

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

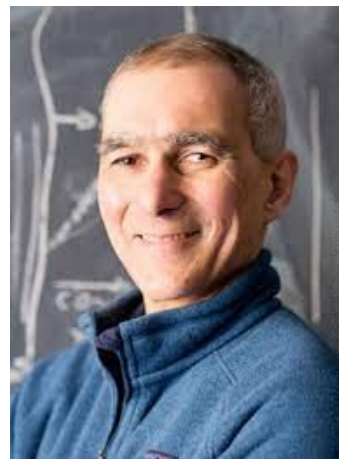
м.н.с. И.К. Литвинов
ИНЦ РАН



Alexey I. Ekimov



Louis E. Brus



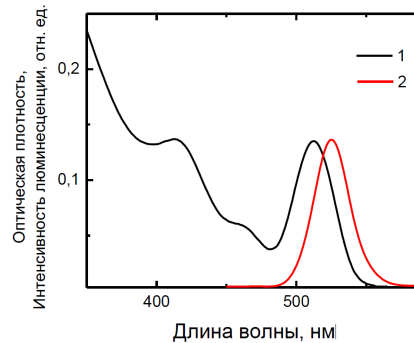
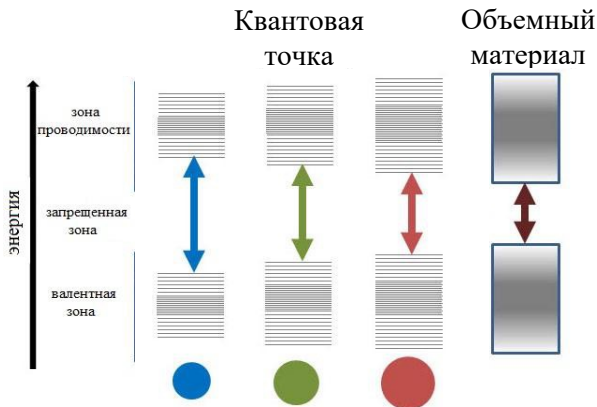
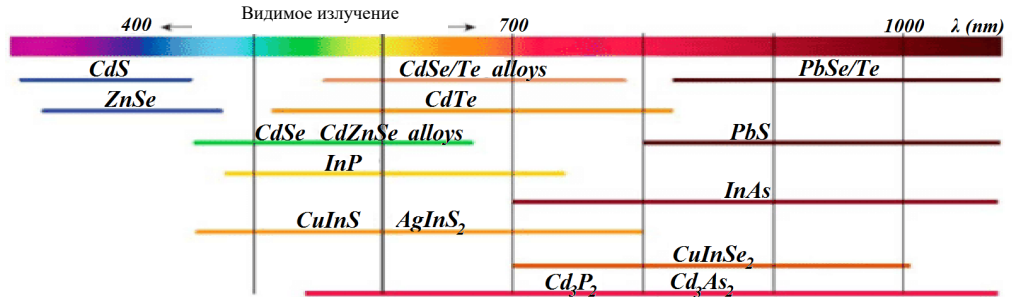
Moungi G. Bawendi

Nobel Prize in Chemistry 2023

for the Discovery and Synthesis of Quantum Dots

Свойства QDs

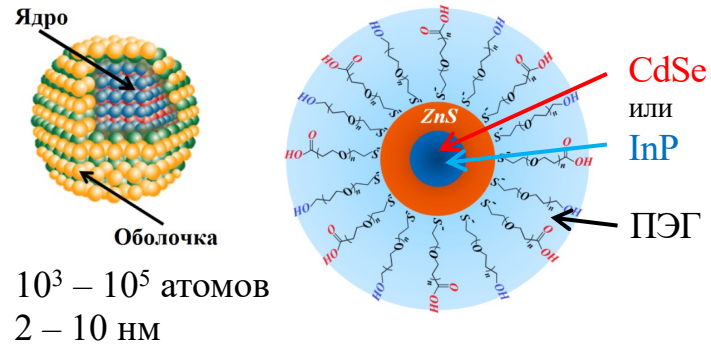
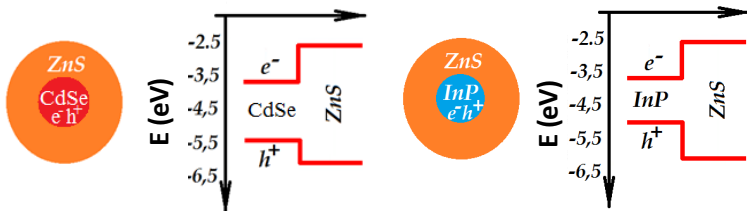
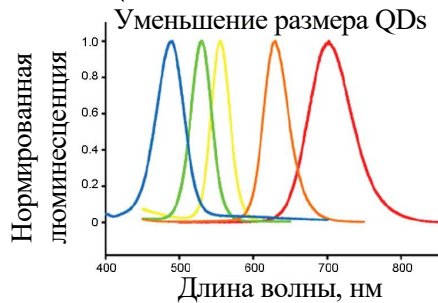
II	III	IV	V	VI
	Al	Si	P	S
Zn	Ga	Ge	As	Se
Cd	In	Sn	Sb	Te
Hg				



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

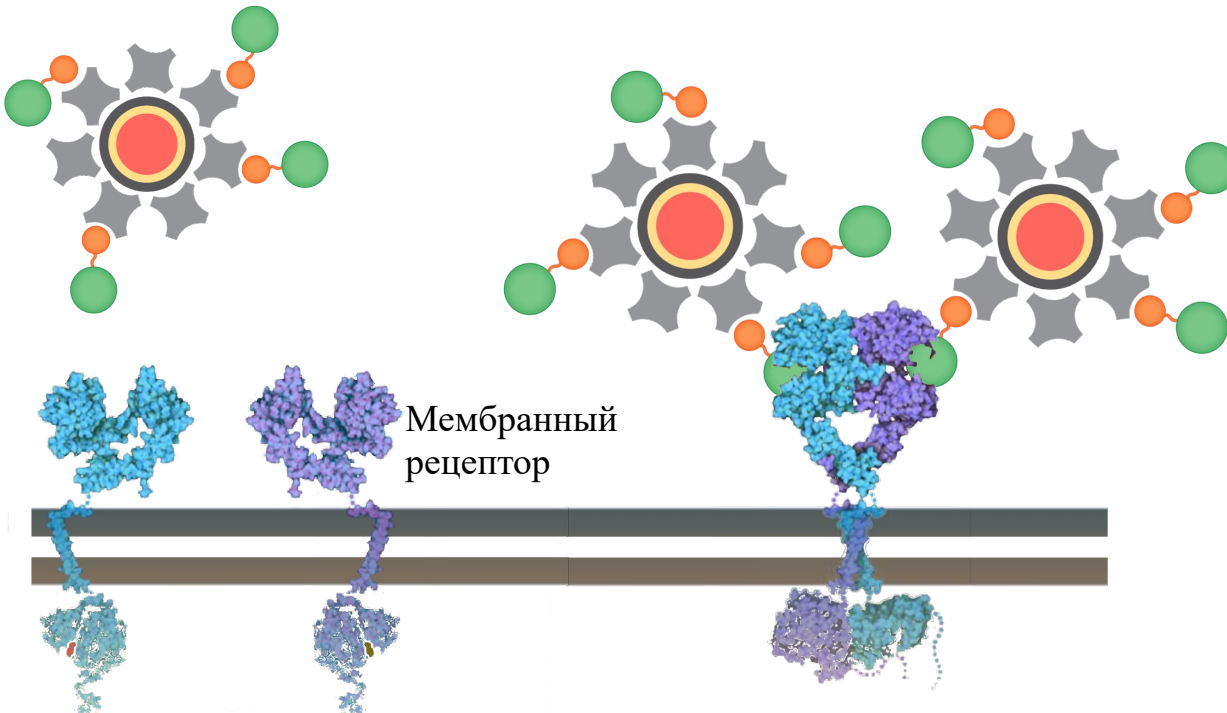


Антитело

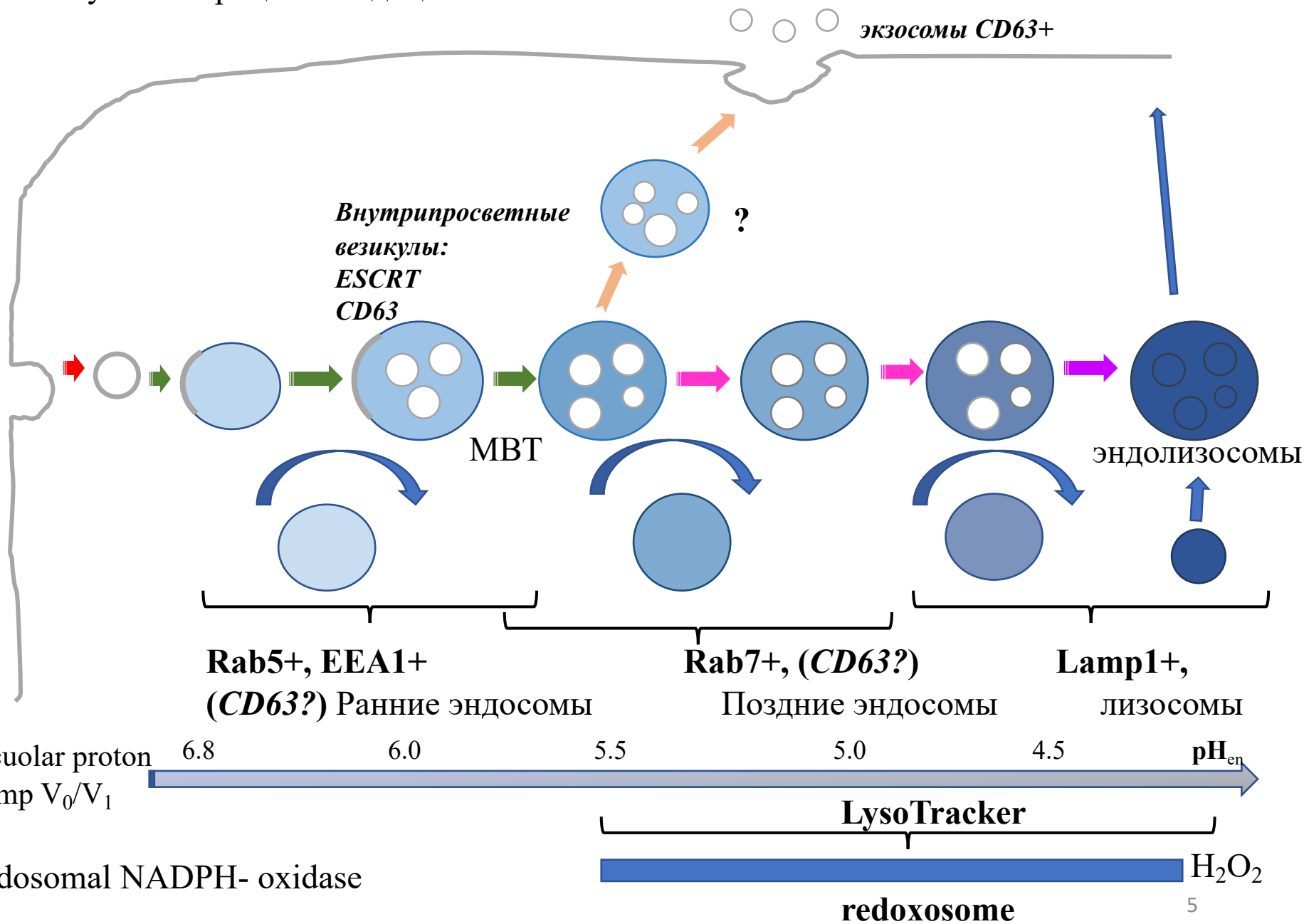
Комплекс (конъюгат):
QD-стрептавидин-биотин-антитело

QD-стрептавидин-биотин-
EGF

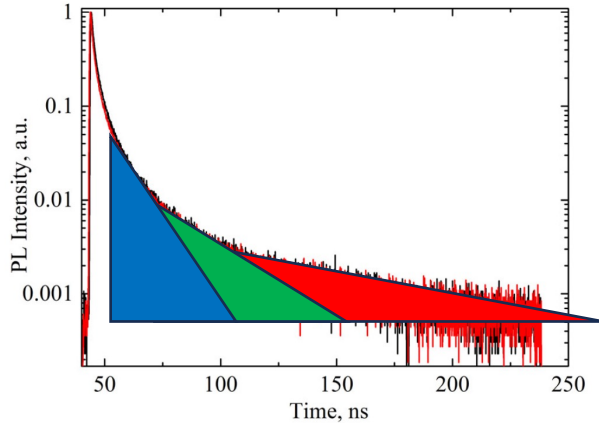
EGF – Epidermal Growth Factor



Изучение процесса эндоцитоза



Кинетика затухания QDs



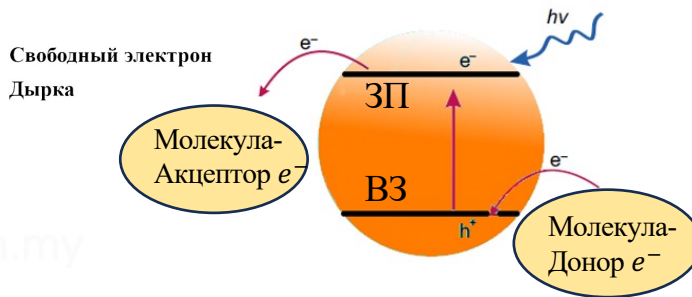
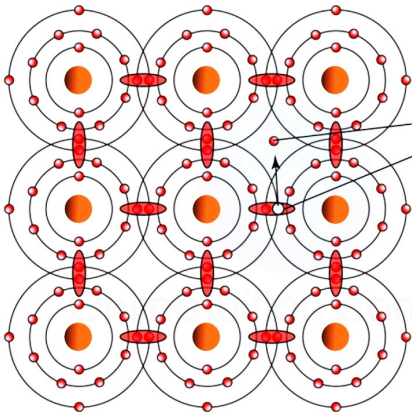
$$I(t) = \sum_i \left(A_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \right)$$

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

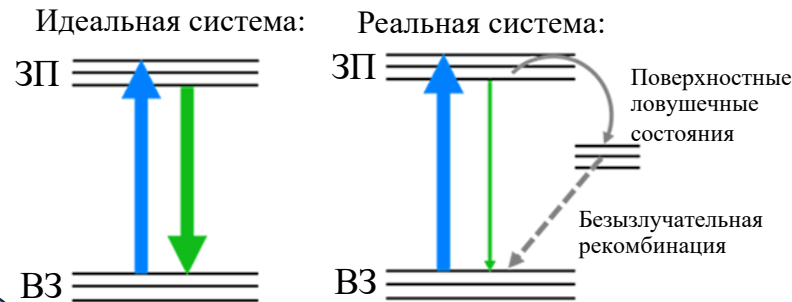
где A_i – компоненты амплитуды, а τ_i – компоненты времени жизни люминесценции наноструктур, например, в случае трехэкспоненциальной зависимости $i = 1; 2; 3$.

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

Среднее время жизни люминесценции QDs



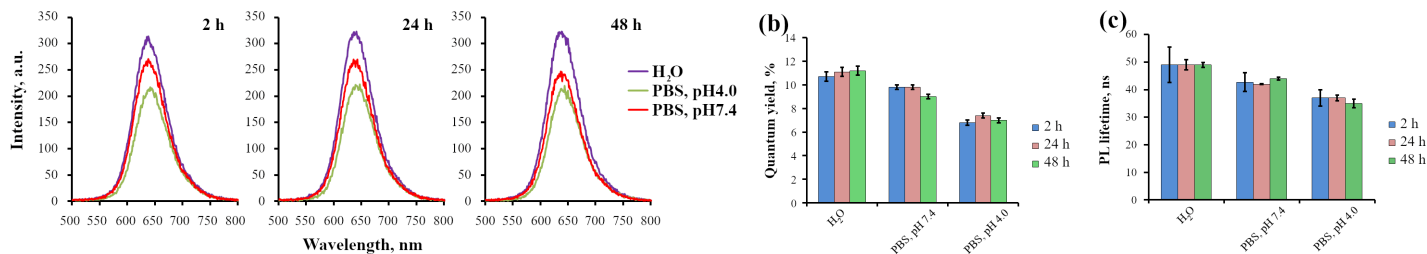
- Воздействие внешнего окружения
- Формирование “ловушечных” состояний



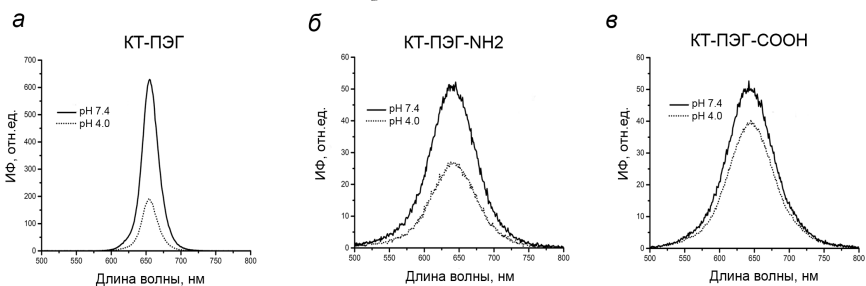
$$\phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad \tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

Влияние внешнего окружения на QDs

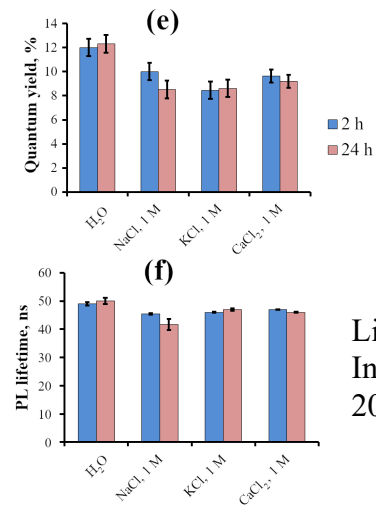
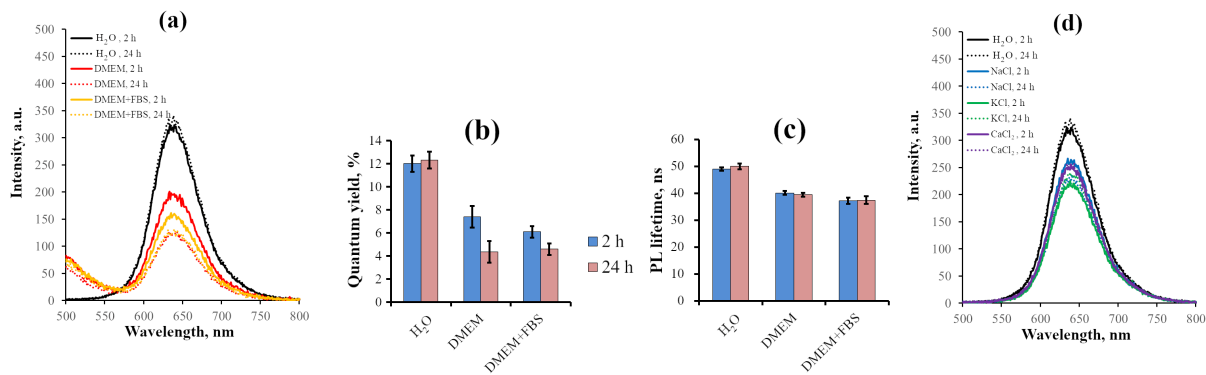
(a)



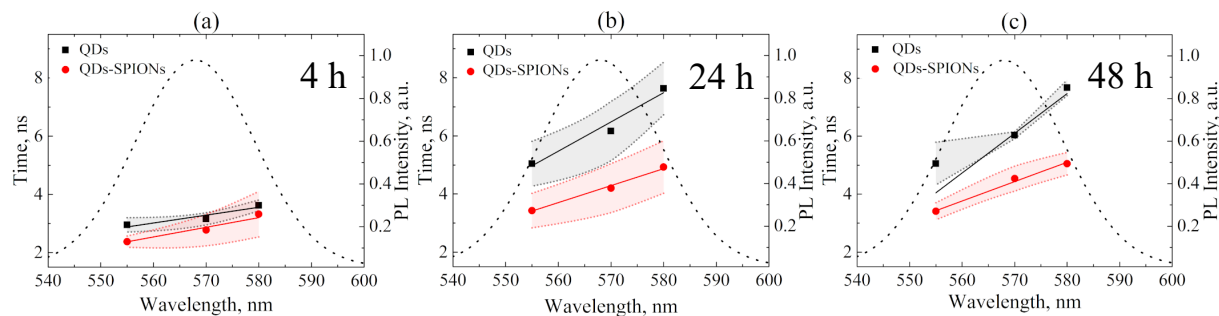
Litvinov, I. et al.
Int. J. Mol. Sci.
2023, 24, 2699



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



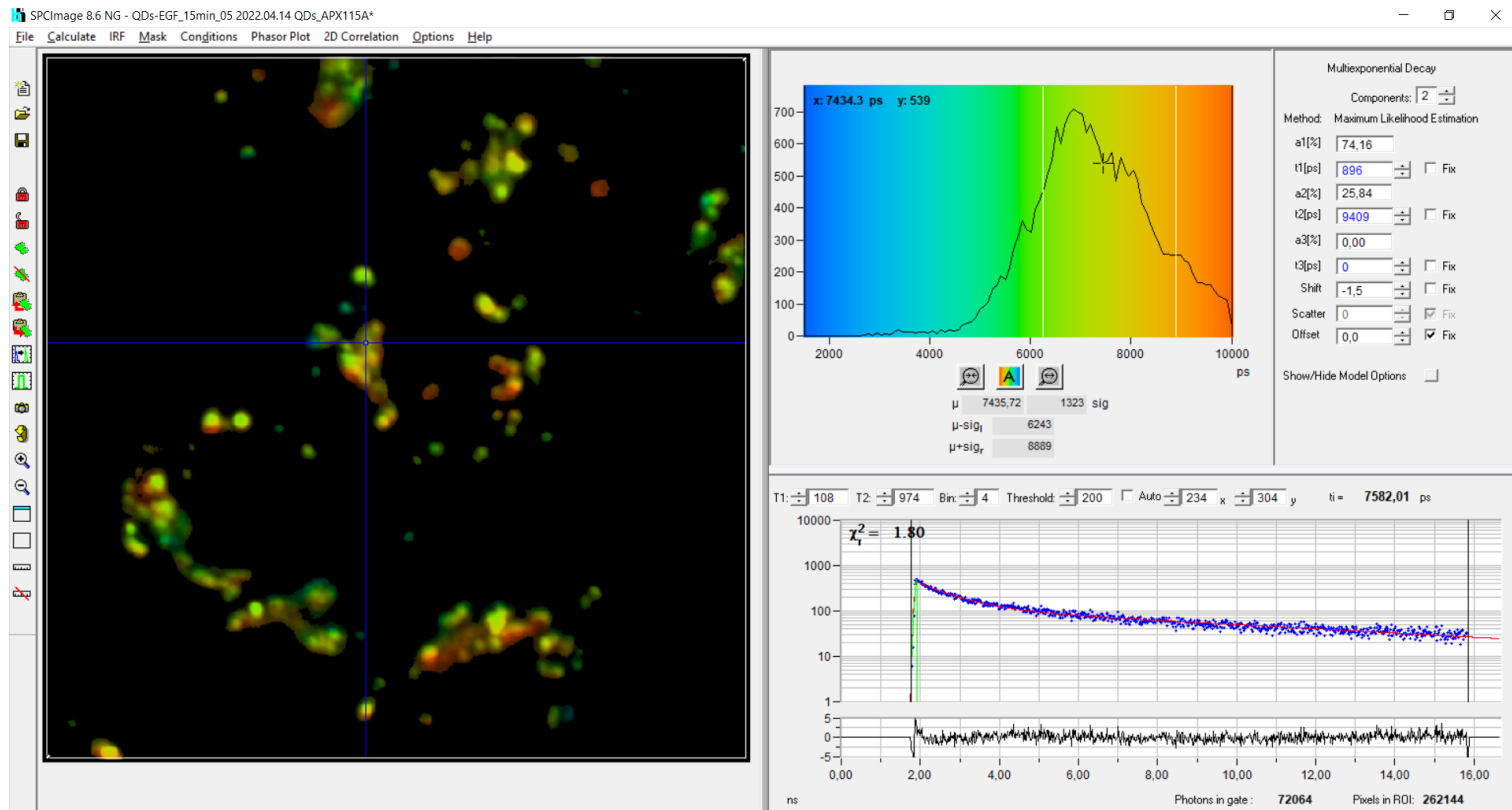
Matiushkina, A.; Litvinov, I. et al.
Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 4061.

Цель работы: исследовать свойства эндолизосомных компартментов клеток с помощью изучения τ интернализованных QD-EGF (τ_{QDs}).

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

Fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM:

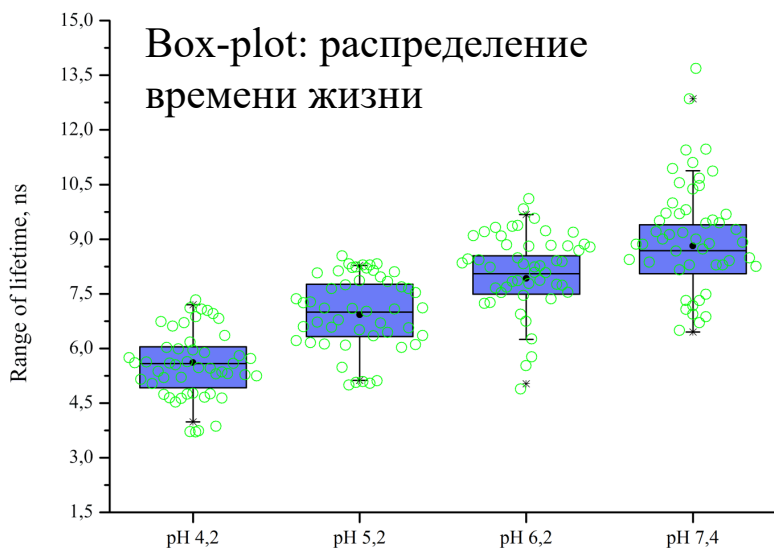
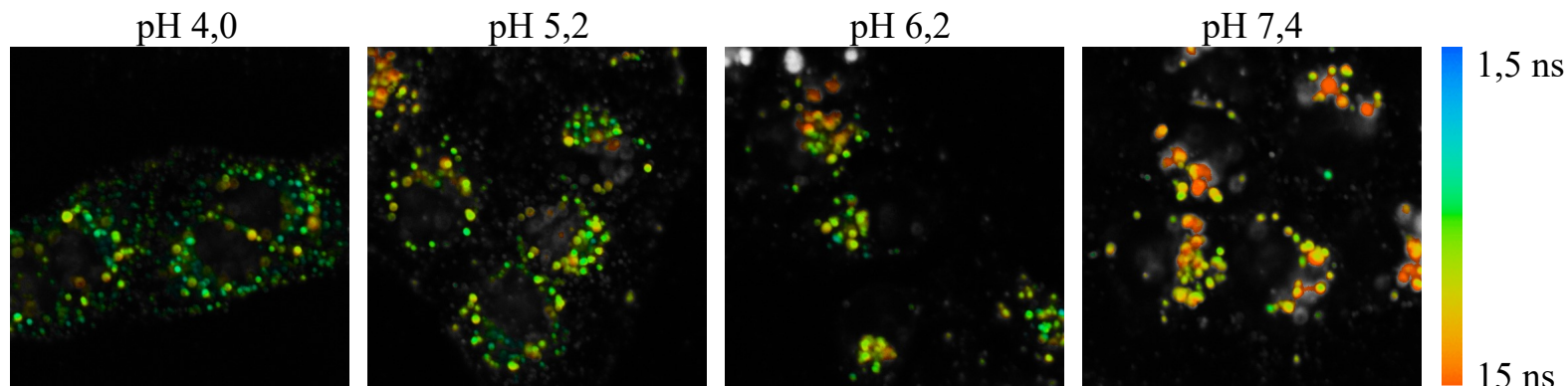
QD-EGF
15 min



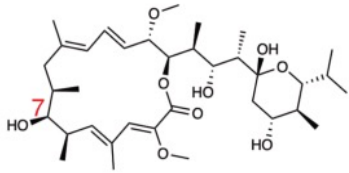
SPCImage NG Data Analysis Software,
Becker & Hickl GmbH

Зависимость времени жизни люминесценции QDs от pH

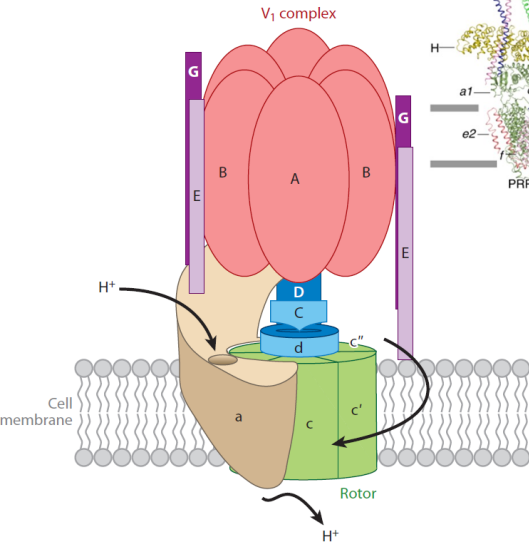
FLIM-визуализация CdSe/ZnS QDs-EGF в клетках HeLa при действии нигерицина:



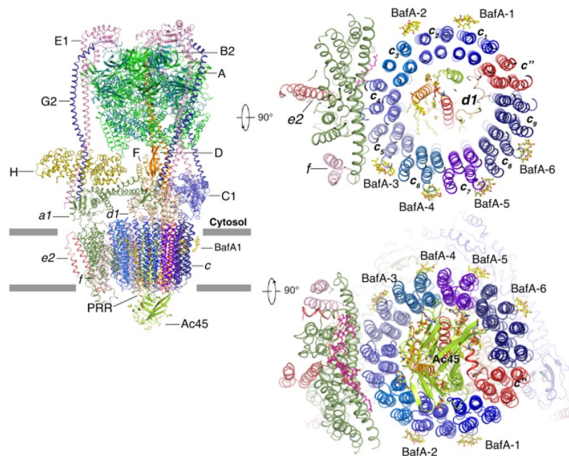
Бафиломицин А1



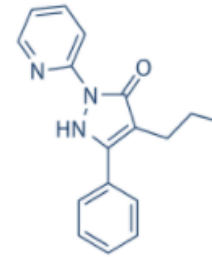
Bafilomycin A1



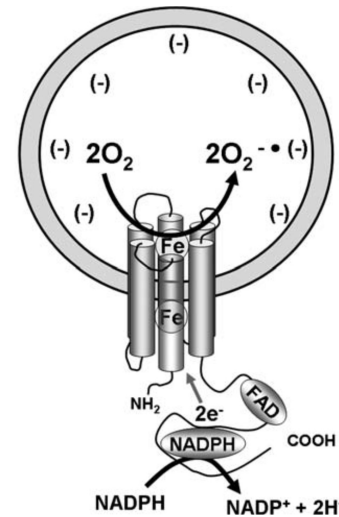
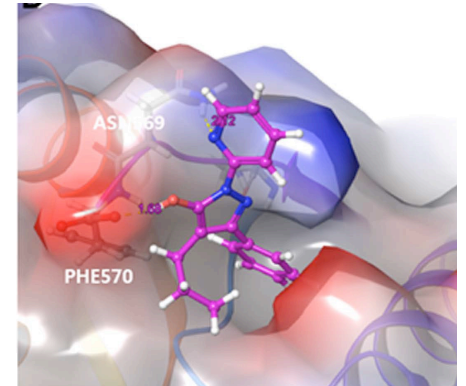
Увеличение уровня pH



Специфический ингибитор НАДФН-оксидаз - APX-115A



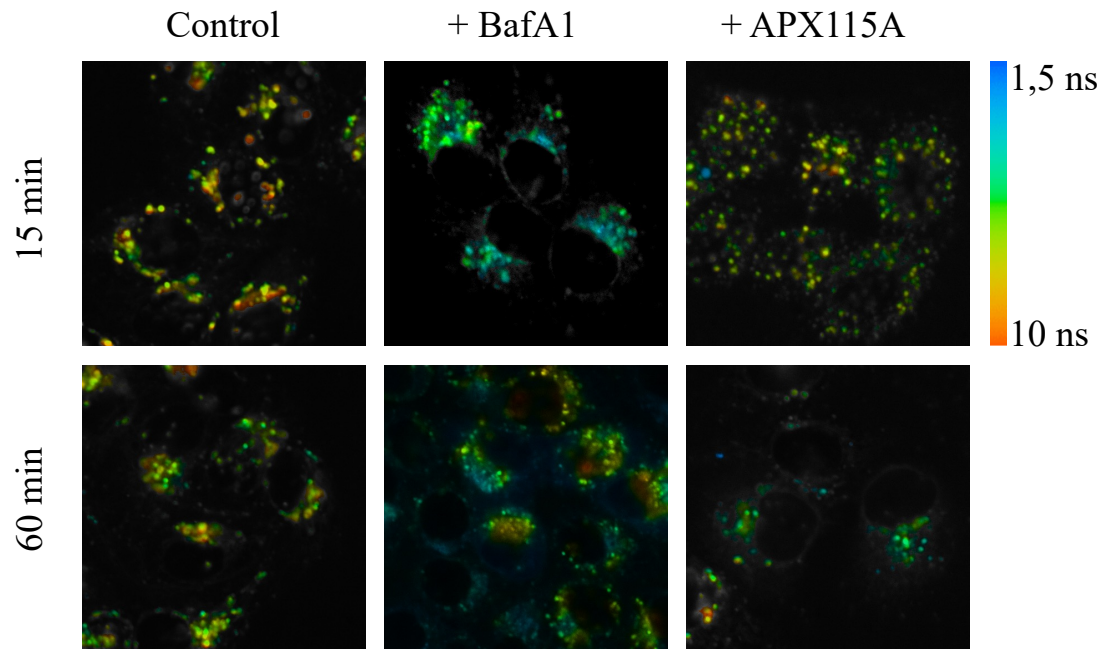
Связывание APX-115A с доменом gp91phox/Nox2



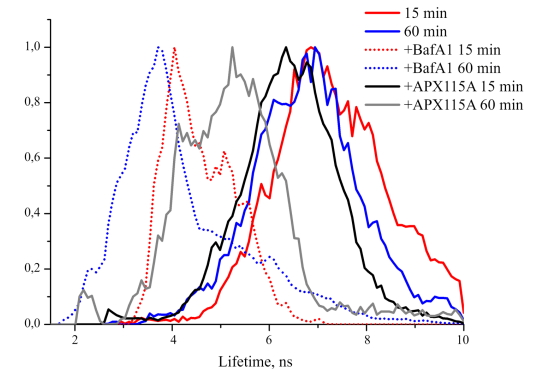
Снижение уровня H₂O₂

Влияние внутриклеточных условий на время жизни люминесценции QDs

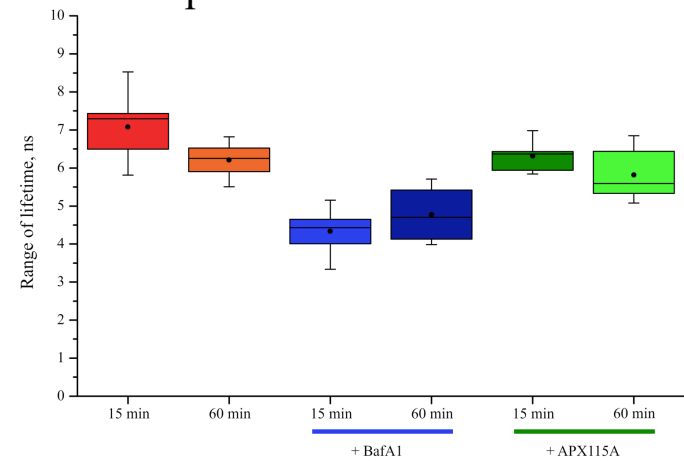
FLIM-визуализация:



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:

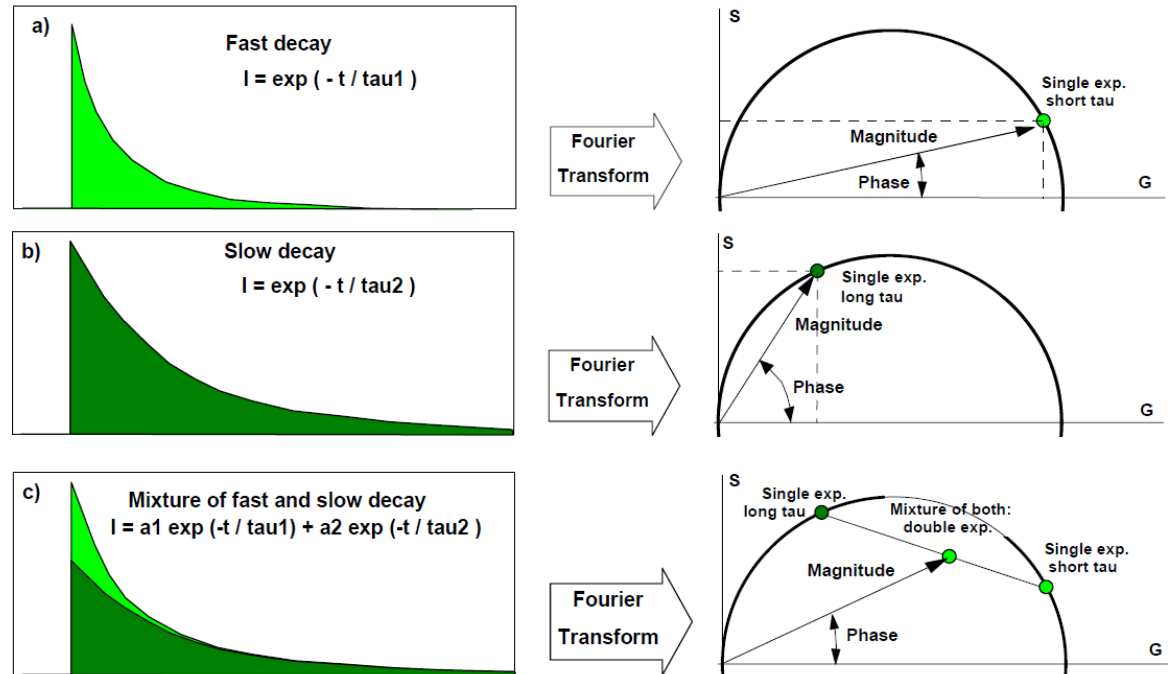
$$G(\omega) + iS(\omega) = \int I(t) \cdot e^{-i\omega t} dt,$$

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

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

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

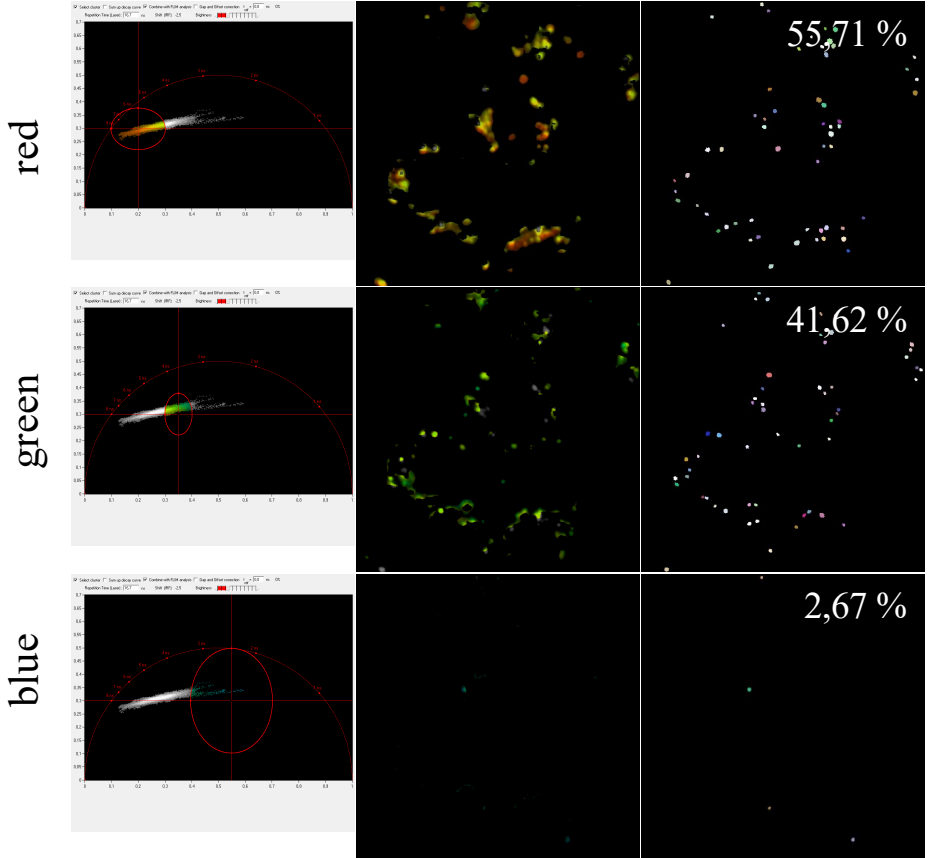
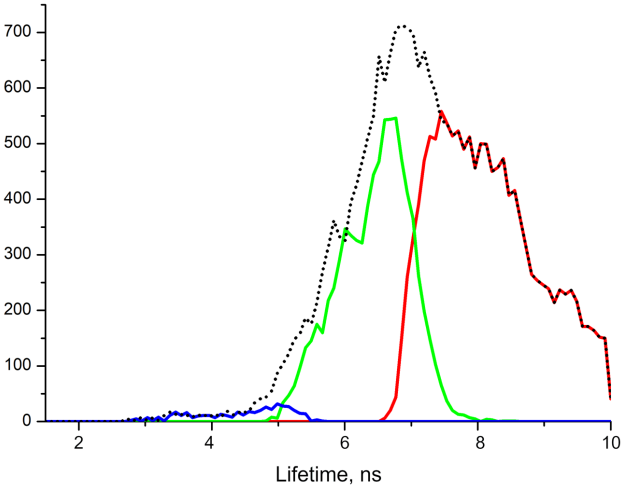
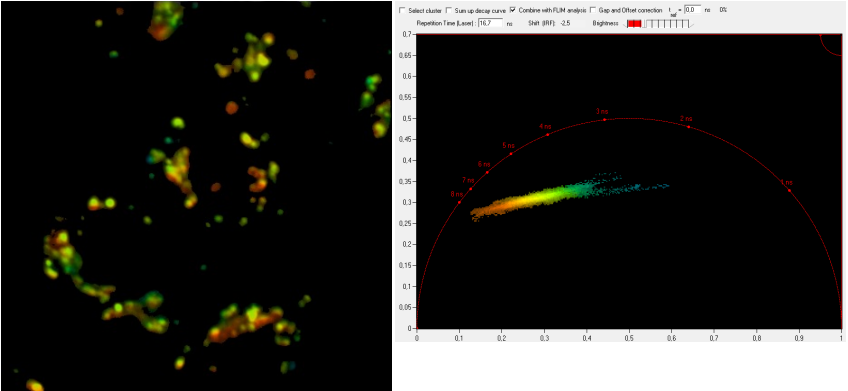


$$\text{Magnitude } M = \sqrt{G^2 + S^2}$$

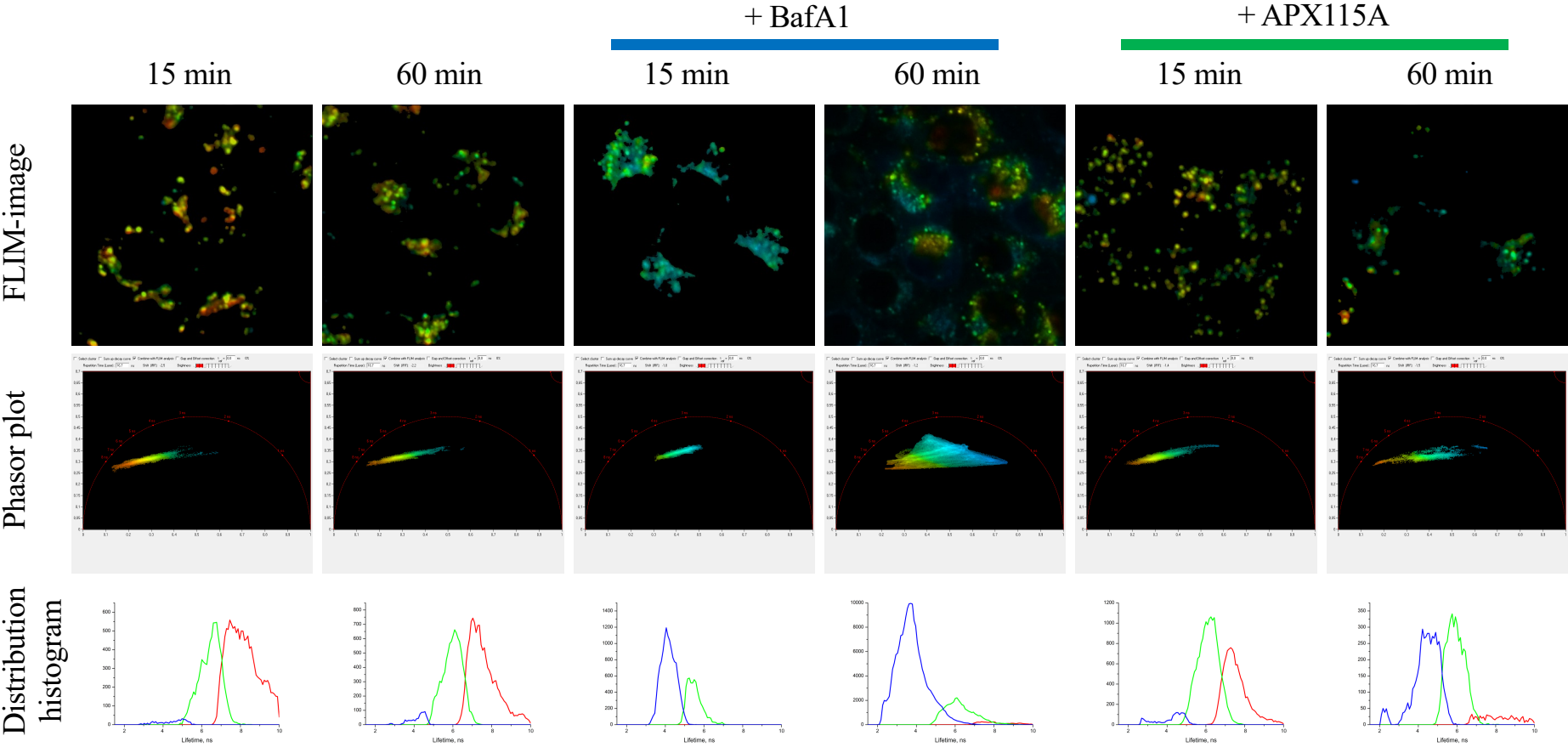
$$\text{Phase } \varphi = \arctan S/G$$

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

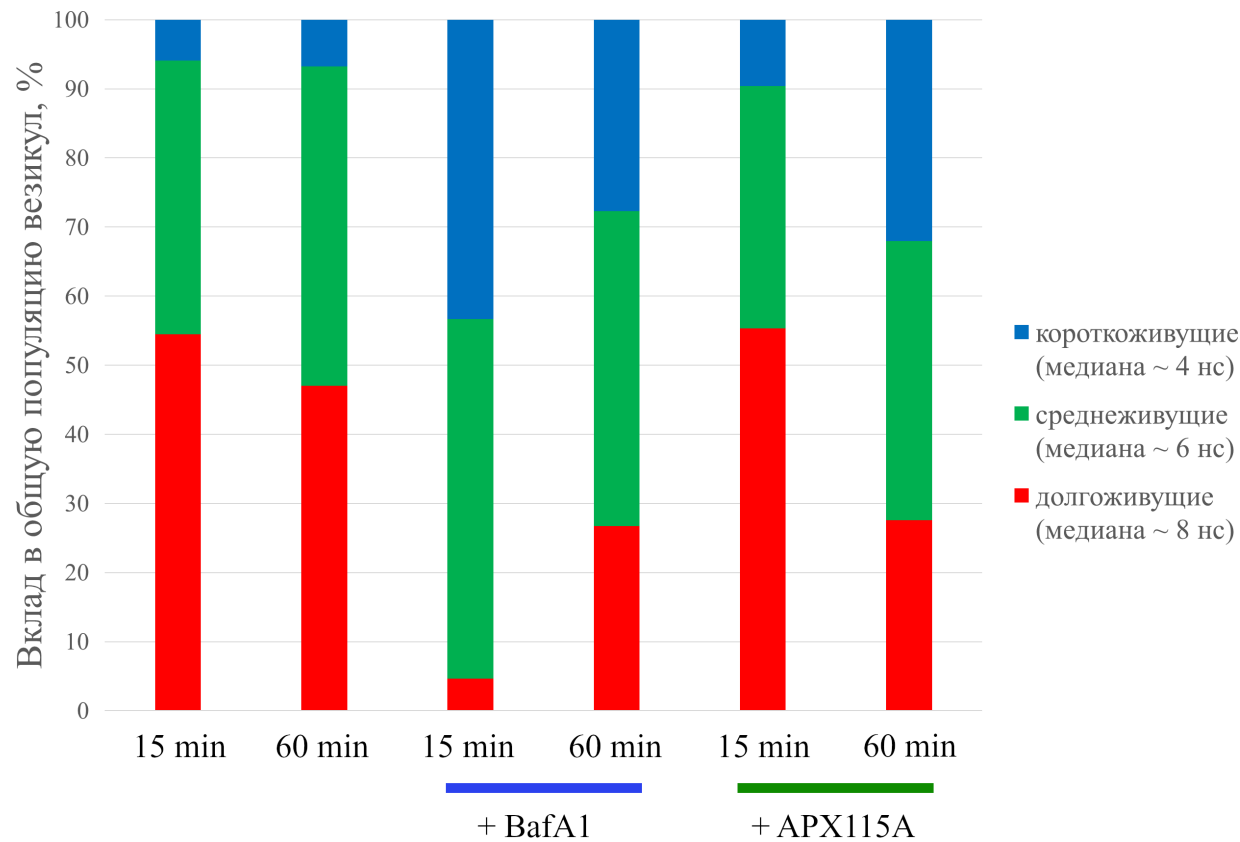
Phasor plot



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



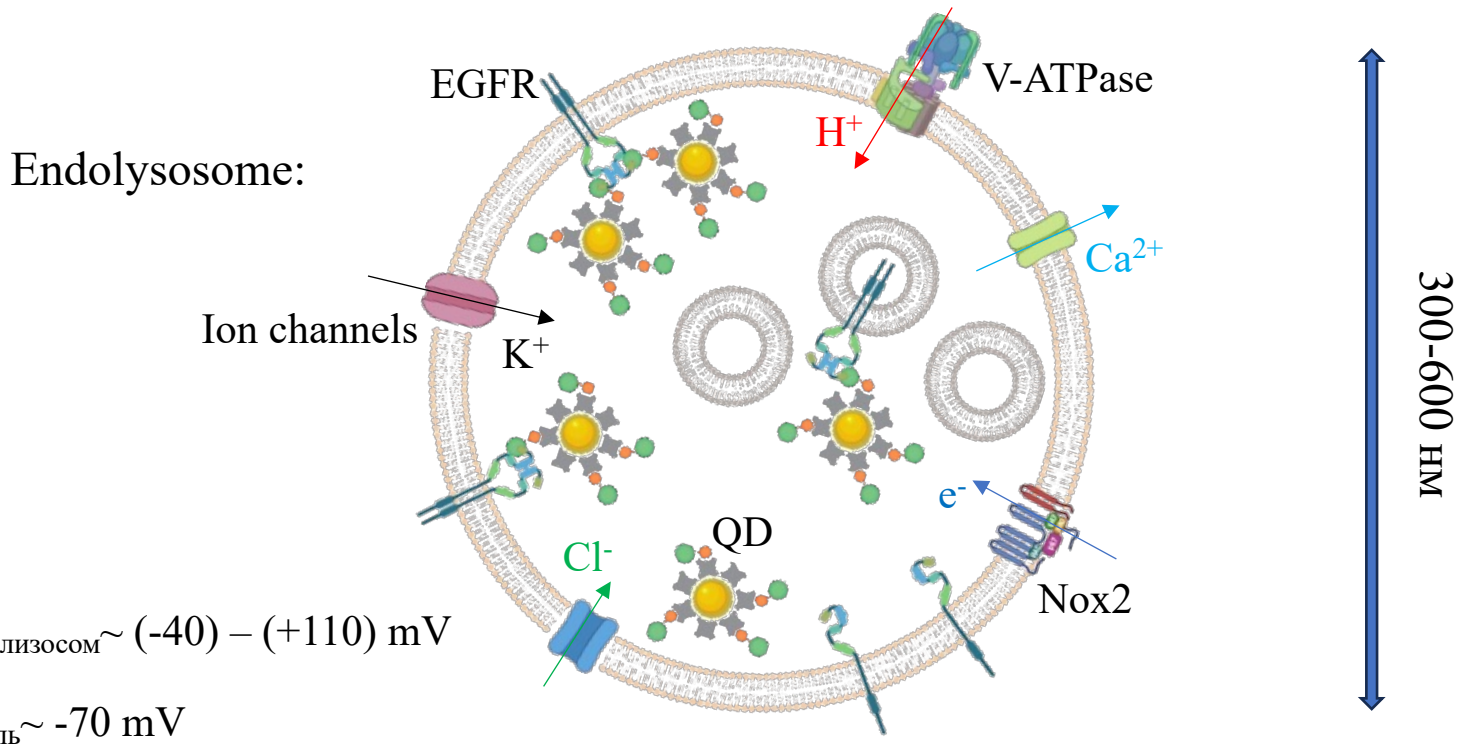
Соотношение популяций QDs с разными временами жизни в зависимости от внутриклеточных условий



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 τ_{QDs} в большей степени, чем уровень H^+ .



Благодарность

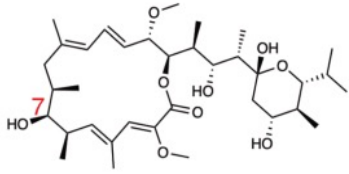
Сотрудникам Лаборатории динамики
внутриклеточных мембран:

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

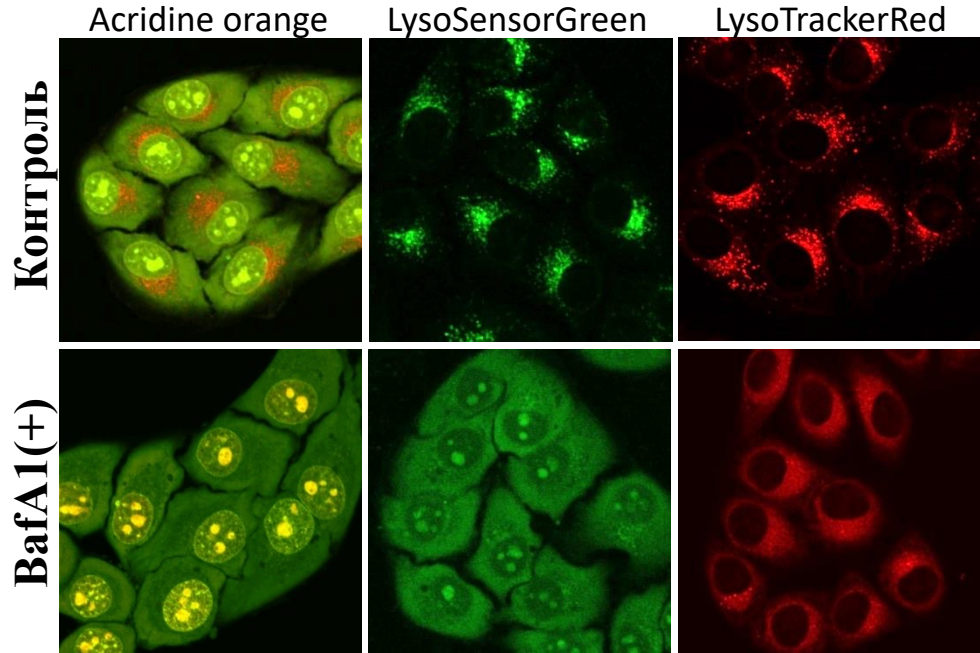
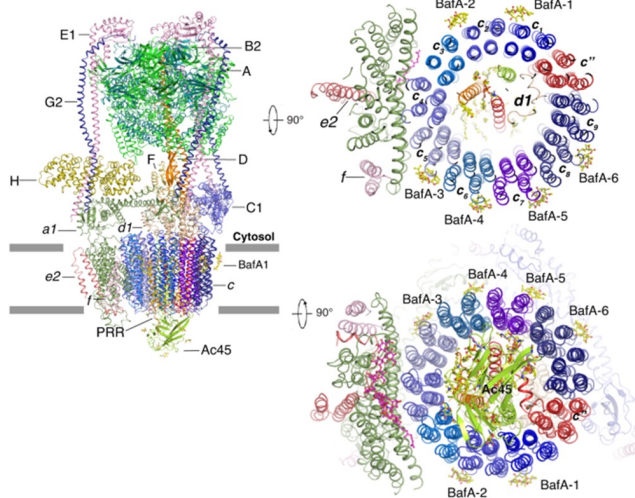
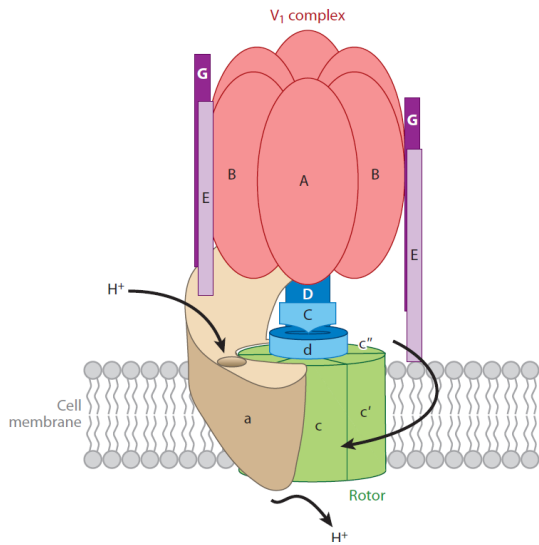
Институту Химии СПбГУ, Научной группе
профессора Туника С.П.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Бафиломидин А1



Bafilomycin A1



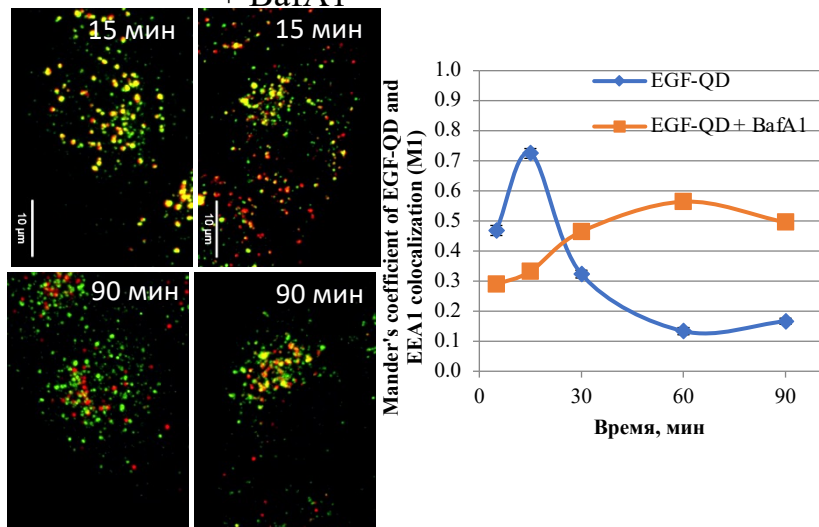
Клетки HeLa, инкубированные без/с BafA1 (100 nM) в течение 30 мин с последующей стимуляцией эндоцитоза рецептора ЭФР (8 nM) и окраской Акридиновым оранжевым (2,5 мкг/мл), LysoSensorGreen (1 мкМ) или LysoTrackerRed (50 нМ). Прижизненная конфокальная микроскопия клеток.

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

клетки HeLa

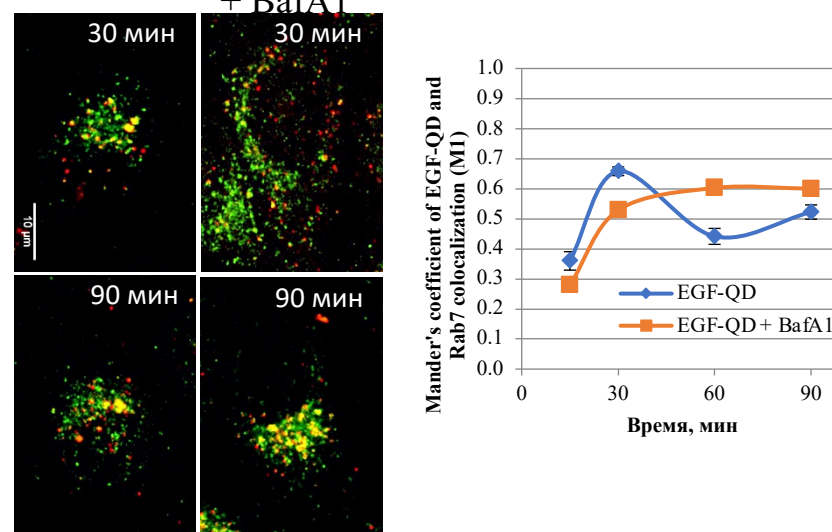
EGF-QDs / EEA1

+ BafA1



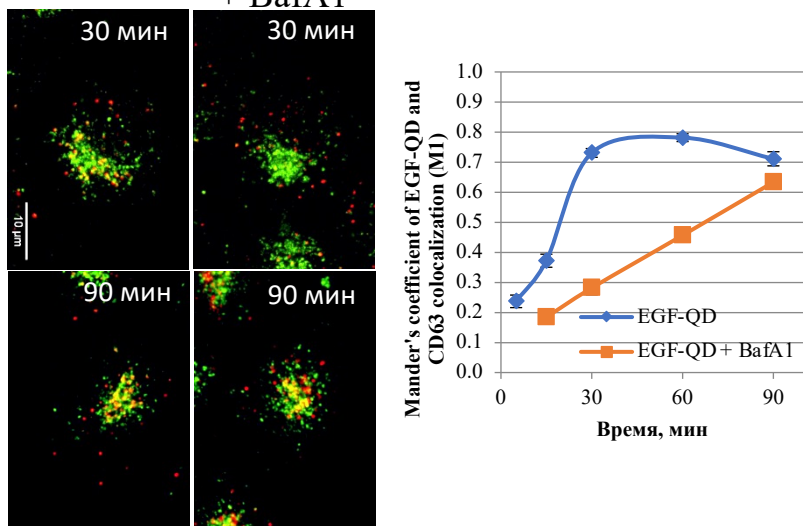
EGF-QDs / Rab7

+ BafA1



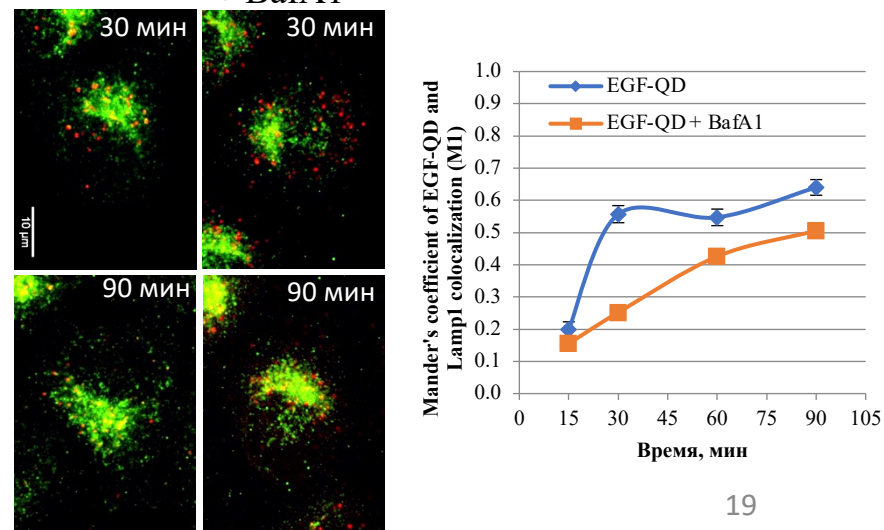
EGF-QDs / CD63

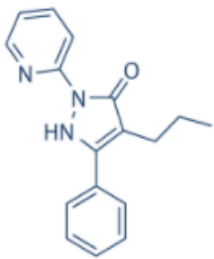
+ BafA1



EGF-QDs / Lamp-1

+ BafA1

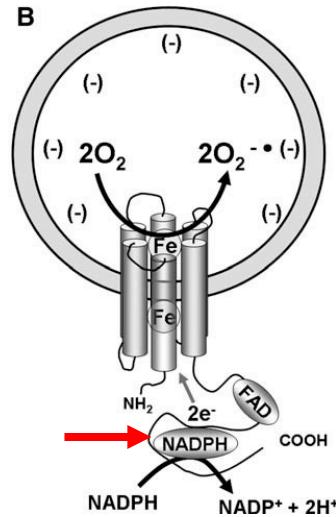
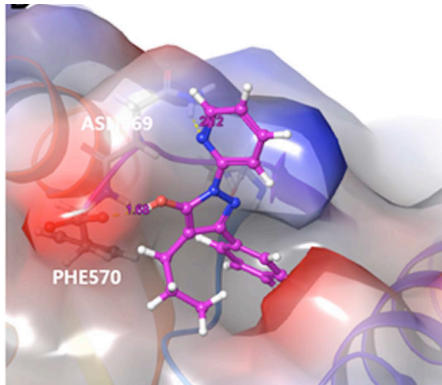




Специфический ингибитор НАДФН-оксидаз - APX-115A

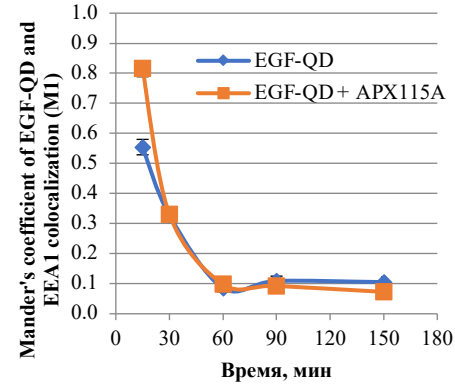
Клетки HeLa, действие APX115A

Связывание APX-115A с доменом gp91phox/Nox2

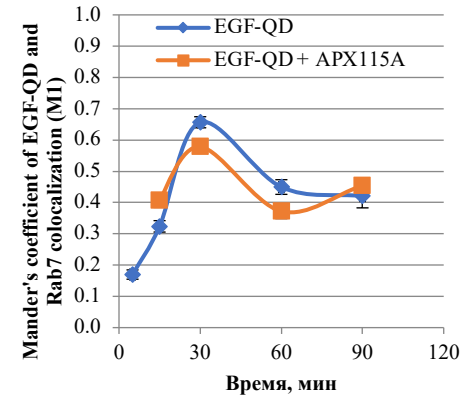


APX115A способен прерывать взаимодействие между NADPH и NADPH-связывающим доменом gp91phox/Nox2 и других изоферментов Nox.

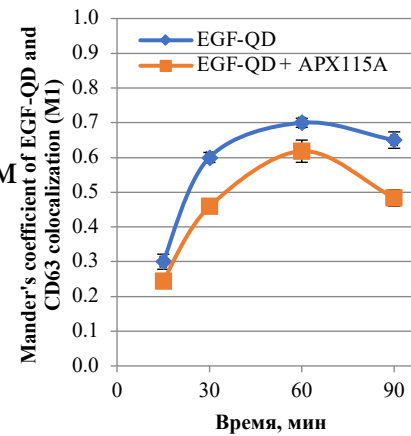
EGF-QDs / EEA1



EGF-QDs / Rab7



EGF-QDs / CD63



EGF-QDs / Lamp-1

