

ПЕРЕВОЩИКОВА Ирина Владимировна

**ИССЛЕДОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ НА УРОВНЕ ОДИНОЧНЫХ ЧАСТИЦ
МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ КОРРЕЛЯЦИОННОЙ
СПЕКТРОСКОПИИ**

03.00.02 - Биофизика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2009

Работа выполнена на Факультете Биоинженерии и Биоинформатики и в Научно-исследовательском институте физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Антоненко Юрий Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Потапенко Александр Яковлевич

доктор биологических наук, профессор
Максимов Георгий Владимирович

Ведущая организация: **Институт Теоретической и
Экспериментальной Биофизики РАН**

Защита состоится «12» ноября 2009 г. в 16 ч 30 мин на заседании Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском Государственном Университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 г. Москва, Ленинские Горы, МГУ, Биологический факультет, кафедра биофизики, «новая» аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «9» октября 2009 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 501.001.96

доктор биологических наук,

профессор

Т.Е. Кренделева

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Источником энергии для большинства биохимических процессов в клетке является АТФ, синтезируемый в митохондриях. На внутренней мембране митохондрий в результате окисления субстратов и векторного переноса протонов и электронов генерируется разность электрохимических потенциалов ионов водорода, используемая впоследствии для работы АТФ-синтазы. Митохондрии также выполняют ряд других важных функций и играют центральную роль в таких процессах как старение и апоптоз. В ходе традиционных измерений различных функциональных параметров митохондрий, в том числе мембранного потенциала, с применением флуоресцентных и радиоактивных меток, а также ион-селективных электродов, регистрируются изменения соответствующего сигнала, усредненного по всем частицам в суспензии выделенных органелл. Однако сложность структуры и уникальность выполняемых функций делает актуальной задачу поиска методов характеристики митохондрий на уровне отдельных частиц в физиологических и патологических условиях. Попытки использования методов цитологических исследований для решения такой задачи не принесли значительных результатов в виду малых размеров органелл по сравнению с размерами клетки. В последние годы для исследования биологических объектов на микроуровне успешно применяется метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС), позволяющий следить за временной и пространственной динамикой отдельных частиц. Однако до сих пор не существовало подхода для изучения субклеточных мембранных структур, таких как митохондрии, методом ФКС. В связи с этим представлялось весьма перспективным разработать вариант метода ФКС, применимый для анализа флуктуаций флуоресценции, связанных с движением одиночных окрашенных митохондрий в объеме пространства, соизмеримого с их размерами, и изучить функциональное состояние митохондрий в суспензии с помощью такого подхода.

Цель и основные задачи исследования. Целью работы явилось определение параметров функционального состояния выделенных митохондрий на уровне одиночных частиц в суспензии модифицированным методом ФКС с применением различных флуоресцентных индикаторов.

В работе планировалось решить следующие задачи:

1. С использованием модельной системы флуоресцирующих сфер разработать метод анализа флуктуаций интенсивности флуоресценции в микроскопическом объеме с целью определения параметров флуоресценции (в том числе, яркости) одиночных частиц.

2. Провести измерения временной зависимости и автокорреляционной функции флуоресценции выделенных митохондрий в суспензии методом ФКС в зависимости от энергизации митохондрий.

3. Применить разработанный на модельной системе подход для определения параметров одиночных флуоресцирующих частиц в суспензии выделенных митохондрий, окрашенных различными флуоресцентными маркерами; оценить величину мембранного потенциала из яркости одиночных митохондрий.

4. Изучить действие модуляторов порина внешней мембраны митохондрий на его функциональное состояние в физиологических условиях с помощью модифицированного в настоящей работе метода ФКС.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В диссертационной работе впервые применена техника ФКС для изучения суспензии выделенных митохондрий на уровне отдельных частиц. Прямое измерение сигнала флуоресценции от одиночных молекул красителя и окрашенных органелл позволило разобраться в механизмах взаимодействия сафранина О с митохондриями в различных энергетических состояниях. Разработан метод анализа амплитуд пиков флуоресценции, позволяющий определить яркость единичной флуоресцирующей частицы в суспензии. Этот подход использован для вычисления мембранного потенциала единичной митохондрии в энергизованном состоянии в суспензии выделенных органелл и числа митохондрий в миллиграмме митохондриального белка. Впервые на

суспензии выделенных органелл показано влияние различных модуляторов на функциональное состояние порина внешней мембраны митохондрий в физиологических условиях. Аналитическое выражение для вычисления яркости одиночной частицы может быть использовано для изучения различных процессов, приводящих к изменению ее величины. Более того, описанный алгоритм математического анализа амплитуд пиков флуоресценции может быть применен для обработки данных ФКС в других лабораториях.

Публикация и апробация работы. По теме диссертации опубликовано 6 работ, из них: две в реферируемом научном российском журнале («Биохимия»), одна в реферируемом научном зарубежном журнале («Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes») и 3 в тезисах конференций: 6-го конгресса Европейского Биофизического Общества (Лондон, Великобритания, 2007), 7-го конгресса Европейского Биофизического Общества (Генуя, Италия, 2009) и 48-го съезда Американского Биофизического Общества (Лонг Бич, США, 2008).

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на страницах машинописного текста и включает Введение, Литературный обзор, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Выводы, Заключение и Список цитируемой литературы из ссылок. В работе содержится рисунок и таблицы.

Во **Введении** дано обоснование актуальности темы диссертационной работы и указаны ее цели и задачи.

В **Литературном обзоре** проанализированы имеющиеся данные о роли митохондрий в жизнедеятельности клетки и методах изучения их функционального состояния. Обсуждено применение различных флуоресцентных индикаторов мембранного потенциала и флуорометрических методов его измерения как в клетках, так и в суспензии выделенных органелл. Рассмотрено влияние порина внешней мембраны митохондрий на функциональное состояние органелл и клетки в целом. Проанализированы работы по исследованию митохондрий на уровне одиночных частиц. Дано описание метода ФКС и применения его для исследования отдельных биомолекул.

В **Экспериментальной части** описаны основные объекты и методы исследования.

Выделение митохондрий.

Митохондрии из печени крыс выделяли методом дифференциального центрифугирования (три осаждения по 10 минут при 1100 g, 12000 g и 13300 g). Среда выделения (рН 7,4) содержала 250 мМ сахарозы, 20 мМ MOPS, 1 мМ ЭГТА, 1,2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА). Белок определяли по стандартной методике с использованием бицинхониновой кислоты и БСА в качестве стандарта.

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия.

Прибор для ФКС представляет собой микрофлуориметр, в котором с высоким временным разрешением (до 1,5 нс) регистрируются отдельные фотоны флуоресценции, испускаемые частицами, движущимися в маленьком объеме пространства (рис.1А). Для возбуждения красителя в нашей установке использовался твердотельный лазер Nd:YAG 532 нм, сопряженный с эпифлуоресцентным инвертированным микроскопом Olympus IMT-2 (США) с водно-иммерсионным объективом 40x, 1,2 NA («Carl Zeiss», Германия). Флуоресцентный сигнал проходил через соответствующий дихроический разделитель и проецировался на сердцевину световода (50 мкм), связанного с лавинным фотодиодом (SPCM-AQR-13-FC, «PerkinElmer Optoelectronics», Канада). Сигнал преобразовывался с помощью интерфейсной карты (Flex02-01D/C, «Correlator.com», США). Для корректной работы прибора перед опытом проводилась настройка положения световода относительно оптической оси. Для этого измерялась автокорреляционная функция флуктуаций флуоресценции раствора 10 нМ родамина 6G, которая в оптимуме характеризовалась временем трехмерной диффузии $\tau_d=180$ мкс. Эта величина позволяет охарактеризовать значение радиуса (в горизонтальной плоскости) конфокального эллипсоида (рис.1Б) как $r_0 = \sqrt{4 \cdot D \cdot \tau_d} = 0,42$ мкм, предполагая коэффициент диффузии родамина 6G равным $D=2,5 \cdot 10^{-6}$ см²/с (объем конфокального эллипсоида равен 11 фемтолитрам). Данные фиксировались в течение 30 с. Большинство опытов проводилось в условиях перемешивания

суспензии с помощью вращающейся лопасти (скорость вращения 600 об./мин), прикрепленной к электромотору, расположенному сверху столика микроскопа. Регистрировалась флуоресценция от конфокального объема, расположенного в 50 мкм над покровным стеклом, на которое наносилось 60 мкл исследуемой суспензии.

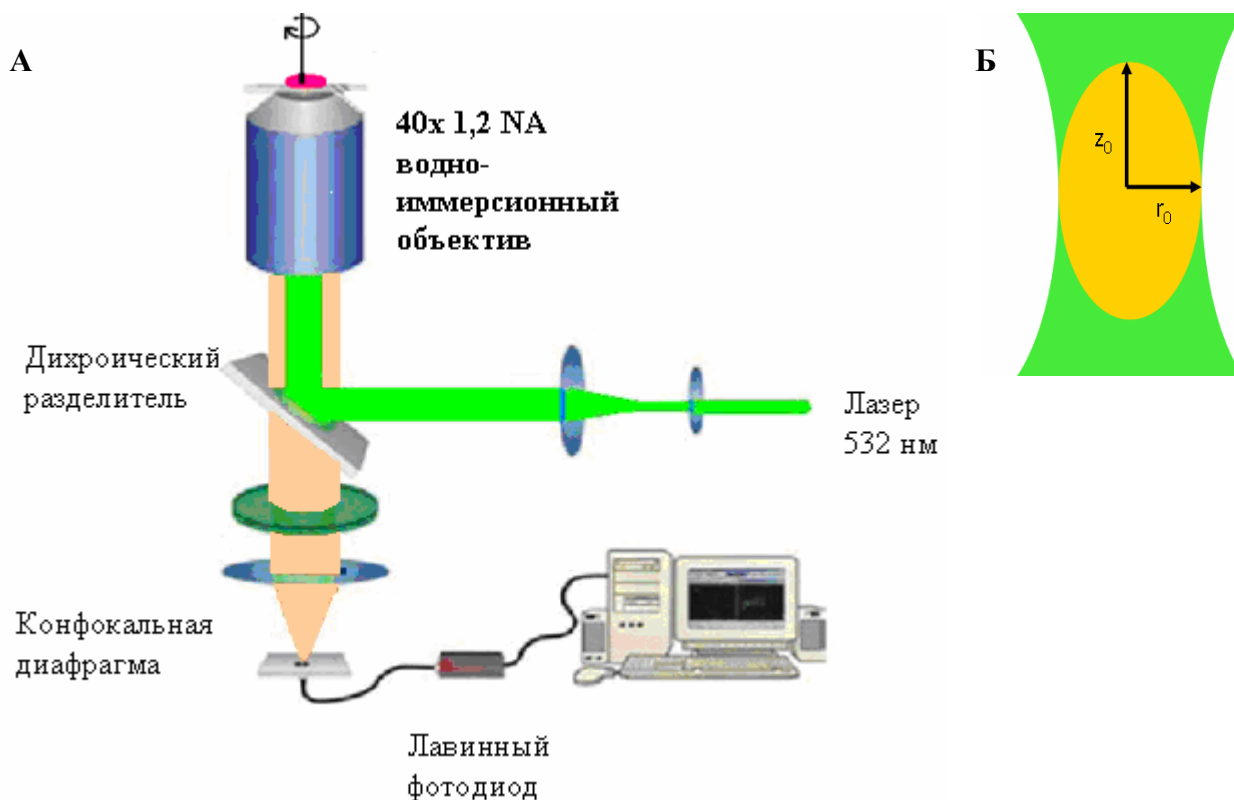


Рис.1. А - Схема прибора для ФКС. Б – Форма и параметры конфокального объема (поперечный срез).

Обработка сигнала.

Преобразованный сигнал от детектора представляется в виде зависимости интенсивности флуоресценции от времени ($F(t)$), соответствующей автокорреляционной функции ($G(\tau)$) и гистограммы распределения интенсивностей флуоресценции, а также среднего значения флуоресценции, регистрируемой от конфокального объема за данный интервал времени измерения.

Автокорреляционная функция $G(\tau)$ является способом количественной обработки флуктуирующего сигнала $F(t)$ интенсивности флуоресценции:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1)$$

где $\langle F(t) \rangle$ – средняя интенсивность флуоресценции, а $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ – отклонение от среднего значения.

Для случая трехмерной диффузии частиц в конфокальном объеме аналитическое выражение для функции $G(\tau)$ имеет вид:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_d}} \right) \cdot \left(\frac{1}{\sqrt{1 + \frac{r_0^2 \cdot \tau}{z_0^2 \cdot \tau_d}}} \right) \quad (2),$$

где N – среднее число флуоресцирующих частиц в конфокальном объеме; r_0, z_0 – геометрические характеристики конфокального объема; τ_d – время диффузии частицы. Справедливо следующее соотношение $N = 1/G(\tau \rightarrow 0)$.

Основными параметрами, получаемыми при аппроксимации экспериментальных кривых уравнением (2), являются время диффузии частиц τ_d и число частиц в конфокальном объеме N . Параметр τ_d обратно

пропорционален коэффициенту диффузии $\tau_d = \frac{r_0^2}{4 \cdot D}$, а следовательно, прямо

пропорционален размеру частицы $D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R}$, где k – постоянная Больцмана,

T – температура, η – вязкость раствора, R – радиус частицы.

Временная зависимость интенсивности флуоресценции $F(t)$ для суспензии ярких частиц характеризуется появлением скачков (или пиков) сигнала на фоне практически постоянного (низкоамплитудного) сигнала базового уровня. Каждый скачок соответствует прохождению отдельной частицы через конфокальный объем. На рис.2А представлена запись $F(t)$ для суспензии флуоресцирующих сфер одинаковой яркости диаметром 1 мкм. Пики сигнала в записи $F(t)$ анализировались с помощью программы WinEDR Strathclyde Electrophysiology Software (J. Dempster, Великобритания). Программа, первоначально разработанная для анализа электрофизиологических данных, дает возможность производить подсчет числа событий $N(F > F_0)$, для которых значение $F(t)$ становится больше заданного порога (F_0). На рис.2Б представлена полученная с помощью программы WinEDR зависимость числа событий от амплитуды пиков для записи $F(t)$, представленной на рис.2А.

При обработке сигнала с помощью программы WinEDR в сложных системах, включающих как свободный, так и связанный с другими частицами краситель, значение минимальной интенсивности флуоресценции $F_{нач}$ определялось из максимума на гистограмме распределения интенсивностей флуоресценции. Это позволяло учитывать лишь вклад связанного красителя.

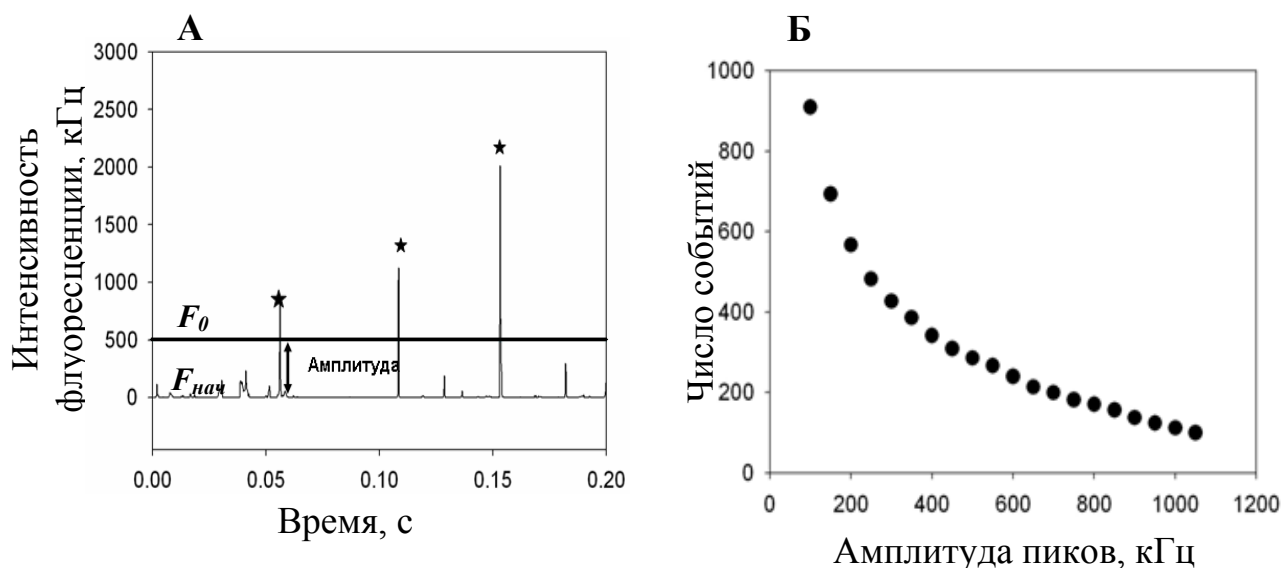


Рис.2 А – Временная зависимость интенсивности флуоресценции суспензии флуоресцирующих сфер диаметром 1 мкм. Б - зависимость числа событий $N(F > F_0)$ от амплитуды пиков флуоресценции для 30 с записи, часть которой показана на рис.2 А.

Основные результаты работы

Автокорреляционный анализ флуктуаций флуоресценции суспензии митохондрий, окрашенных флуоресцентными красителями.

Традиционно метод ФКС используется для исследования процессов, связанных с изменением подвижности биологических объектов, причем этот метод применим только для малых объектов (молекул, супрамолекулярных структур, размер которых меньше размеров конфокального объема). Поскольку подвижность объектов зависит от их размеров, метод ФКС позволяет с помощью флуоресцентных маркеров изучать такие процессы как агрегация частиц, связывание флуоресцирующих молекул с надмолекулярными комплексами, липидными везикулами и т.д. Мы применили автокорреляционный анализ для изучения диффузионных характеристик

митохондрий в неэнергизованном (в отсутствие субстратов окисления), энергизованном (после добавления сукцината) и деэнергизованном состоянии (после добавления разобшителя окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенола, ДНФ), используя различные флуоресцентные красители: этиловый эфир тетраметилродамина (ТМРЭ), сафранин О, родамин 123, митотрекер красный. Время диффузии митохондрий в энергизованном состоянии, окрашенных ТМРЭ, составило $\tau_d=0,067\pm 0,009$ с, коэффициент диффузии $D=0,69$ мкм²/с, что, исходя из сферической формы частицы и с учетом вязкости буферного раствора сахарозы, дает величину радиуса $R=0,23$ мкм. Было показано, что подвижность митохондрий в энергизованном и неэнергизованном состоянии близка (добавка субстрата дыхательной цепи сукцината не оказывает значительного влияния на величину τ_d). Кроме того, оказалось, что в условиях свободной диффузии таких крупных объектов как митохондрии, за типичное время измерения (30 с) регистрируется число событий, недостаточное для точной статистической обработки. Поэтому основные параметры автокорреляционной функции (время диффузии и число частиц в конфокальном объеме) варьируют даже в идентичных экспериментальных условиях. Следует учесть, что в случае таких объектов, как выделенные митохондрии, которые быстро теряют функциональную активность, точность измерений невозможно повысить за счет длительного накопления данных. Таким образом, традиционный способ анализа данных, полученных методом ФКС, не может быть применен в случае суспензии митохондрий. Однако, в наших экспериментах было замечено, что амплитуда флуктуаций флуоресценции митохондрий, окрашенных ТМРЭ, значительно различается в зависимости от их энергетического состояния и, следовательно, может быть использована для оценки его главной характеристики, а именно, мембранного потенциала, на уровне отдельной митохондрии. Поскольку амплитуда флуктуаций интенсивности флуоресценции не должна зависеть от размера частиц, а определяется, при постоянных технических характеристиках прибора, числом молекул флуорофора на одну частицу, было предложено

использовать этот параметр в качестве критерия взаимодействия потенциалзависимых флуоресцентных красителей с митохондриями.

Анализ зависимостей интенсивности флуоресценции от времени для суспензии митохондрий, окрашенных ТМРЭ.

На рис.3А показана временная зависимость интенсивности флуоресценции красителя ТМРЭ, которая в данном масштабе представляет собой прямую линию (кривая 1, рис.3А). Добавление митохондрий (неэнергизованное состояние) в раствор ТМРЭ приводит к появлению в записи флуоресценции пиков небольшой амплитуды, вследствие, по-видимому, неспецифической сорбции молекул красителя на поверхности митохондрий (кривая 2, рис.3А). Последующее добавление сукцината приводит к существенному увеличению амплитуды пиков, которое, очевидно, вызвано энергозависимым входом флуоресцентных молекул внутрь митохондрий в ответ на генерацию мембранного потенциала (кривая 3, рис.3А). Последующее добавление ДНФ приводит к падению числа и амплитуды пиков, связанному с выходом красителя из митохондрий при переходе в деэнергизованное состояние (кривая 4, рис.3А).

Для получения статистически достоверной оценки параметров системы необходимо увеличивать время измерения. Однако, длительное воздействие лазерного излучения может привести к выцветанию молекул флуорофора и разобщению митохондрий вследствие фотодинамического действия. Поэтому для увеличения числа событий без увеличения продолжительности измерений мы применили перемешивание суспензии митохондрий, которое не влияет на амплитуду флуктуаций флуоресценции.

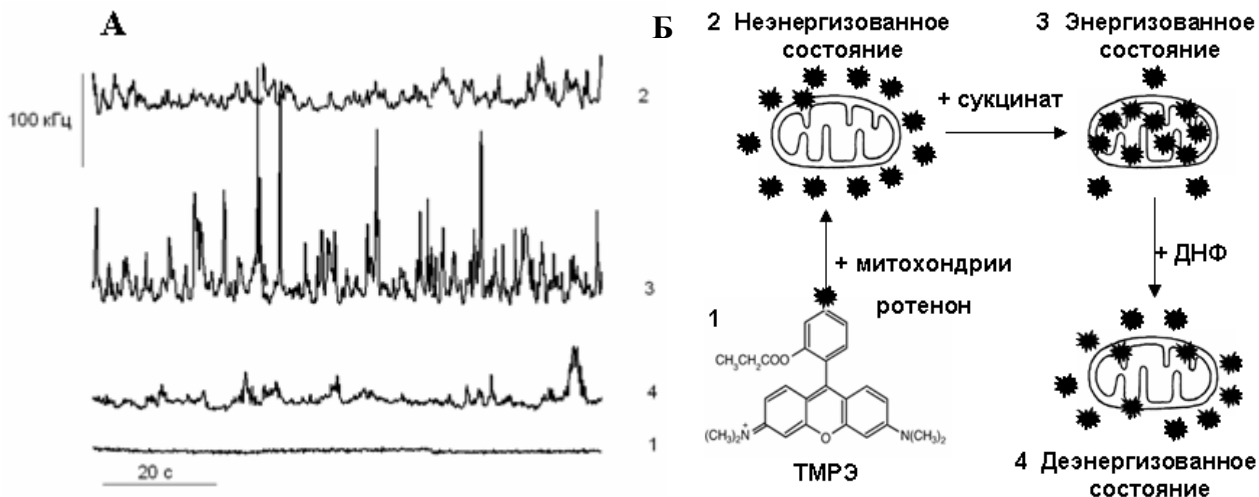


Рис.3. А - зависимость интенсивности флуоресценции от времени для суспензии митохондрий, окрашенных ТМРЭ 0,3 мкМ, в отсутствие перемешивания. 1 – контрольная запись в растворе ТМРЭ, 2 – неэнергизованное состояние, митохондрии 0,4 мг/мл, ротенон 3 мкМ, 2 – энергизованное состояние, добавка сукцината 5 мМ, 3 – деэнергизованное состояние, добавка ДНФ 100 мкМ. Б – схематическое представление цепи событий взаимодействия красителя ТМРЭ с отдельной митохондрией в различных энергетических состояниях.

На рис.4А приведены зарегистрированные в условиях перемешивания временные зависимости интенсивности флуоресценции суспензии митохондрий, окрашенных ТМРЭ. На рис.4Б приведены соответствующие гистограммы распределения интенсивностей флуоресценции для записей, изображенных на рис.4А. Из сравнения данных, представленных на рис.3А и 4А, видно, что перемешивание значительно увеличило число регистрируемых событий, тогда как качественный эффект увеличения числа и амплитуды пиков флуоресценции при энергизации митохондрий сохранился. Гистограмма распределения интенсивностей флуоресценции показывает вероятность нахождения частицы с определенной яркостью в конфокальном объеме. Так как энергизация приводит к увеличению яркости отдельных частиц, на гистограмме 2 (рис.4Б) появляется соответствующее правое плечо высоких интенсивностей флуоресценции.

Пики флуоресценции имеют большой разброс по амплитуде даже в случае одинаковых по яркости флуоресцирующих сфер (рис.2А).

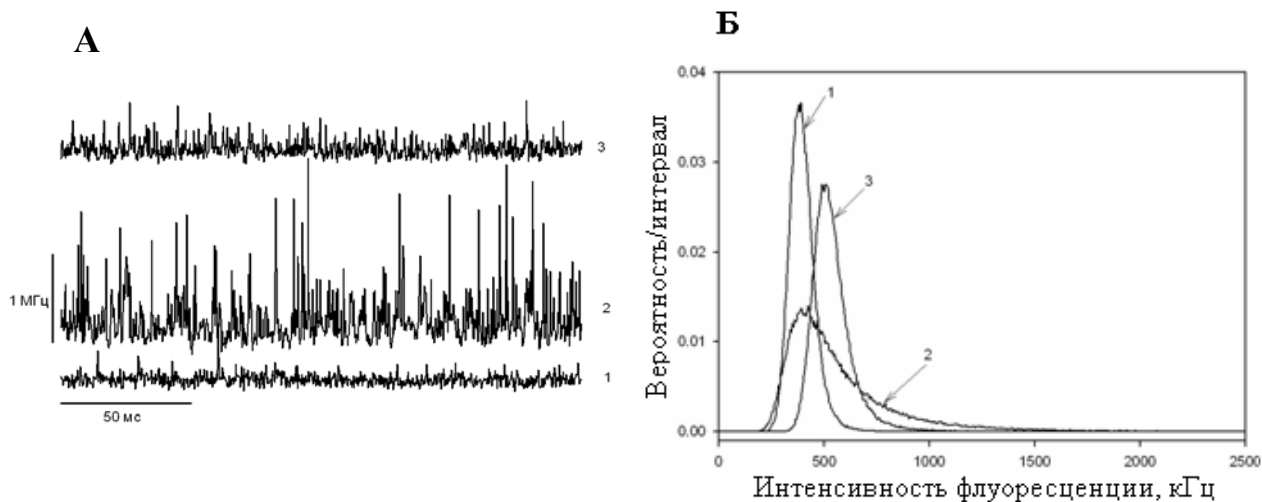


Рис.4. А – зависимость интенсивности флуоресценции от времени для суспензии митохондрий, окрашенных ТМРЭ (0,03 мкМ), в условиях перемешивания. 1 – митохондрии 0,26 мг/мл, ротенон 7 мкМ, 2 – добавка сукцината 7 мМ, 3 – добавка ДНФ 100 мкМ. Б – гистограмма распределения интенсивностей флуоресценции для условий рис.4А

Это связано с существенно неоднородной освещенностью конфокального объема. Поэтому для определения яркости отдельных митохондрий в суспензии мы разработали метод анализа амплитуд пиков флуоресценции, который позволяет вычислять интенсивность флуоресценции единичной частицы, проходящей через центр области освещения, где интенсивность лазерного возбуждения максимальна.

Вывод аналитического выражения для определения яркости частицы, проходящей через центр конфокального объема.

Аналитическое выражение функции распределения интенсивности флуоресценции для точечных частиц одинаковой светимости B_0 (пропорциональной коэффициенту экстинкции и квантовому выходу флуоресценции красителя) было получено в предположении, что вероятность обнаружения частицы в конфокальном объеме описывается функцией Гаусса в трехмерном пространстве. Тогда максимальная яркость движущейся частицы определяется по уравнению (3):

$$F = B_0 \cdot A \cdot \exp(-2r^2 / r_0^2) \cdot \exp(-2z^2 / z_0^2), \quad (3)$$

где A – максимальная интенсивность света в центре конфокального объема, r , z – координаты точки максимального сближения с центром конфокального объема.

Доля событий, для которых амплитуда больше F_0 , т.е. $P(F > F_0)$, составит

$$P(F > F_0) = -P_0 \cdot \ln\left(\frac{F_0}{A \cdot B_0}\right) \text{ для } F_0 < A \cdot B_0 \text{ и } P(F > F_0) = 0 \text{ для } F_0 > A \cdot B_0 \quad (4)$$

где P_0 – нормировочный множитель, пропорциональный концентрации частиц.

Экспериментально измерялась не вероятность обнаружения событий с амплитудой больше заданного порога, а число таких событий. При этом такое число событий $N(F > F_0)$ прямо пропорционально $P(F > F_0)$. Рассмотрим производную функции $P(F > F_0)$, характеризующую количество событий, происходящих в интервале около $F = F_0$, которую можно получить из уравнения (4) дифференцированием:

$$\frac{dP(F > F_0)}{dF_0} = -\frac{P_0}{F_0}$$

Как было показано в литературе, функция Гаусса в трехмерном пространстве хорошо описывает распределение интенсивности света в области фокусировки в случае двухфотонного лазерного источника возбуждающего света. В нашей оптической схеме используется однофотонный лазер, для которого функция распределения вероятности обнаружения частицы в конфокальном объеме описывается комбинацией функций Гаусса и Лоренца. В некоторых случаях данная функция распределения в конфокальном объеме хорошо описывается функцией Лоренца в трехмерном пространстве:

$$F = B_0 \cdot A \cdot \frac{1}{1 + r^2 / r_0^2 + z^2 / z_0^2}$$

Тогда функция $P(F > F_0)$ и ее производная равны:

$$P(F > F_0) = P_0 \cdot \left(\frac{A \cdot B_0}{F_0} - 1\right); \text{ для } F_0 < A \cdot B_0, \text{ и } P(F > F_0) = 0 \text{ для } F_0 > A \cdot B_0 \quad (5)$$

$$\frac{dP(F > F_0)}{dF_0} = -\frac{P_0 \cdot A \cdot B_0}{F_0^2}$$

Функции распределения (4) и (5) были использованы для аппроксимации экспериментальных данных для флуоресцентных сфер. Оказалось, что

уравнение (4) явно завышает число событий $N(F > F_0)$, а уравнение (5) занижает. Однако сходная функция (6) хорошо описывает данные:

$$P(F > F_0) = P_0 \cdot \left(\sqrt{\frac{A \cdot B_0}{F_0}} - 1 \right) \quad \text{для } F_0 < A \cdot B_0, \text{ и } P(F > F_0) = 0 \text{ для } F_0 > A \cdot B_0 \quad (6)$$

Уравнение (6) было получено путем интегрирования функции $\frac{P_0 \cdot A \cdot B_0}{F^{1.5}}$, которая является промежуточной между $\frac{P_0}{F_0}$ и $\frac{P_0 \cdot A \cdot B_0}{F_0^2}$.

Уравнение (6) дает информацию о двух важных параметрах системы: яркости частицы, проходящей через центр конфокального объема, $A \cdot B_0$, и величине P_0 , пропорциональной концентрации частиц в суспензии.

Проверка аналитического выражения на модельных системах (метод ААП).

Для оценки применимости предложенного выше подхода были проанализированы временные зависимости интенсивности флуоресценции суспензий гомогенных по яркости флуоресцирующих сфер различного размера. Рис.5А показывает, что с увеличением диаметра яркость частицы возрастает. Это хорошо согласуется с информацией о зависимости яркости от размера, предоставленной производителем.

Мы также измерили зависимость числа событий $N(F > F_0)$ от амплитуды пиков для более сложной системы: нефлуоресцирующих сфер, проинкубированных с ТМРЭ в различной концентрации. На вставке к рис.5Б видно, что параметр $A \cdot B_0$ линейно растет с увеличением концентрации ТМРЭ, что отражает сорбцию молекул красителя на поверхность латексных частиц. Таким образом, полученное аналитическое выражение хорошо описывает основные свойства изучаемой системы.

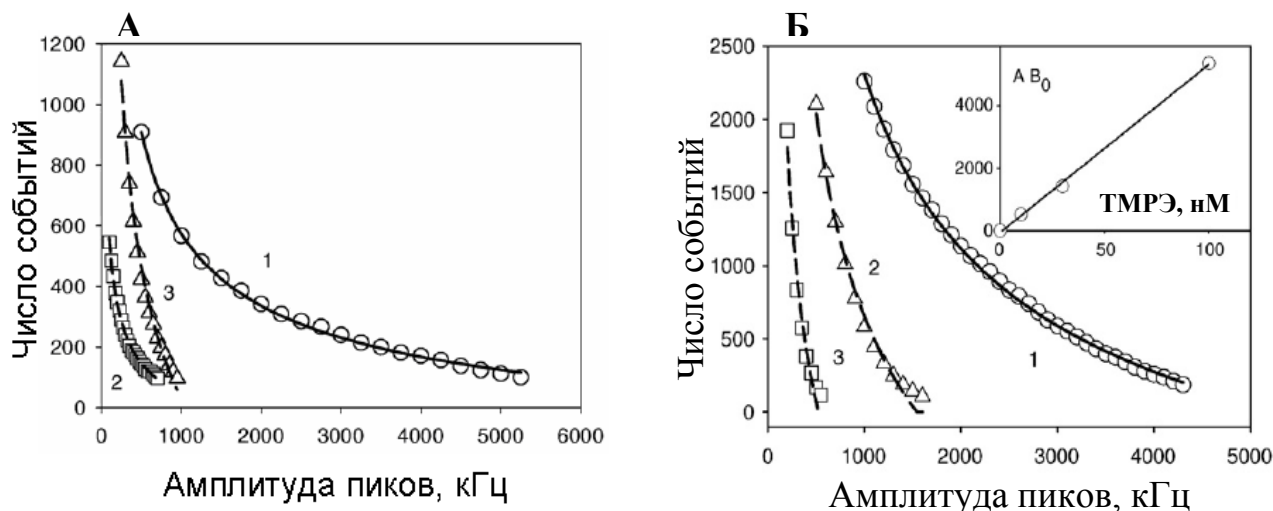


Рис.5 А - Зависимость числа событий $N(F > F_0)$ от амплитуды пиков для флуоресцирующих сфер различного диаметра. Сплошные линии – теоретические кривые, аппроксимирующие экспериментальные данные по уравнению (6). Значения $A \cdot B_0$ и P_0 : 11700 кГц и 240 (диаметр 1 мкм, кривая 1), 1600 кГц и 190 (диаметр 0,5 мкм, кривая 2), 1080 кГц и 1010 (диаметр 0,17 мкм, кривая 3). Б – Зависимость числа событий от амплитуды пиков флуоресценции суспензии латексных частиц (диаметр 0,8 мкм), окрашенных ТМРЭ с различной концентрацией. Сплошные линии – теоретические кривые, аппроксимирующие экспериментальные данные по уравнению (6). Значения $A \cdot B_0$: 5400 кГц (кривая 1, 0,1 мкМ ТМРЭ), 1500 кГц (кривая 2, 0,03 мкМ ТМРЭ), 520 кГц (кривая 3, 0,01 мкМ ТМРЭ)

Зависимость числа частиц в конфокальном объеме, определенного методом ААП, от концентрации митохондрий.

Было обнаружено, что полученные зависимости числа событий $N(F > F_0)$ от амплитуды пиков для эксперимента, представленного на рис.4А, плохо аппроксимируются уравнением (6). Это связано с высокой концентрацией белка и, как следствие, нахождением в конфокальном объеме больше одной частицы. На рис.6А, Б показаны зависимости параметров P_0 и $A \cdot B_0$ от концентрации белка в пробе. Линейный характер концентрационной зависимости параметра P_0 наблюдался вплоть до концентрации белка 0,04 мг/мл. При этом параметр яркости $A \cdot B_0$ (рис.6Б) оставался примерно одинаковым во всем диапазоне концентраций белка. Поэтому для дальнейших

исследований были выбраны условия нахождения в конфокальном объеме не более одной частицы.

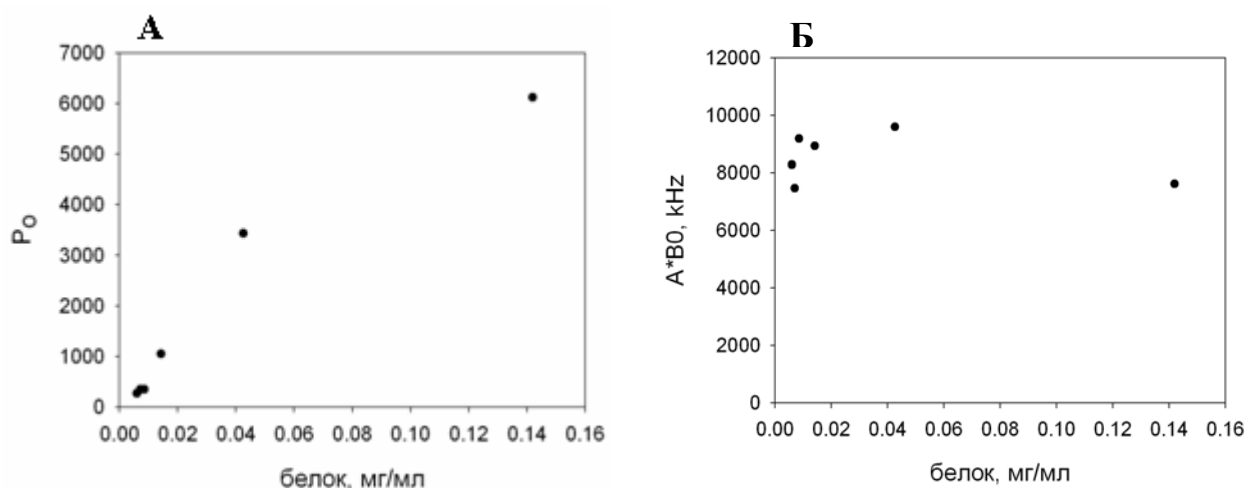


Рис.6 А – Зависимость параметра P_0 от концентрации энергизованных митохондрий в пробе. Условия: ТМРЭ 0,03 мкМ, ротенон 7 мкМ, сукцинат 5 мМ. Б – Зависимость параметра $A \cdot V_0$ для условий эксперимента рис.6 А.

Определение мембранного потенциала на уровне единичных митохондрий.

На рис.7А показаны записи интенсивности флуоресценции суспензии выделенных митохондрий, окрашенных ТМРЭ, на рис.7Б – зависимость числа событий $N(F > F_0)$ от амплитуды пиков и соответствующие теоретические кривые.

Среднее значение параметра $A \cdot V_0$ (характеризующего яркость одной митохондрии), измеренное для шести препаратов выделенных митохондрий в энергизованном состоянии при концентрации ТМРЭ 0,03 мкМ, составило 5950 ± 390 кГц. Зная яркость одной молекулы родамина, можно посчитать мембранный потенциал по уравнению Нернста:

$$\Delta\varphi = -\frac{RT}{F} \log(C_{\text{внутр}} / C_{\text{нар}}) \quad (7)$$

Яркость молекулы родамина была определена с помощью такого же подхода – анализа амплитуд пиков флуоресценции родамин-меченых липосом – и составила 1,3 кГц. Среднее значение параметра $A \cdot V_0$ для препаратов митохондрий в деэнергизованном состоянии, отражающее неспецифическое связывание ТМРЭ с митохондриями, составило 1905 ± 237 кГц. Тогда число

молекул родамина, вошедших в результате энергизации в одну митохондрию,

$$\text{составило } N_{\text{род}} = \frac{5950 \text{ кГц} - 1905 \text{ кГц}}{1,3 \text{ кГц}} = 3112 \text{ молекул}.$$

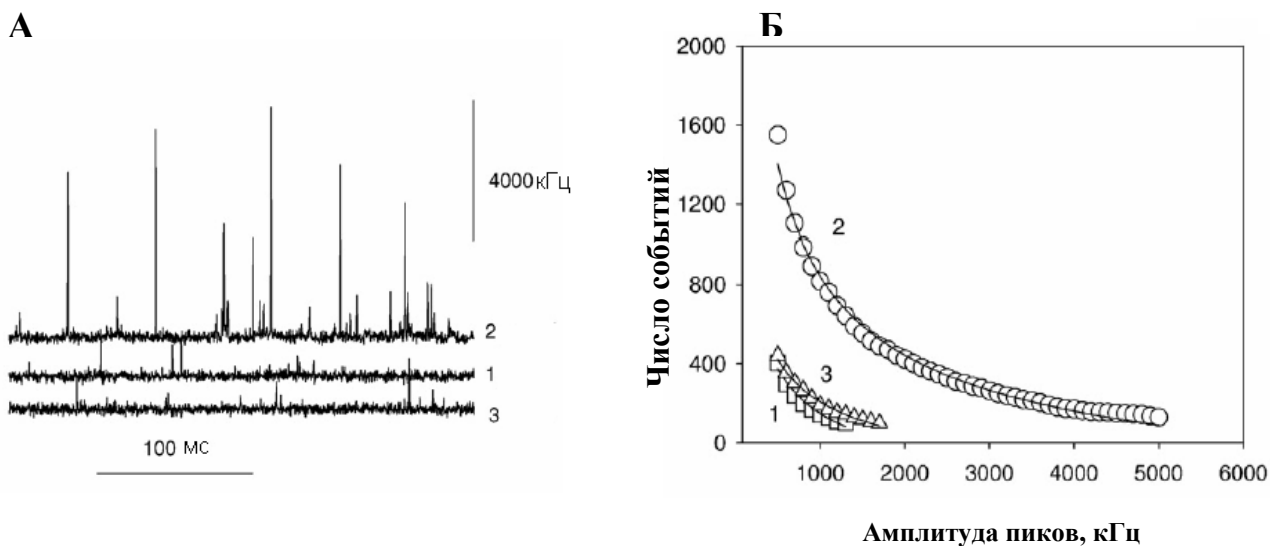


Рис.7. А – временная зависимость интенсивности флуоресценции суспензии митохондрий, окрашенных 0,03 мкМ ТМРЭ. Б – зависимость числа частиц от амплитуды пиков. 1 – митохондрии 0,0044 мг/мл, ротенон 7 мкМ, $A \cdot V_0 = 1882$ кГц, $P_0 = 400$; 2 – добавка сукцината 5 мМ, $A \cdot V_0 = 6600$ кГц, $P_0 = 540$; 3 – добавка ДНФ 100 мкМ, $A \cdot V_0 = 2757$ кГц, $P_0 = 314$

Принимая внутренний объем митохондрии равным $0,17 \text{ мкм}^3$ (такая величина измерена методом электронной микроскопии для митохондрий, выделенных из печени крыс), можно рассчитать концентрацию ТМРЭ внутри частицы:

$$C_{\text{внутр}} = \frac{3112 \text{ мол}}{6 \cdot 10^{23} \text{ мол} / \text{М} \cdot 0,17 \cdot 10^{-15} \text{ л}} = 30 \text{ мкМ}$$

В виду очень низкой концентрации митохондриального белка в пробе, можно считать, что концентрация красителя в растворе не изменяется при добавлении митохондрий, т.е. $C_{\text{нар}} = 0,03 \text{ мкМ ТМРЭ}$. Тогда можно рассчитать потенциал единичной митохондрии:

$$\Delta\varphi = -\frac{RT}{F} \log(C_{\text{внутр}} / C_{\text{нар}}) = 59 \cdot \log(30 \text{ мкМ} / 0,03 \text{ мкМ}) \cong -180 \text{ мВ}$$

Разброс в яркости частиц приводит к разнице в значениях потенциала в несколько милливольт. Подобный расчет был использован для определения

изменений потенциала под действием различных разбавителей в суспензии энергизованных митохондрий. Было показано, что при добавлении 15 мкМ ДНФ потенциал уменьшается на 14 мВ.

Определение числа митохондрий в миллиграмме белка.

Как было показано ранее, параметр P_0 уравнения (6) пропорционален концентрации флуоресцирующих частиц в суспензии. Мы использовали его, чтобы рассчитать важную характеристику суспензии выделенных митохондрий – число частиц в мг белка. Для этого в качестве калибровочной кривой была измерена зависимость P_0 от концентрации флуоресцирующих сфер диаметром 0,5 мкм (рис. 8). На основании этой зависимости, взяв $P_0=540$ для митохондрий из эксперимента, показанного на рис.7Б, удалось определить концентрацию флуоресцирующих частиц в суспензии митохондрий $N/\text{мл}=1,3 \cdot 10^7$. Подставив концентрацию митохондриального белка 0,0044 мг/мл, получаем число митохондрий в 1 мг белка $N/\text{мг}=2 \cdot 10^9$ шт/мг.

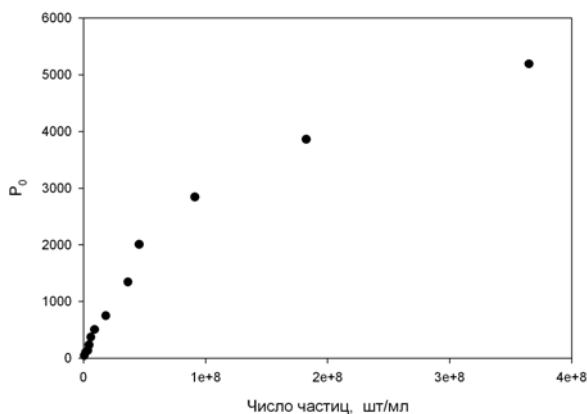


Рис.8 Зависимость параметра P_0 от концентрации флуоресцирующих сфер диаметром 0,5 мкм.

Изучение взаимодействия сафранина О с митохондриями.

Традиционным методом измерения мембранного потенциала выделенных митохондрий является регистрация уменьшения флуоресценции сафранина О в ответ на энергизацию. Как предполагается, это падение флуоресценции связано с уменьшением концентрации красителя в растворе и накоплением молекул флуорофора в митохондриях в концентрации самотушения.

Для проверки данного утверждения мы провели прямые измерения сигнала флуоресценции от отдельных окрашенных митохондрии в суспензии методом ФКС.

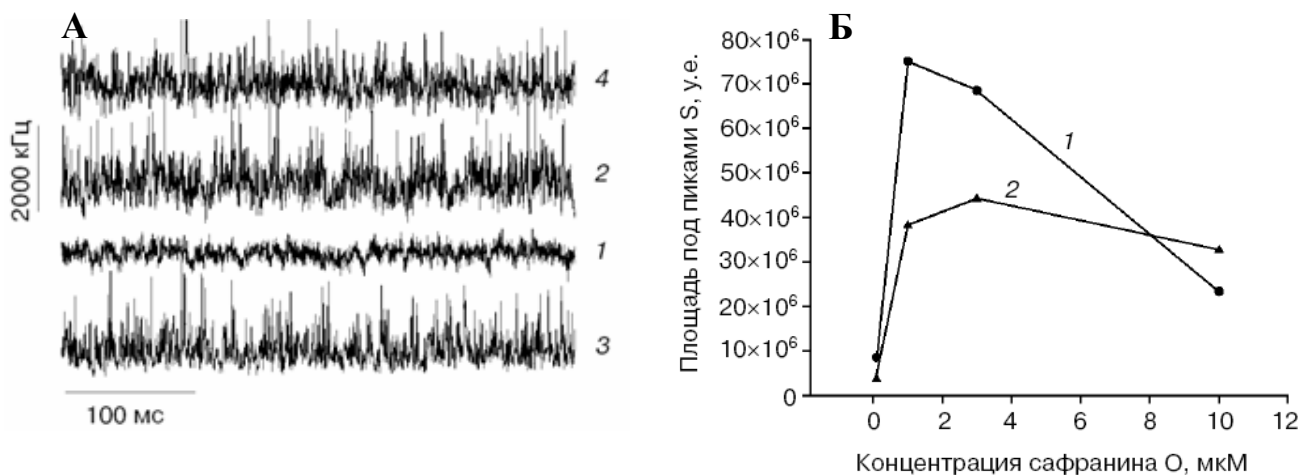
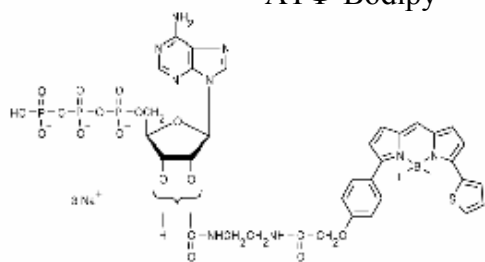


Рис.9. А – Временная зависимость интенсивности флуоресценции суспензии митохондрий, окрашенных сафранином О (10 мкМ). 1 - 10 мкМ сафранина О в буфере, 2 - добавка митохондрий 0,39 мг/мл, ротенон 1 мкМ, 3 - добавка сукцината 5 мМ, 4 - добавка ДНФ 100 мкМ Б – Зависимость площади под пиками в энергизованном (кривая 1) и деэнергизованном (кривая 2) состоянии в присутствии различных концентраций сафранина О. Условия: митохондрии 0,51 мг/мл, ротенон 1 мкМ, сукцинат 5 мМ (кривая 1). Деэнергизованное состояние измерялось в присутствии ДНФ (100 мкМ).

На рис.9А показаны временные зависимости интенсивности флуоресценции красителя в присутствии митохондрий в различных энергетических состояниях. Для количественной характеристики взаимодействия сафранина О с митохондриями на микроуровне вычислялась общая площадь под пиками в записи флуоресценции в присутствии различных концентраций красителя по формуле $S = \sum (F(t) - F_0)$ (рис.9Б). Было показано, что в случае высокой начальной концентрации сафранина О (10 мкМ) энергизация не приводит к увеличению яркости отдельных частиц. Из этого можно сделать вывод, что видимое падение сигнала флуоресценции на макроуровне действительно связано с уменьшением концентрации свободного красителя в растворе и накоплением его в митохондриях в концентрации самотушения. При использовании сафранина О в концентрации 1 мкМ энергизация митохондрий приводила к появлению пиков высокой амплитуды и увеличению общей площади под пиками по сравнению с деэнергизованным состоянием.

Изучение функциональных свойств порина внешней мембраны выделенных митохондрий на уровне одиночных частиц.

Транспорт гидрофильных компонентов в митохондрии осуществляется
АТФ-Vodipy



через специальные белковые каналы в мембранах. Преобладающим по массе канальным белком внешней мембраны митохондрий является порин. В нашей работе метод ФКС был применен для

изучения функционального состояния порина по накоплению флуоресцентно меченого АТФ (АТФ-Vodipy) отдельными митохондриями в суспензии выделенных органелл. Большое число АТФ-связывающих центров внутри митохондрий обеспечивает высокую специфичность связывания АТФ-Vodipy. Контрольные опыты показали, что такой гидрофильный низкомолекулярный краситель как сульфородамин Б не накапливался в митохондриях. Свойства порина ранее изучались электрофизиологическими и биохимическими методами. Мы впервые исследовали действие известных модуляторов поринового канала (НАД^+ , НАДН, полианион Кёнига, гексокиназа) на его функциональное состояние в митохондриях в физиологических условиях. На рис.10А показана зависимость числа событий $N(F > F_0)$ от амплитуды пиков для суспензии неэнергизованных митохондрий с открытым каналом порина, предварительно проинкубированных со специфическим искусственным ингибитором канала полианионом Кёнига.

Предварительная инкубация суспензии митохондрий с выделенной и очищенной митохондриальной гексокиназой также приводила к ингибированию входа меченого АТФ (рис.10Б).), вследствие, по-видимому, ассоциации гексокиназы с порином. Однако в отличие от необратимого действия других модуляторов, действие фермента было обратимым при добавлении глюкозо-6-фосфата, что явно обусловлено диссоциацией фермента. Таким образом, наши данные показали, что связывание гексокиназы приводит к блокированию транспорта АТФ через пориновый канал.

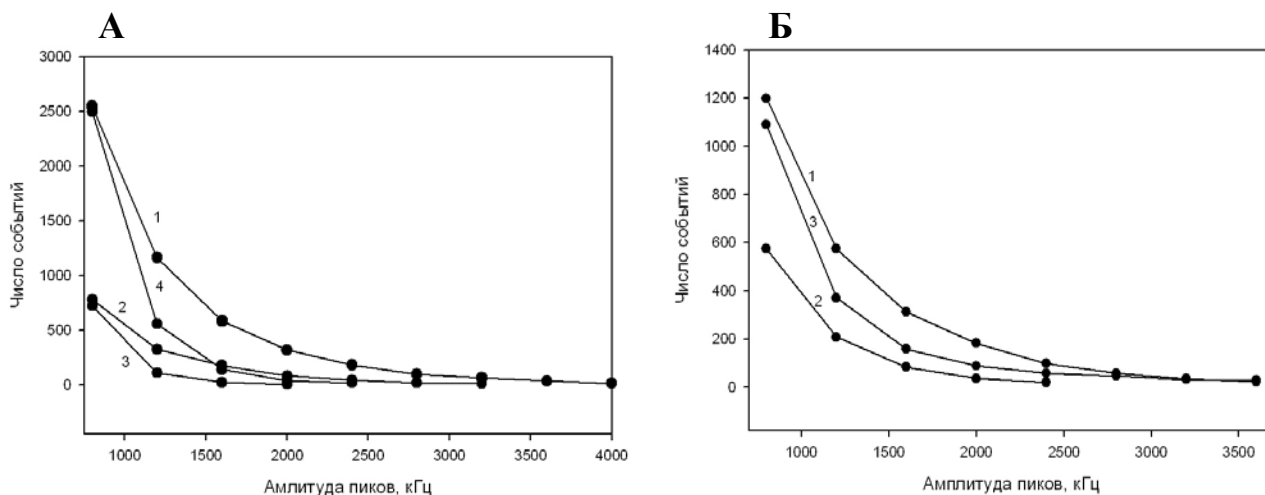


Рис.10 А - Зависимость числа событий $N(F > F_0)$ от амплитуды пиков флуоресценции суспензии митохондрий в присутствии АТФ-Vodipy: действие полианиона Кёнига. 1 – митохондрии 0,04 мг/мл, ротенон 2 мкМ, АТФ-Vodipy 25 нМ, 2 – митохондрии 0,04 мг/мл, ротенон 2 мкМ, 0,06 мг/мл полианион Кёнига, АТФ-Vodipy 25 нМ, 3 – добавка 0,1 мг/мл аламетицина, 4 – добавка 2 мМ АТФ. Б – Зависимость числа событий от амплитуды пиков суспензии митохондрий в присутствии АТФ-Vodipy: действие гексокиназы. 1 – митохондрии 0,04 мг/мл, ротенон 2 мкМ, АТФ-Vodipy 25 нМ, 2 – митохондрии 0,04 мг/мл, ротенон 2 мкМ, гексокиназа 0,27 мг/мл, АТФ-Vodipy 25 нМ, кривая 3 – добавка 1 мМ глюкозо-6-фосфат.

Было показано, что НАДН также подавляет активность канала, тогда как его окисленная форма НАД^+ действует значительно слабее (данные не приведены). Результаты изучения действия перечисленных модуляторов на транспорт АТФ через канал хорошо коррелируют с электрофизиологическими данными по ионной проницаемости порина.

Выводы

1. На основе метода флуоресцентной корреляционной спектроскопии, суть которого состоит в измерении флуктуаций флуоресценции от микрообъема, составляющего несколько фемтолитров, разработан модифицированный экспериментальный подход, названный методом анализа амплитуд пиков (ААП) флуоресценции суспензии окрашенных частиц. Метод ААП позволяет оценить два основных параметра системы: яркость частицы и концентрацию флуоресцирующих частиц в суспензии. Выведено аналитическое выражение

для вычисления яркости одиночной частицы и параметра, пропорционального числу флуоресцирующих частиц в суспензии.

2. Метод ААП опробован на модельной системе, содержащей гомогенные по яркости и размеру флуоресцентные сферы (типичный размер 500 нм).

3. Показано, что метод ААП позволяет исследовать свойства отдельных митохондриальных частиц или их малых ансамблей. Разработанный подход применен для анализа функционального состояния выделенных митохондрий. С помощью анализа флуоресценции суспензии выделенных митохондрий, окрашенных потенциалзависимым флуоресцентным красителем, этиловым эфиром тетраметилродамина (ТМРЭ), измерен мембранный потенциал митохондрий, а также число частиц в миллиграмме белка. Преимущество данного подхода перед традиционными методами измерения мембранного потенциала состоит в том, что он позволяет проводить измерения при наличии менее 1 мкг белка в пробе, что делает доступным изучение митохондрий, выделенных из культур клеток.

4. Прямыми измерениями флуоресценции суспензии энергизованных митохондрий, окрашенных потенциалзависимым красителем сафранином О, показано уменьшение концентрации молекул флуорофора в растворе и накопление их в митохондриальных частицах в концентрации самотушения. При более низких концентрациях сафранина О энергизация митохондрий приводила к увеличению интенсивности флуоресценции отдельных частиц в согласии с результатами, полученными с использованием красителя ТМРЭ.

5. Метод ААП позволил исследовать влияние различных модуляторов порина внешней мембраны митохондрий на вход флуоресцентно меченного АТФ в интактные органеллы в физиологических условиях. Показано, что наличие большого числа АТР-связывающих центров внутри митохондрий обеспечивает накопление флуоресцентно меченного АТФ внутри органелл в высоких концентрациях. Показано также, что связывание фермента гексокиназы приводит к блокированию транспорта АТФ через пориновый канал.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Perevoshchikova I.V., Zorov D.B., Antonenko Y.N. Peak intensity analysis as a method for estimation of fluorescent probe binding to artificial and natural nanoparticles: Tetramethylrhodamine uptake by isolated mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, 1778 (10), 2182-2190, 2008.
2. Перевошикова И.В., Сорочкина А.И., Зоров Д.Б., Антоненко Ю.Н. Сафранин О как флуоресцентный индикатор мембранного потенциала митохондрий: исследование на уровне суспензии и уровне отдельных митохондрий, *Биохимия*, 74 (6), 663-671, 2009
3. Пашковская А.А., Перевошикова И.В., Майзлиш В.Е., Шапошников Г.П., Котова Е.А., Антоненко Ю.Н. Взаимодействие тетразамещенного катионного фталоцианина алюминия с искусственными и природными мембранами. *Биохимия*, 74 (9), 1252-1259, 2009
4. Perevoshchikova I.V., Zorov D.B., Novoderezhkin V.I., Antonenko Y.N. Peak amplitude analysis as a simplified version of the method of photon counting histogram for estimation of binding of a probe to artificial and natural nano-particles. *Abstracts of the 52th Annual Biophysical Society Meeting, Long Beach (USA)*, *Biophys. J.*, 94, 1584, 2008.
5. Perevoshchikova I.V., Zorov D.B., Antonenko Y.N. Brightness analysis of isolated mitochondria doped with TMRE and Mitotracker. *Abstracts of the 6th EBSA European Biophysics Congress, London (U.K.)*, *Eur. Biophys. J.*, 36, S22, 2007.
6. Perevoshchikova I.V., Zorov D.B., Antonenko Y.N. Fluorescently-labeled ATP as a probe of the outer mitochondrial membrane barrier: role of VDAC. *Abstracts of the 7th European Biophysics Congress, Genova (Italy)*, *Eur. Biophys. J.*, 38, 201, 2009.