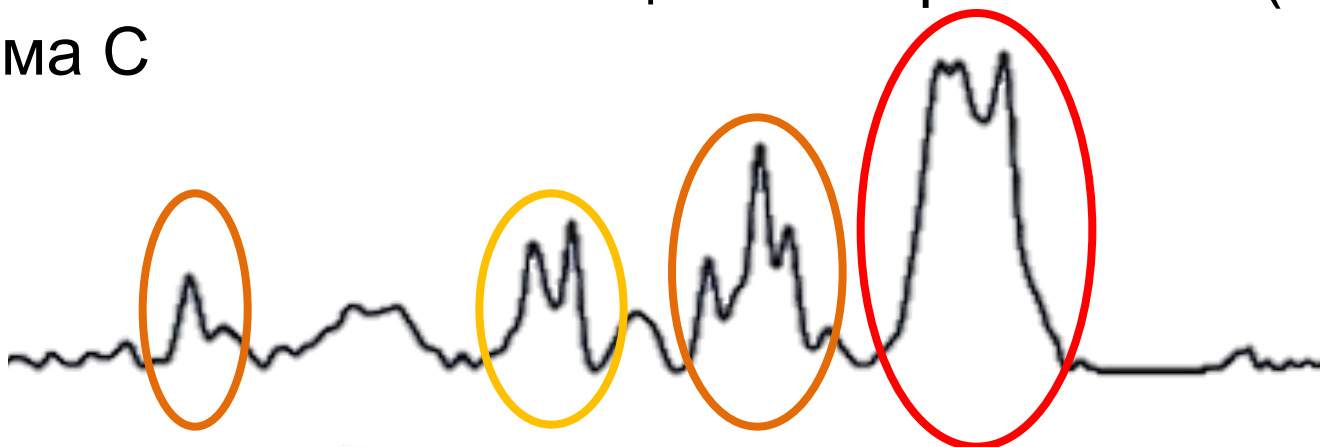
Semenova et al. (2012, 2016), Brazhe (2015), Sarycheva et al. (2016)



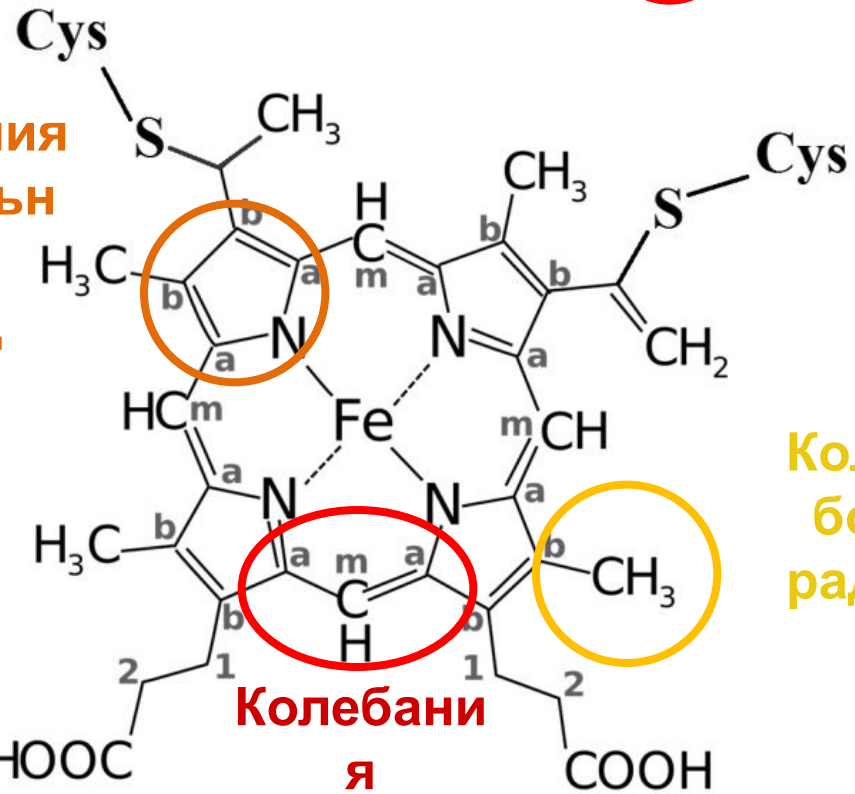
Дальнодействующее усиление сигнала позволило зарегистрировать спектры ГКР только от окисленного цитохрома С



Спектр гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) цитохрома С



Колебания
пиррольных
колец

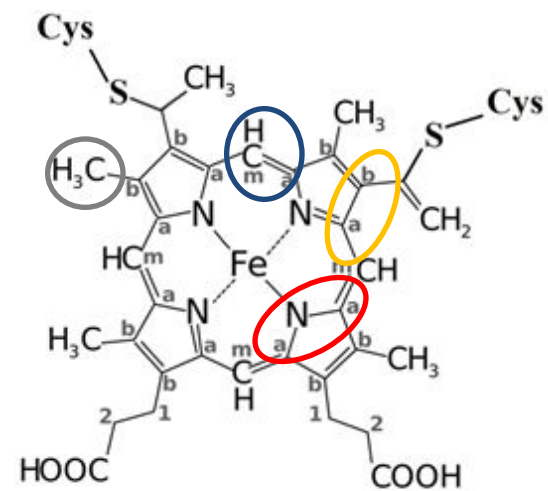
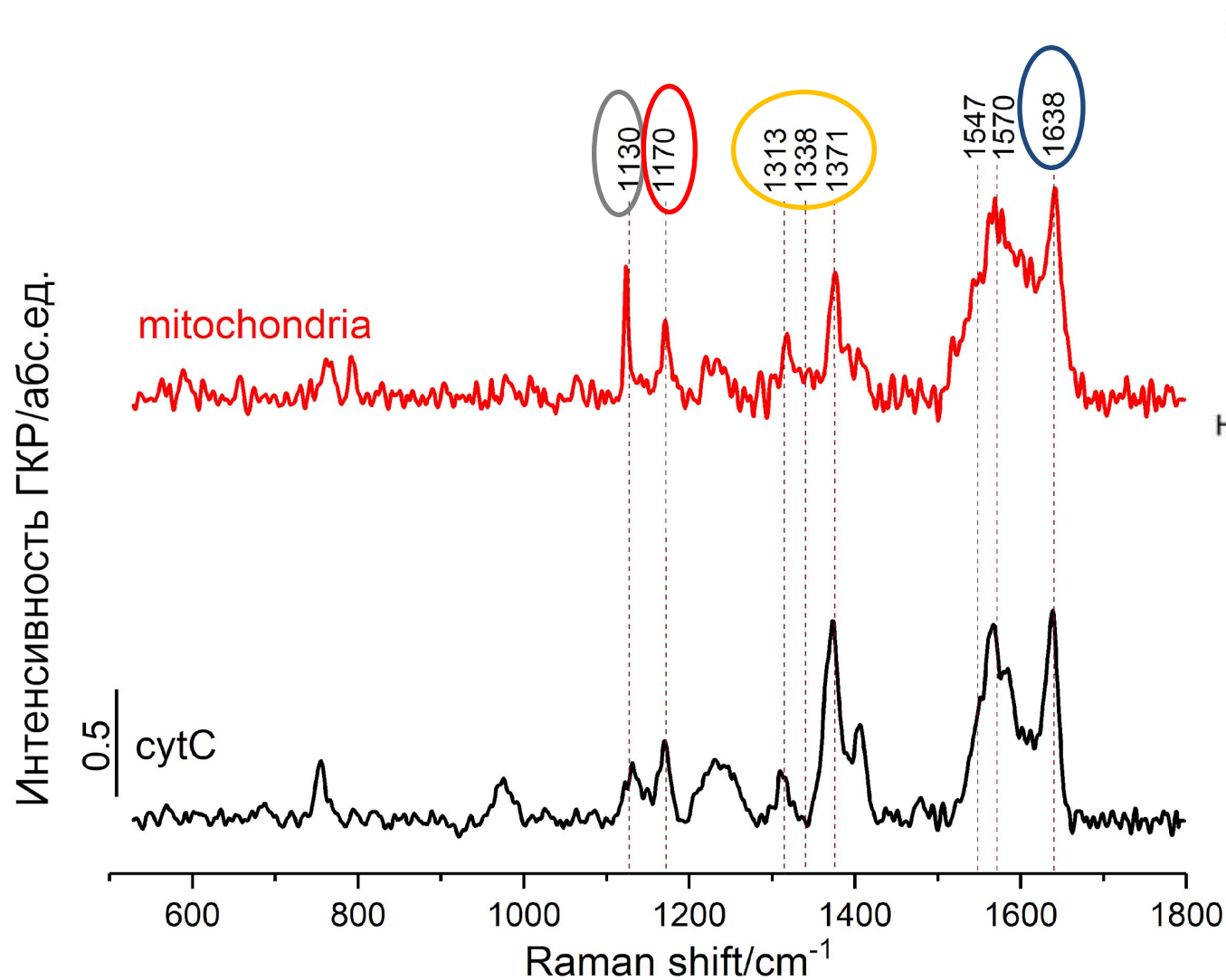


Колебания
боковых
радикалов

Гем
цитохрома
С

Колебания
метиновых

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;

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!