

ИНСТИТУТ  
ЦИТОЛОГИИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

V международная конференция  
«Физика — наукам о жизни»  
16 – 19 октября 2023

Время жизни люминесценции  
квантовых точек как показатель  
состояния эндолизосом  
культивируемых клеток

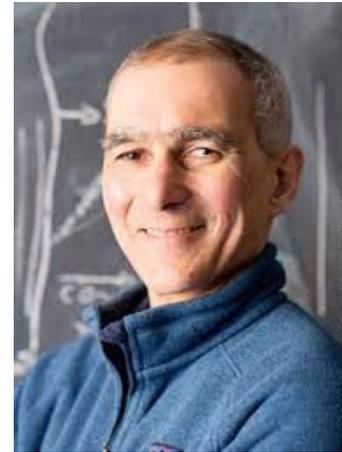
м.н.с. И.К. Литвинов  
ИНЦ РАН



Alexey I. Ekimov



Louis E. Brus



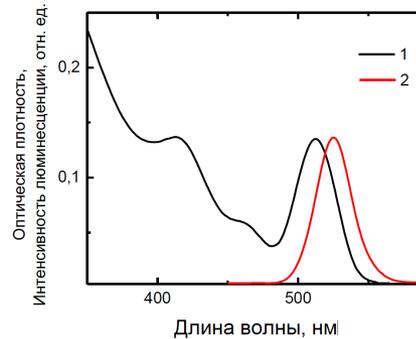
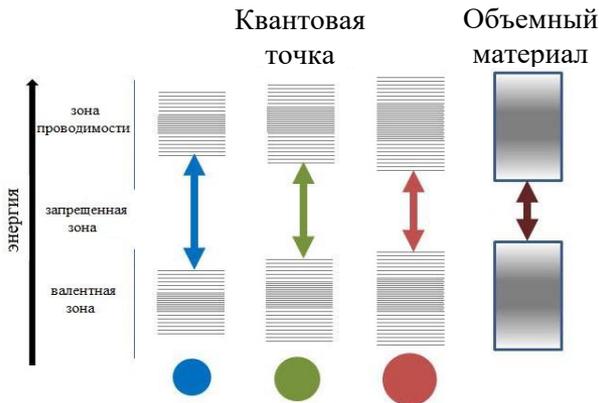
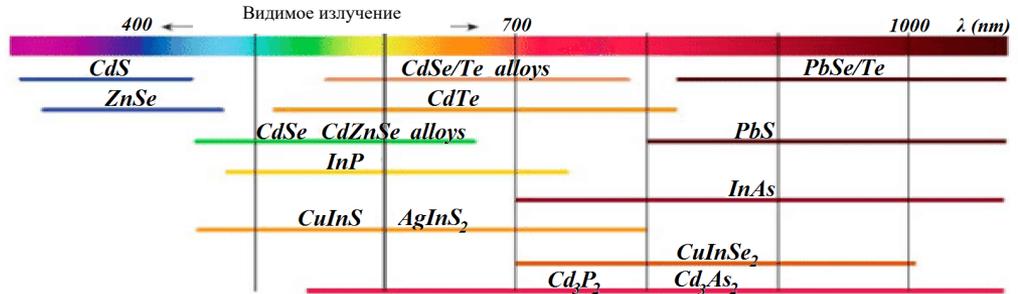
Moungi G. Bawendi

## Nobel Prize in Chemistry 2023

*for the Discovery and Synthesis of Quantum Dots*

# Свойства QDs

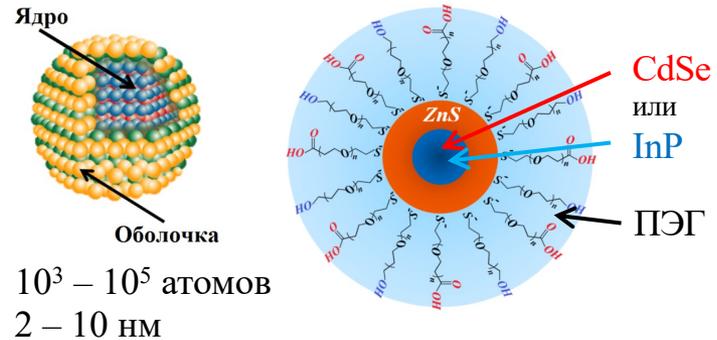
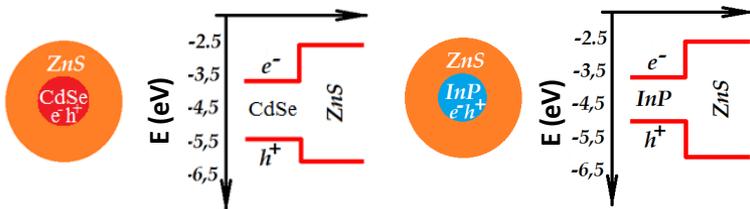
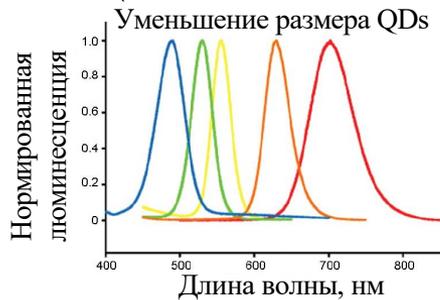
II	III	IV	V	VI
	Al	Si	P	S
Zn	Ga	Ge	As	Se
Cd	In	Sn	Sb	Te
Hg				



1 – спектр поглощения;  
2 – спектр люминесценции

Квантовый выход QDs:

$$\varphi = \varphi_0 \cdot \frac{\int I_{\text{обр}} d\lambda \cdot n_{\text{обр}}^2 \cdot D_{\text{ЭТ}}}{\int I_{\text{ЭТ}} d\lambda \cdot n_{\text{ЭТ}}^2 \cdot D_{\text{обр}}}$$



# Таргетные QDs

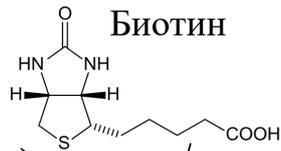
QD

ядро

оболочка

полимер

Стрептавидин

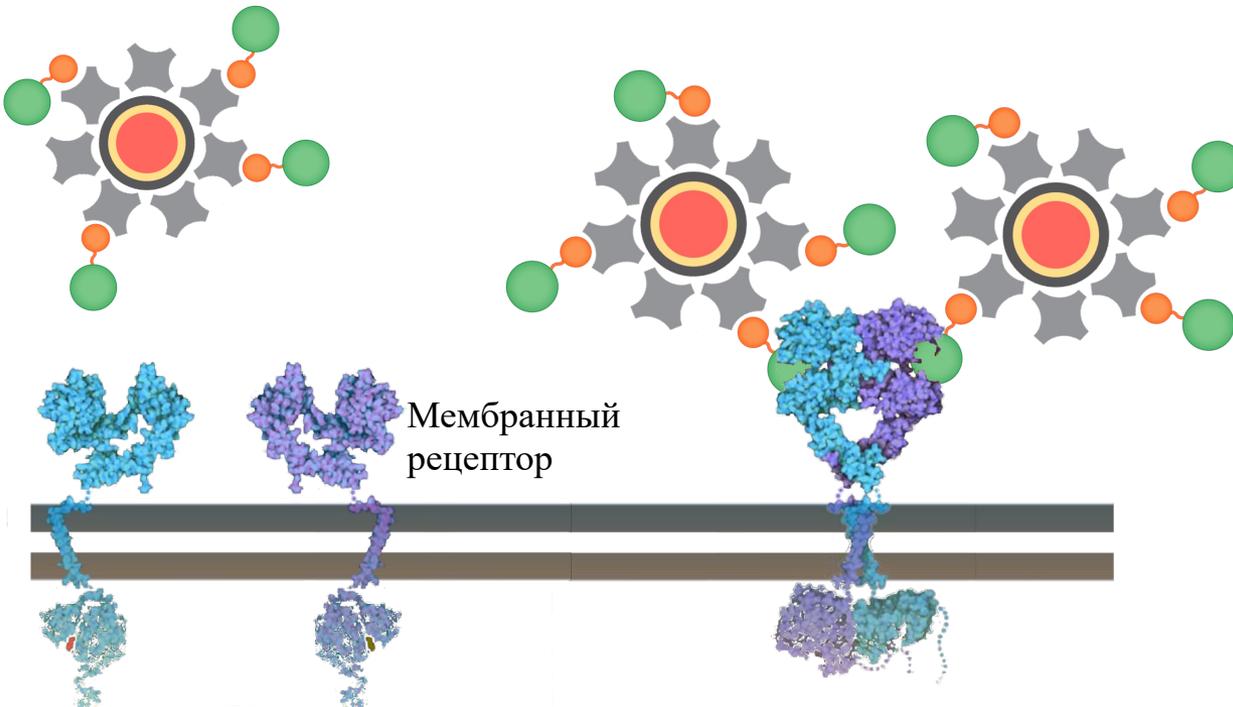


Антитело

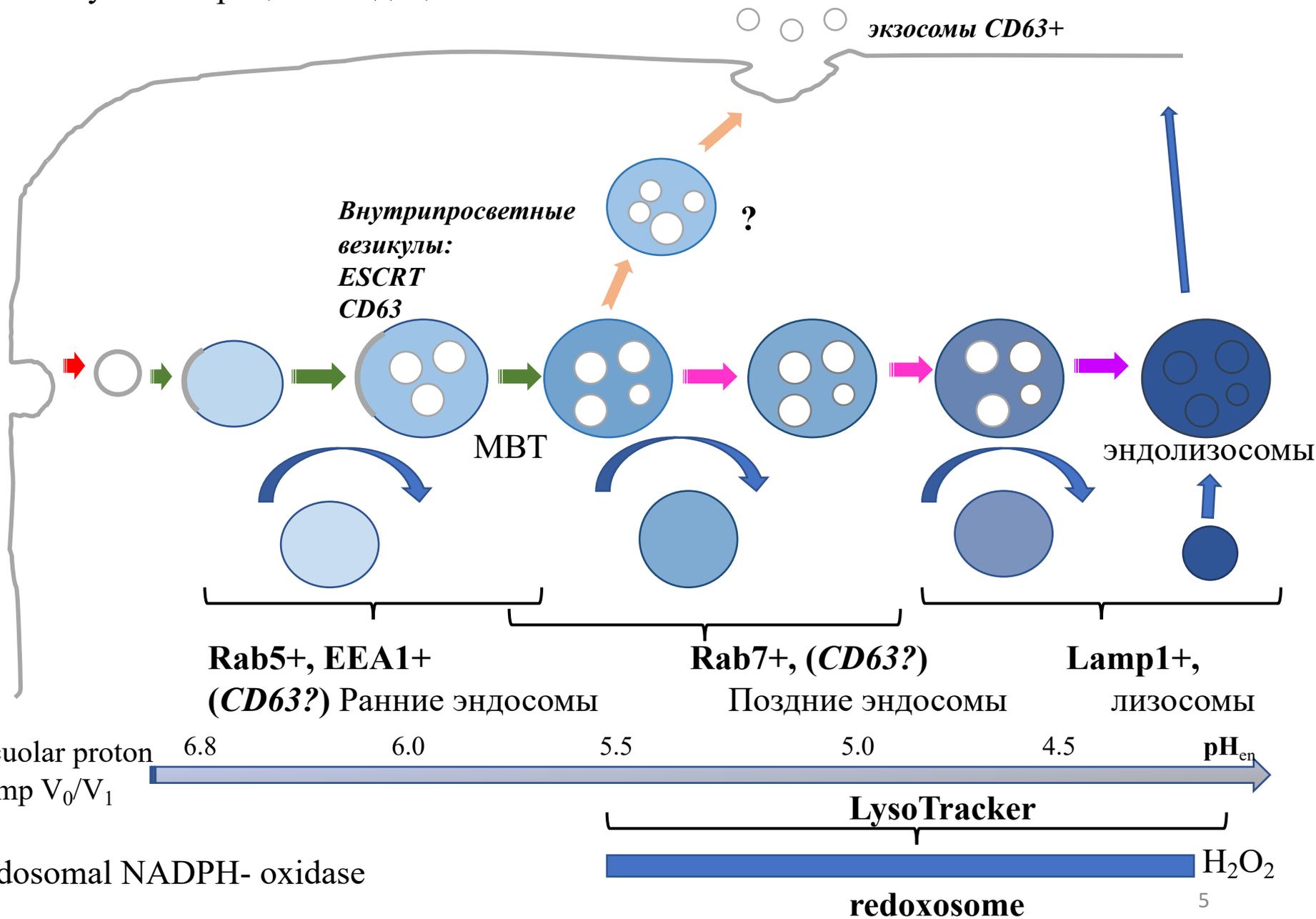
Комплекс (конъюгат):  
QD-стрептавидин-биотин-антитело

QD-стрептавидин-биотин-  
EGF

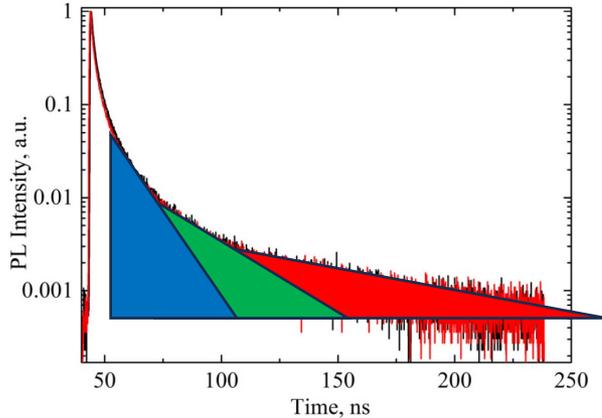
EGF – Epidermal Growth Factor



# Изучение процесса эндоцитоза



# Кинетика затухания QDs



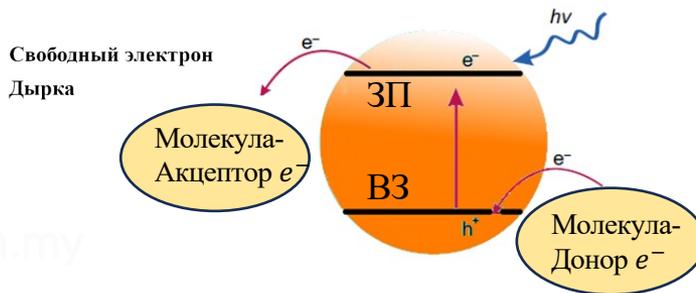
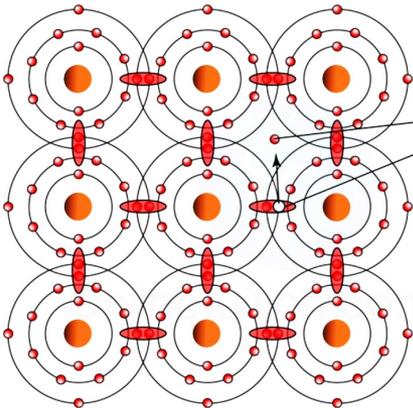
$$I(t) = \sum_i \left( A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \right)$$

Мультиэкспоненциальная зависимость затухания люминесценции QDs, описываемой функцией Колрауша-Уильямса-Ватта

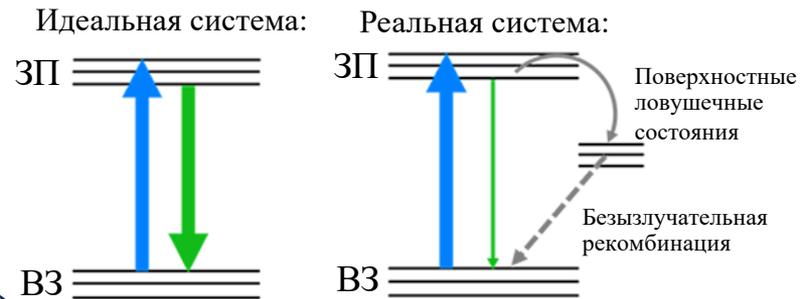
где  $A_i$  – компоненты амплитуды, а  $\tau_i$  – компоненты времени жизни люминесценции наноструктур, например, в случае трехэкспоненциальной зависимости  $i = 1; 2; 3$ .

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i A_i \tau_i^2}{\sum_i A_i \tau_i}$$

Среднее время жизни люминесценции QDs



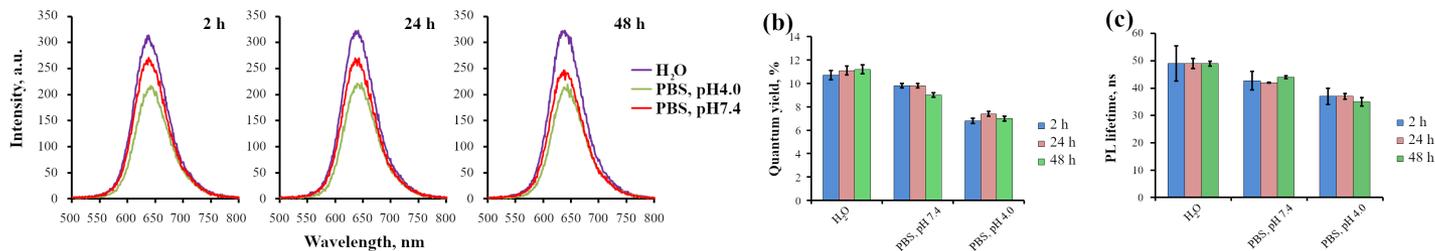
- Воздействие внешнего окружения
- Формирование “ловушечных” состояний



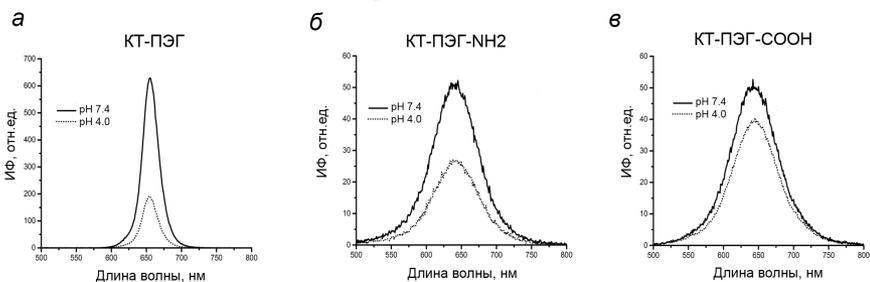
$$\varphi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad \tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

# Влияние внешнего окружения на QDs

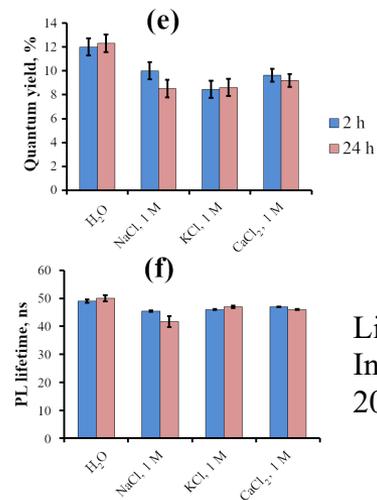
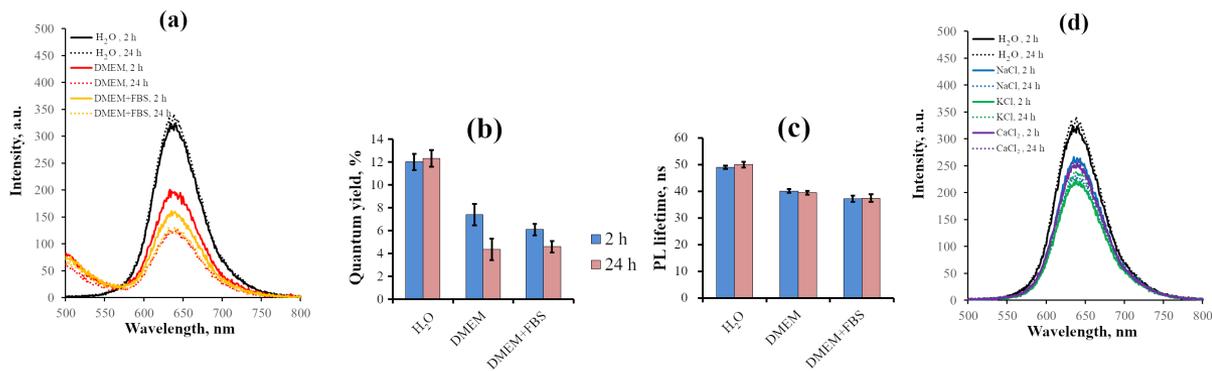
(a)



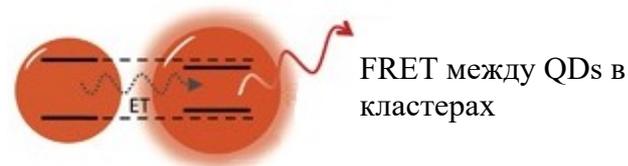
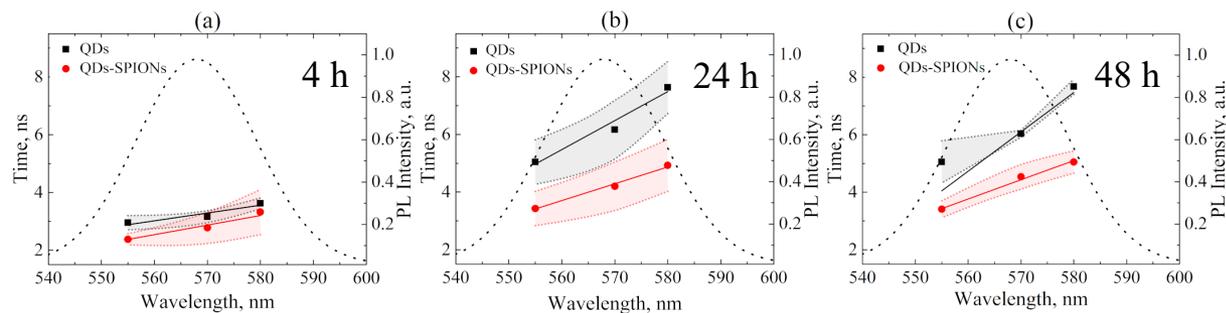
Litvinov, I. et al.  
Int. J. Mol. Sci.  
2023, 24, 2699



Litvinov, I.K., Belyaeva, T.N.,  
Salova, A.V. et al. Cell Tiss. Biol.  
2018, 12, 135–145



Litvinov, I. et al.  
Int. J. Mol. Sci.  
2023, 24, 2699



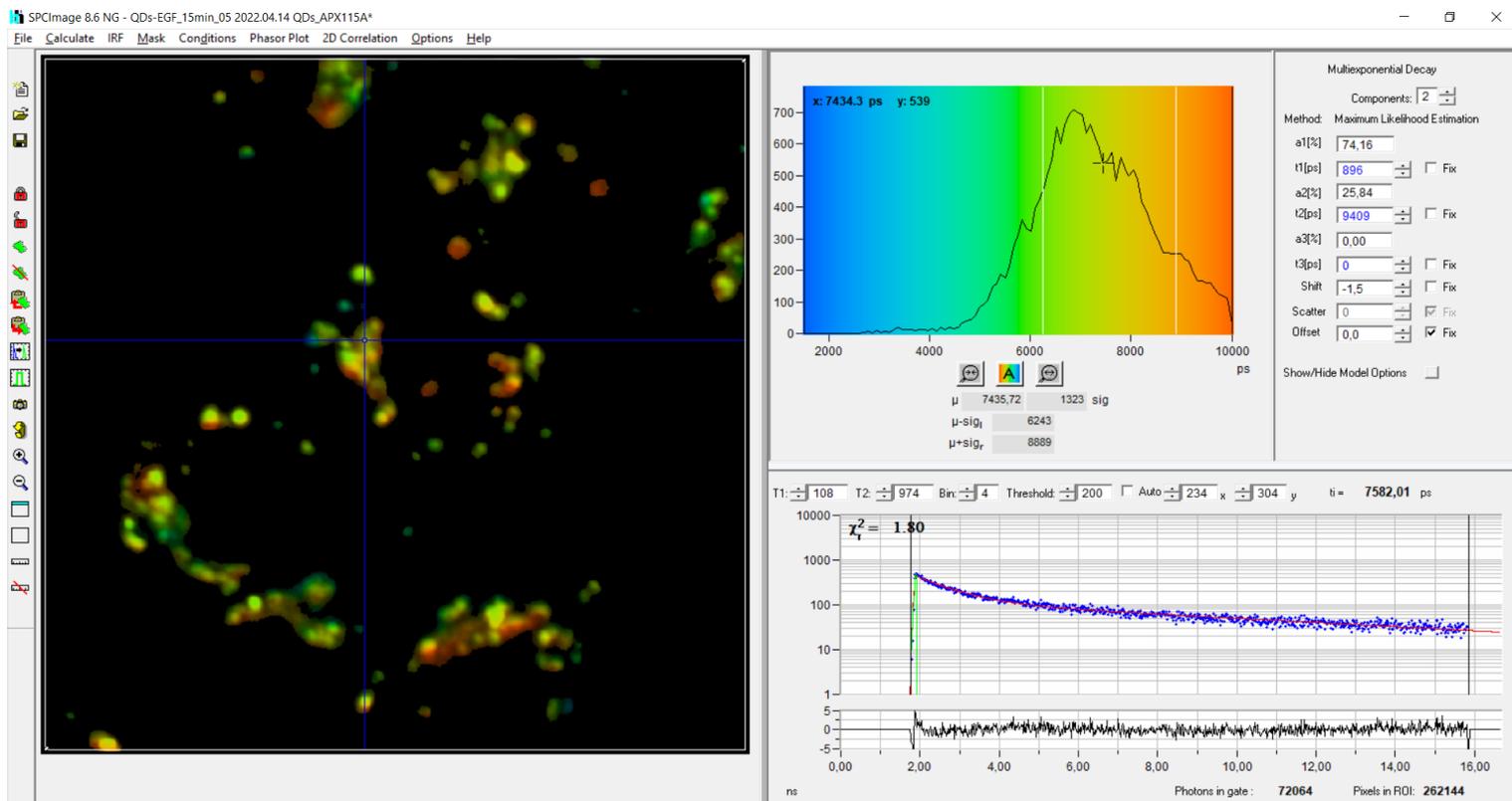
Matiushkina, A.; Litvinov, I. et al.  
Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 4061.

**Цель работы:** исследовать свойства эндолизосомных компартментов клеток с помощью изучения  $\tau$  интернализованных QD-EGF ( $\tau_{QDs}$ ).

$\tau_{QDs}$  определяли по кинетике затухания их люминесценции, полученной в результате обработки данных FLIM.

Fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM:

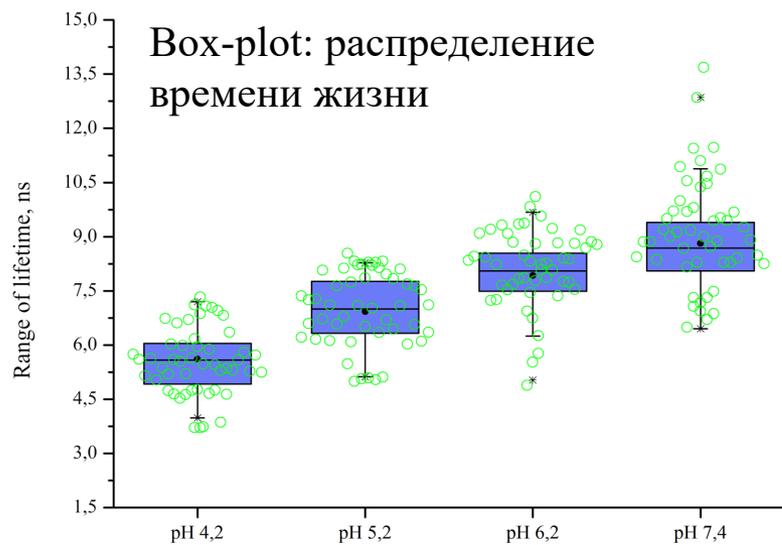
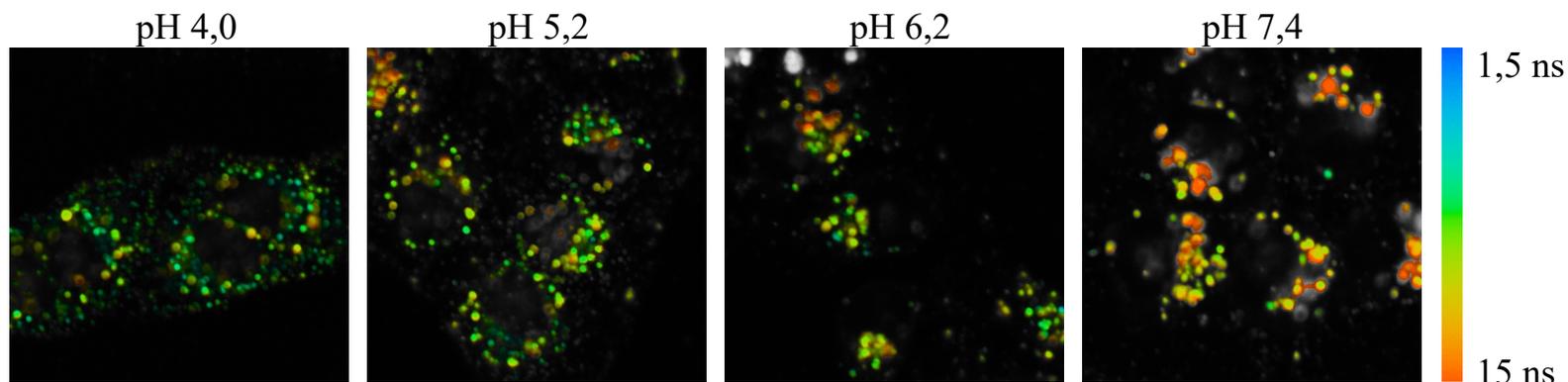
QD-EGF  
15 min



SPCImage NG Data Analysis Software,  
Becker & Hickl GmbH

# Зависимость времени жизни люминесценции QDs от pH

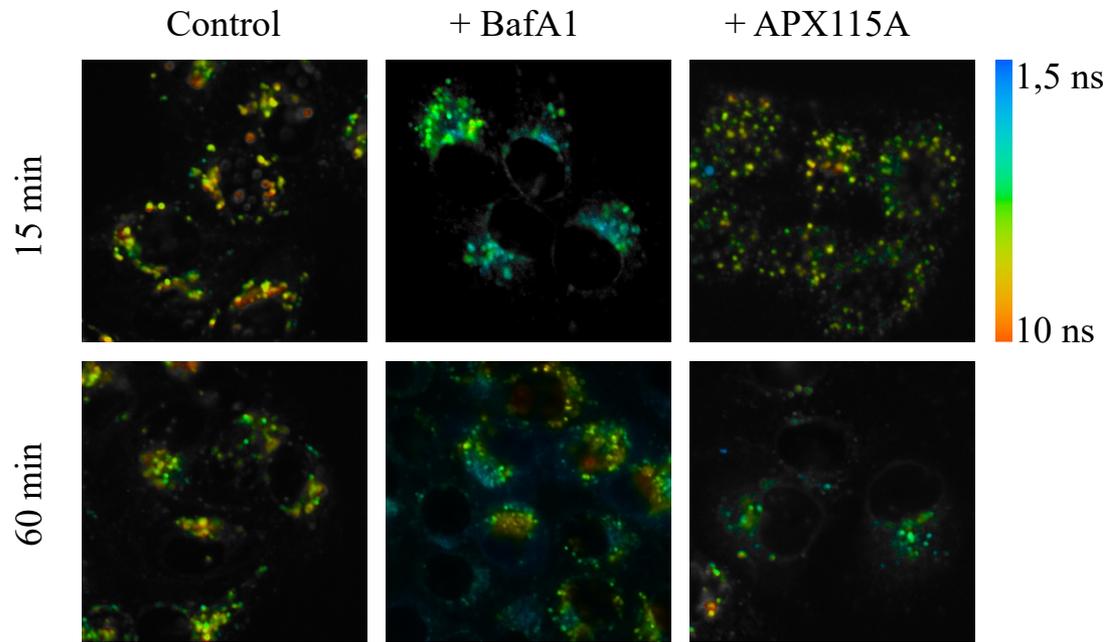
FLIM-визуализация CdSe/ZnS QDs-EGF в клетках HeLa при действии нигерицина:



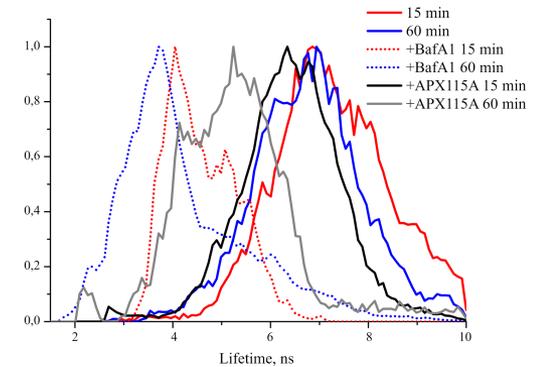


# Влияние внутриклеточных условий на время жизни люминесценции QDs

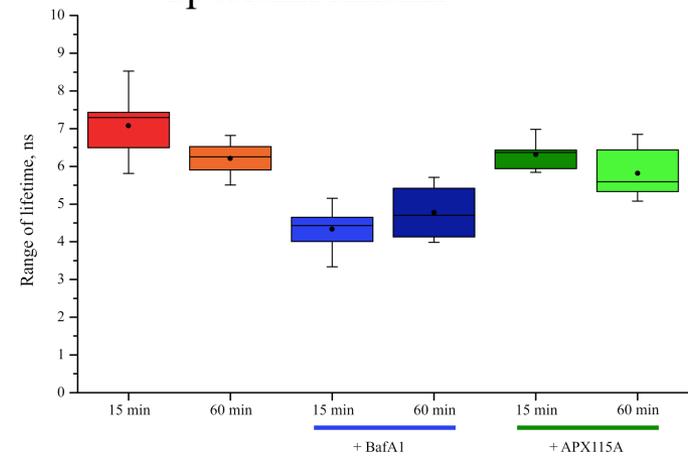
FLIM-визуализация:



Гистограмма распределения времени жизни



Box-plot: распределение времени жизни



# Phasor plot

Мультиэкспоненциальная зависимость затухания люминесценции QDs:

$$I(t) = \sum_i (A_i e^{-t/\tau_i})$$

Преобразование Фурье:

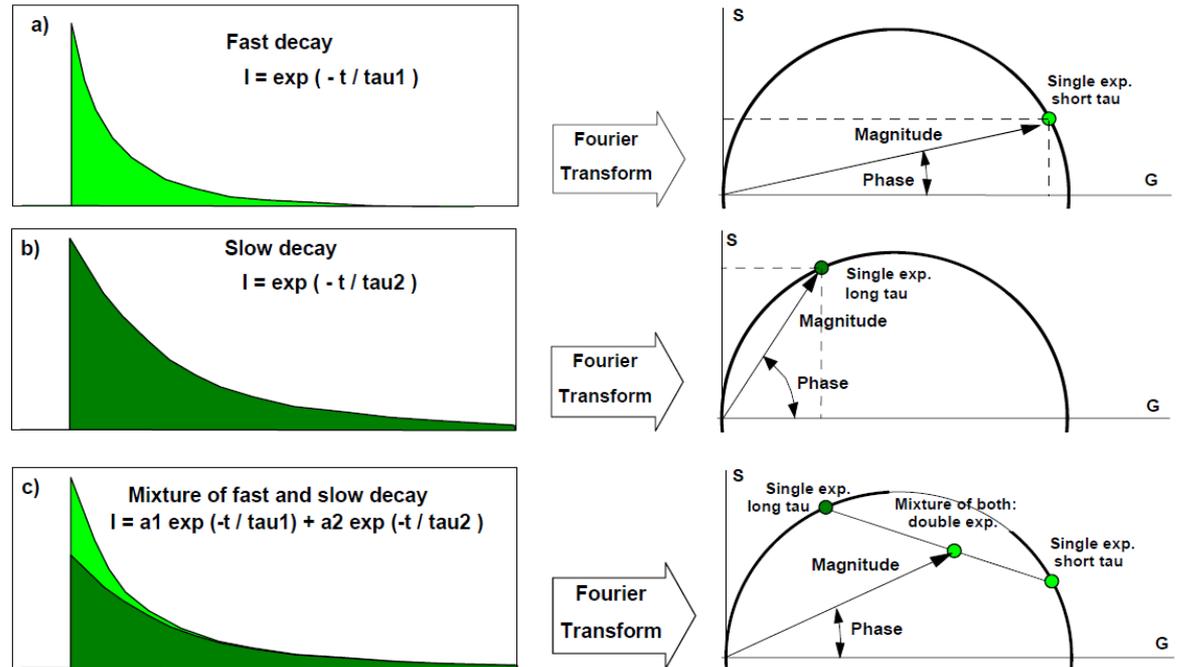
$$G(\omega) + iS(\omega) = \int I(t) \cdot e^{-i\omega t} dt,$$

$$G(\omega) = \frac{\int_0^\infty I(t) \cos(\omega t) dt}{\int_0^\infty I(t) dt},$$

$$S(\omega) = \frac{\int_0^\infty I(t) \sin(\omega t) dt}{\int_0^\infty I(t) dt},$$

где  $G$  – действительная часть,  $S$  – мнимая часть,  $I(t)$  интенсивность на момент времени  $t$ . Частота определяется как  $\omega = 2\pi/T_p$ , где  $T_p$  – время между импульсами возбуждения

## Преобразование в полярные координаты на КОМПЛЕКСНОЙ ПЛОСКОСТИ

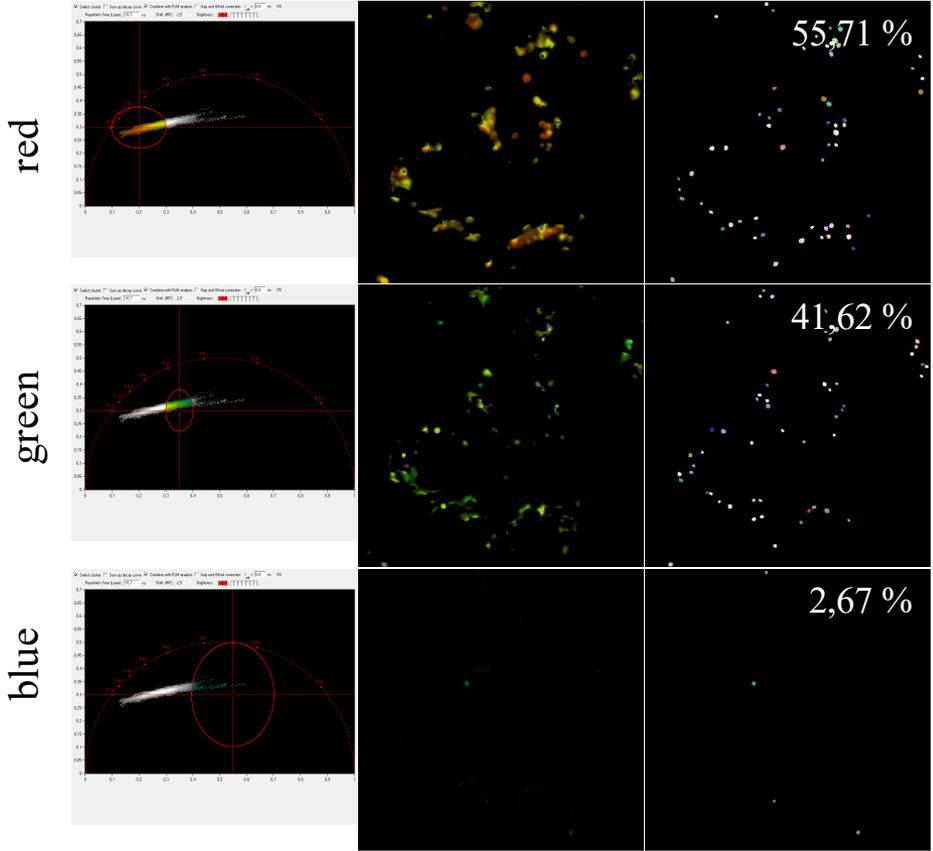
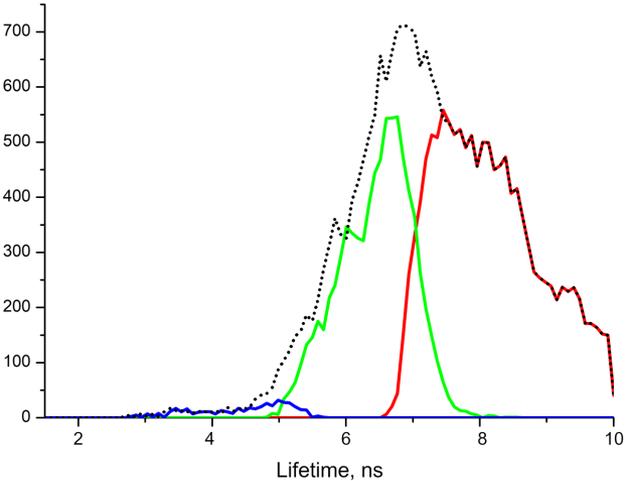
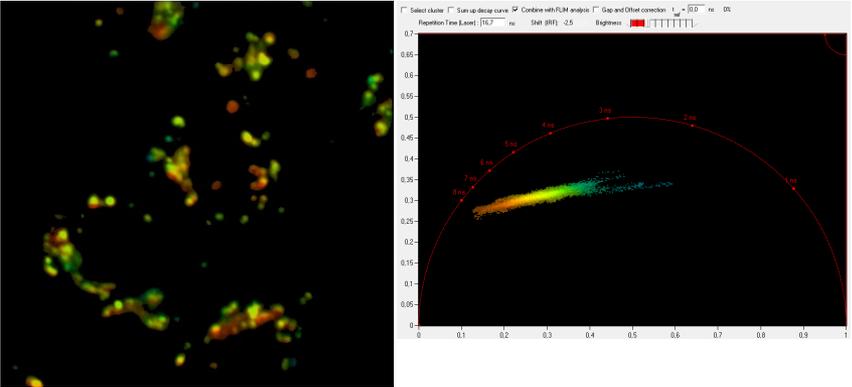


$$\text{Magnitude } M = \sqrt{G^2 + S^2}$$

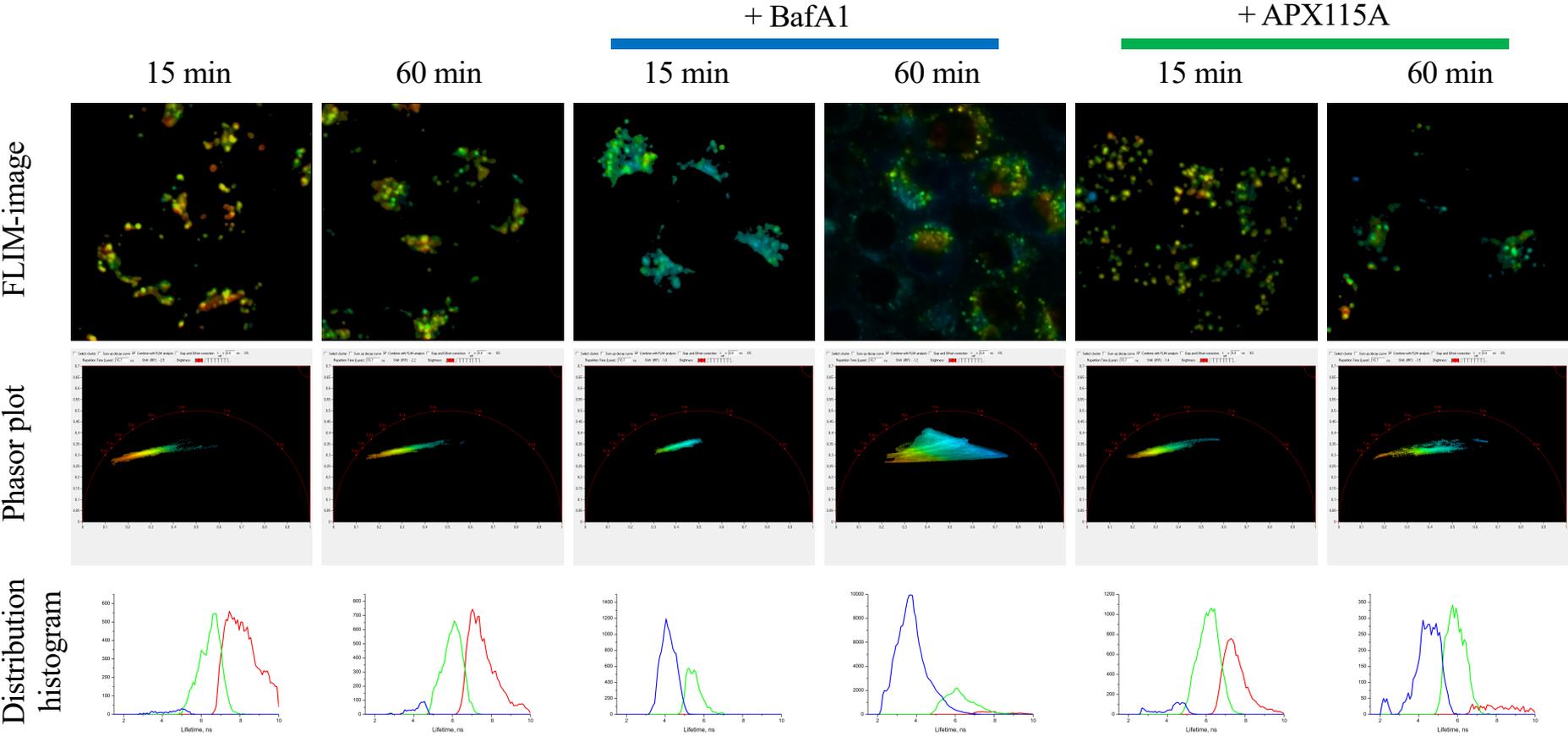
$$\text{Phase } \varphi = \arctan S/G$$

# Пример обработки времяразрешенного изображения люминесценции QDs с помощью Phasor plot и плагина FIJI StarDist

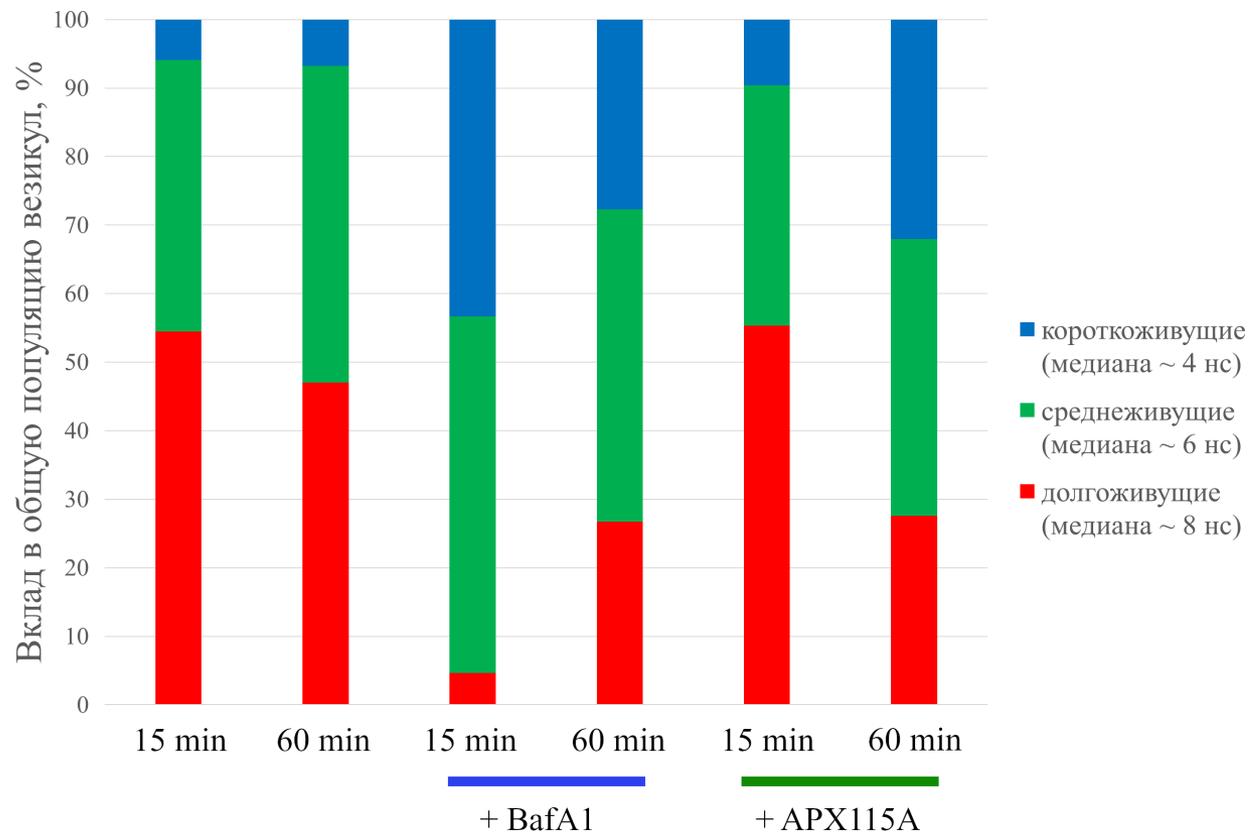
Phasor plot



# Влияние изменения внутриклеточных условий на распределение вклада популяций QDs с разными временами жизни в общую люминесценцию



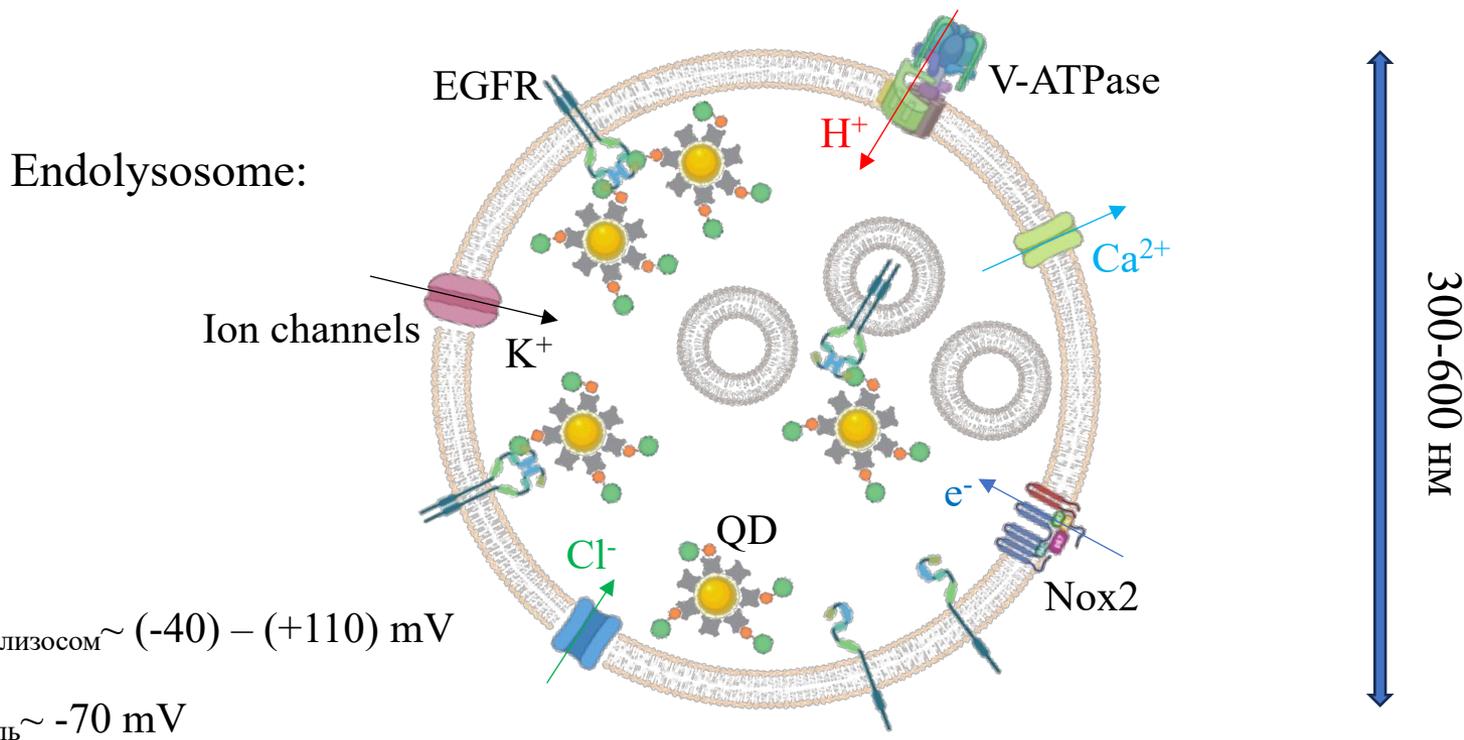
## Соотношение популяций QDs с разными временами жизни в зависимости от внутриклеточных условий



# Выводы

Уровень pH в эндосомах возможно не является ключевым фактором в определении времени жизни люминесценции QDs.

Можно предположить, что такие факторы, как ионные потоки, концентрация кислорода, взаимодействие с макромолекулами, близость мембраны и небольшой объем внутреннего пространства эндосом могут влиять на возбужденное состояние QDs за счет резонансной передачи энергии и изменять  $\tau_{QDs}$  в большей степени, чем уровень  $H^+$ .



# Благодарность

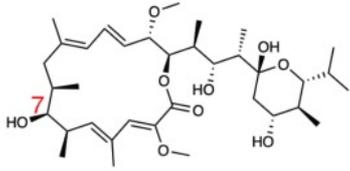
Сотрудникам Лаборатории динамики  
внутриклеточных мембран:

- Корнилова Е.С.
- Беляева Т.Н.
- Салова А.В.
- Харченко М.В.
- Каменцева Р.С.

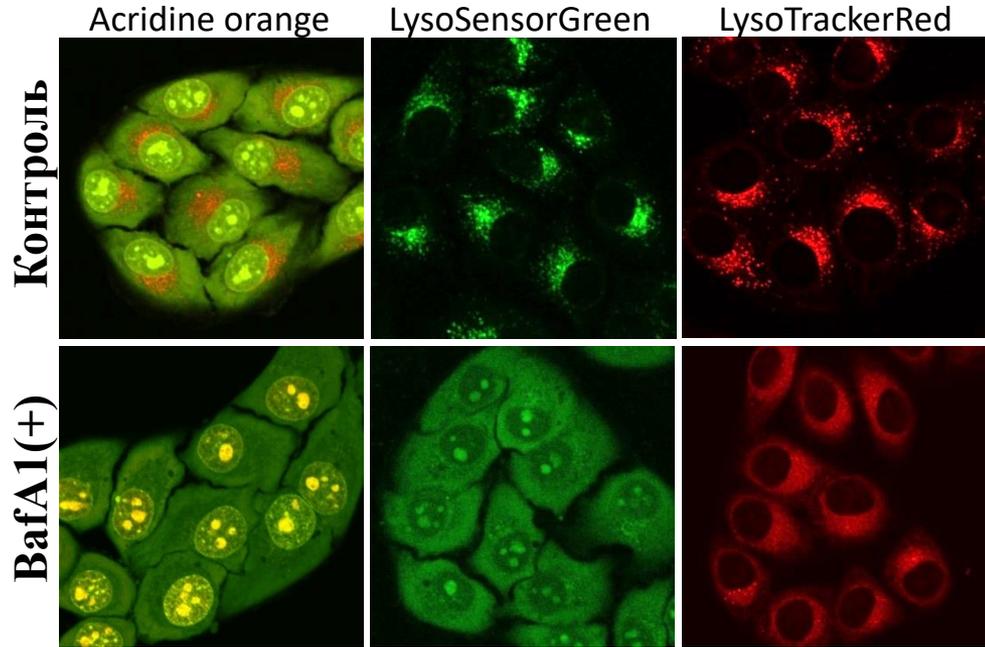
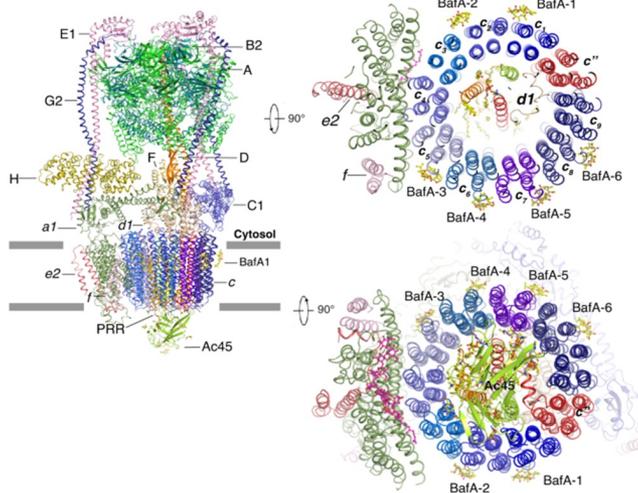
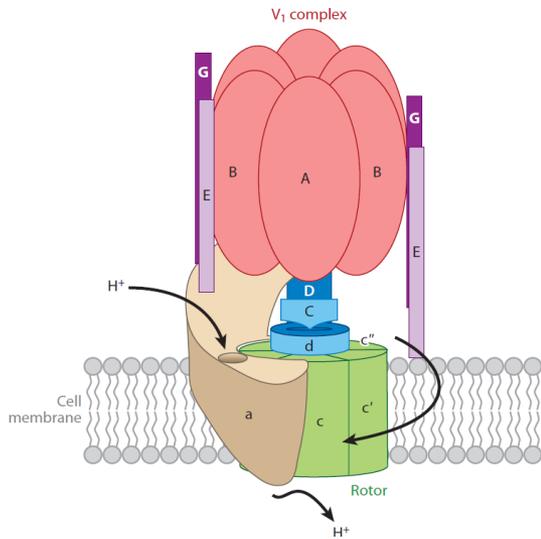
Институту Химии СПбГУ, Научной группе  
профессора Туника С.П.

# СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

# Бафиломидин А1



Bafilomycin A1



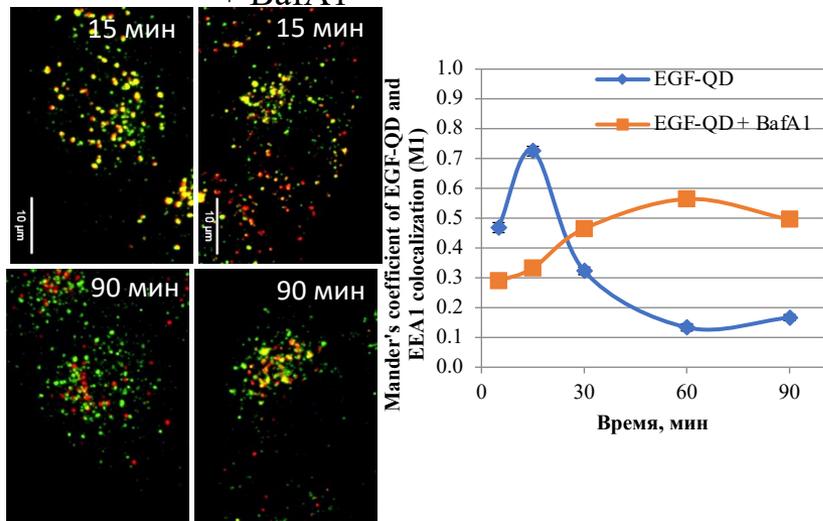
Клетки HeLa, инкубированные без/с BafA1 (100 nM) в течение 30 мин с последующей стимуляцией эндоцитоза рецептора ЭФР (8 nM) и окраской Акридиновым оранжевым (2,5 мкг/мл), LysoSensorGreen (1 мкМ) или LysoTrackerRed (50 нМ). Прижизненная конфокальная микроскопия клеток.

# Влияние подавления закисления с помощью BafA1 на изменение характера колокализации ЭФР-QDs и маркеров эндцитозного пути на различных этапах эндоцитоза

клетки HeLa

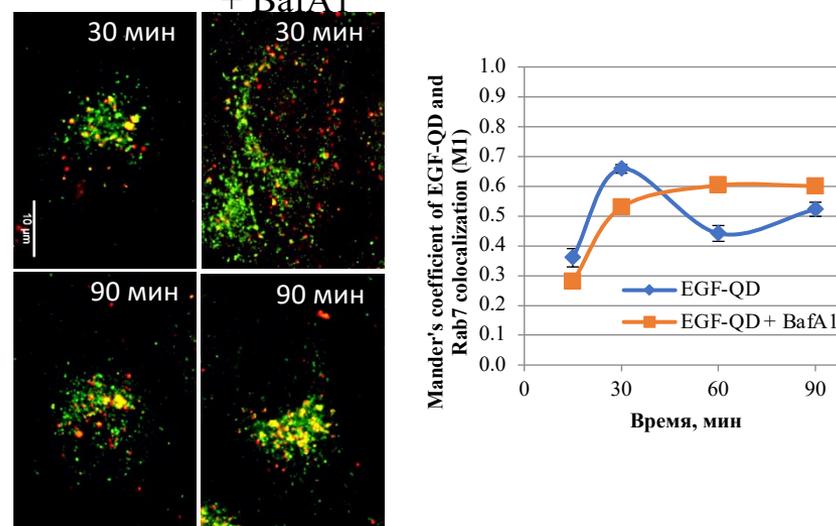
EGF-QDs / EEA1

+ BafA1



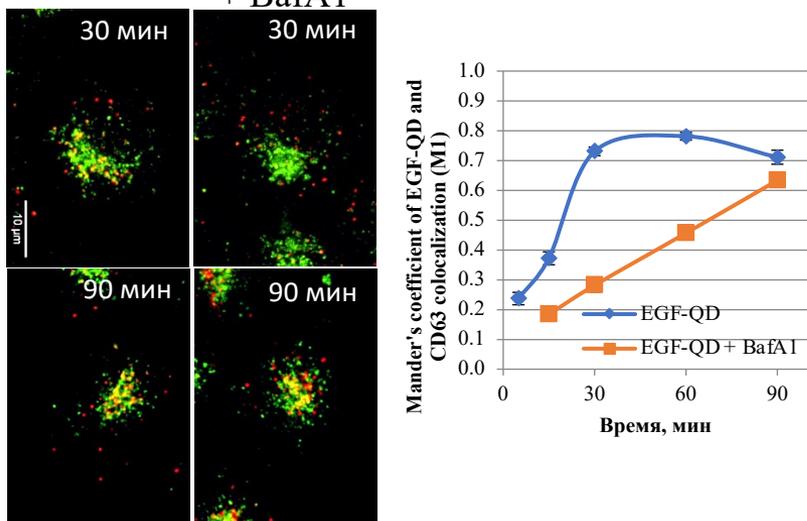
EGF-QDs / Rab7

+ BafA1



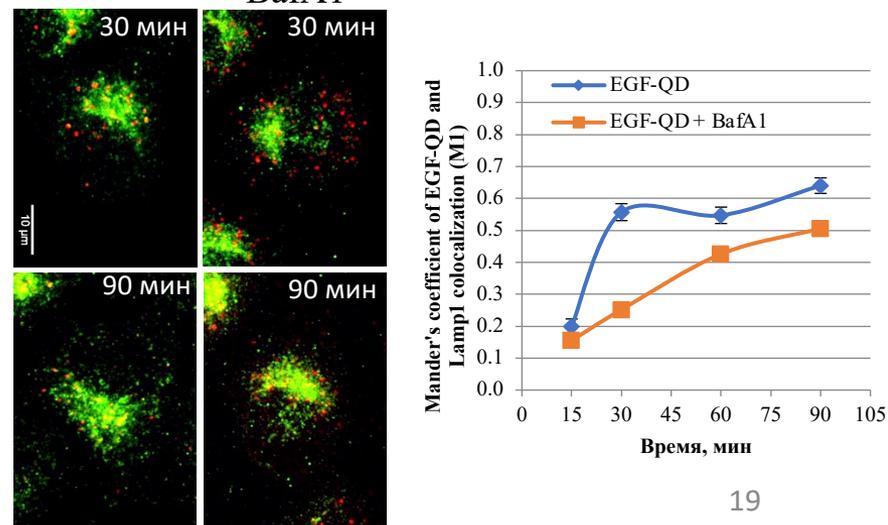
EGF-QDs / CD63

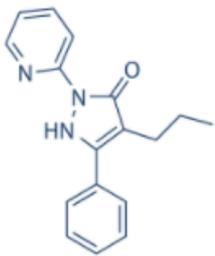
+ BafA1



EGF-QDs / Lamp-1

+ BafA1

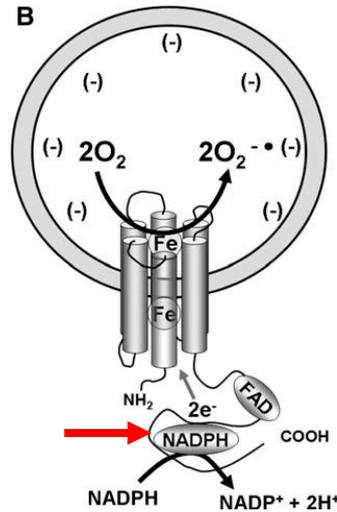
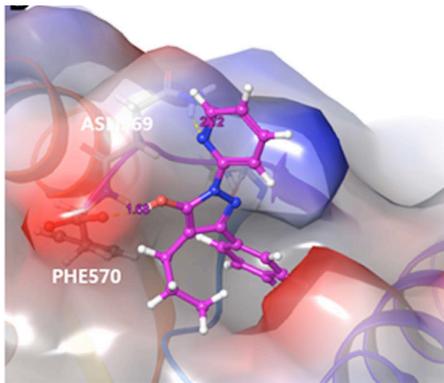




# Специфический ингибитор НАДФН-оксидаз - APX-115A

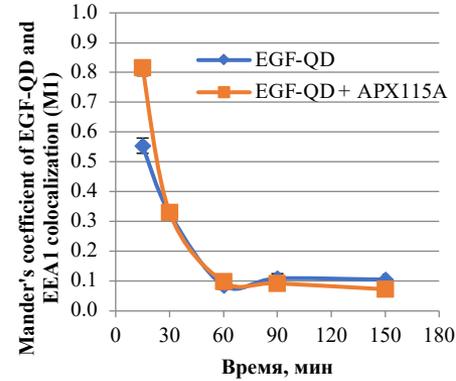
Клетки HeLa, действие APX115A

Связывание APX-115A с доменом gp91phox/Nox2

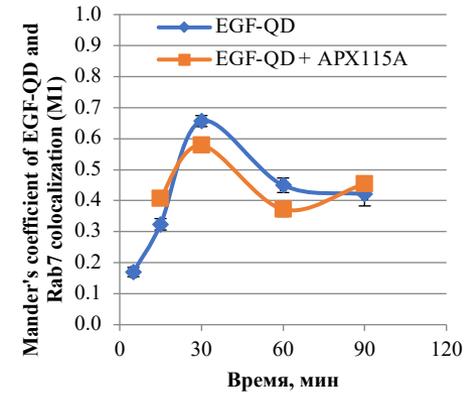


APX115A способен прерывать взаимодействие между NADPH и NADPH-связывающим доменом gp91phox/Nox2 и других изоферментов Nox.

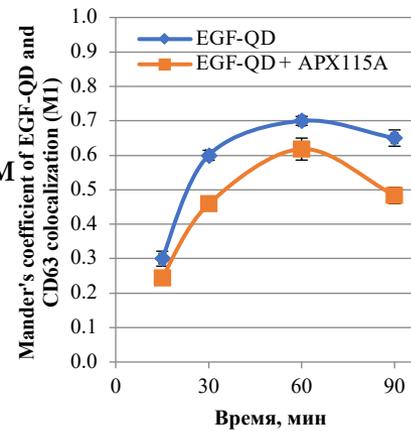
EGF-QDs / EEA1



EGF-QDs / Rab7



EGF-QDs / CD63



EGF-QDs / Lamp-1

