

УДК 614.001.891

ТЕХНОЛОГИЯ STED — ВОЗМОЖНОСТЬ ПРОНИКНОВЕНИЯ В СУТЬ БИОЛОГИИ СТАРЕНИЯ

По опубликованным данным.

**Авторы: доктор Матиас Шоен,
доктор Кристиан Кукат**

*Институт биологии старения
Общества Макса Планка, г. Кельн, Германия*

**Подготовила С.В. Немова
ООО "ИНТЕРО"**

Процесс старения организма развивается у разных людей по-разному. Каждый человек стареет на свой лад. Какого-то специального гена или гормона, ответственного за старение организма, не существует. А жаль. В противном случае можно было бы просто его заблокировать и оставаться вечно молодым.

Ученые, изучающие процесс старения, шаг за шагом пытаются выяснить: почему мы, собственно, стареем; какие процессы играют тут главную роль и можно ли на них повлиять — к примеру, сделать так, чтобы в почтенном возрасте человек не испытывал физического недомогания? Но научное учреждение, непосредственно занимающееся изучением биологических основ старения, создано только в 2008 году. Это Институт биологии старения Общества имени Макса Планка в Кельне.

Если в 2008 году штат Института биологии старения Общества имени Макса Планка насчитывал всего пять сотрудников, то уже три года спустя он увеличился до 120 специалистов из 20 стран. Деятельность Института биологии старения Общества имени Макса Планка сосредоточена на фундаментальных исследованиях — три отдела ведут работу по исследованию молекулярных, физиологических и эволюционных механизмов старения клеток, тканей и организмов. Их координацию осуществляют трое ученых-геронтологов, которые одновременно выполняют функцию директоров института. Это исследователь биологической эволюции из Великобритании Линда Патридж, биолог из США

Адам Антеби, а также врач и генетик из Швеции Нильс-Гёран Ларсон.

Группа Линды Патридж занимается поиском генов, влияющих на процесс старения организма, а также проводит исследования в области эволюционной биологии старения. Ученые, работающие под руководством Адама Антеби, пытаются выяснить, что именно определяет продолжительность жизни человека, как функционирует гормональная система организма и какие гормональные сигналы влияют на процесс старения.

Группа Нильса-Гёрана Ларсона исследует митохондрии, обеспечивающие клеточное дыхание и являющиеся своего рода “аккумуляторами” клеток. Нарушение их функций может привести к возникновению таких заболеваний, как болезнь Паркинсона, сахарный диабет, либо обернуться сердечным приступом. Доктор Кристиан Кукат из отдела профессора Нильса-Гёрана Ларсона исследует роль, которую играют митохондрии в процессах старения. В тесном сотрудничестве с доктором Кристианом Вормом из исследовательской группы профессора Стефана Якобса из

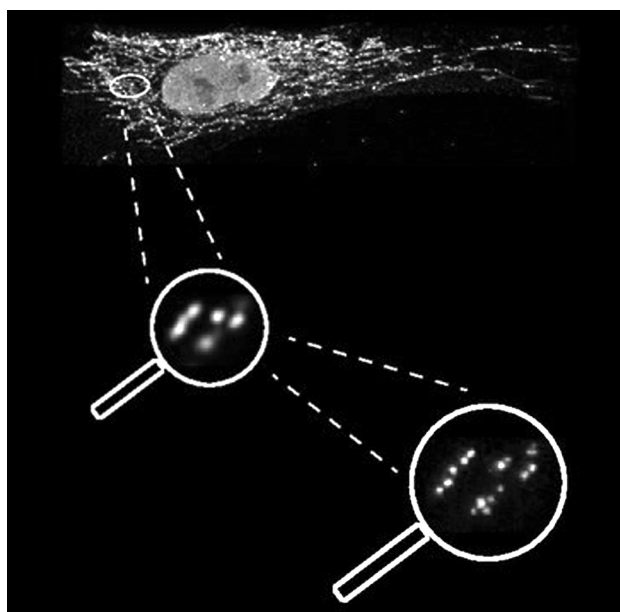


Рис. 1. Взгляд в наномир ДНК клетки: Микроскоп с системой STED (сверх высокого разрешения) дает возможность более детально наблюдать организационную структуру митохондриальной ДНК. На изображении: митохондрия окрашена красным, ядро клетки синим, а митохондриальная ДНК зеленым.

Фото: Института биофизической химии Общества имени Макса Планка, Ноттинген и Института биологии старения Общества имени Макса Планка, Кельн / Кристиан Ворм, Корина Швайрзи

Института биофизической химии в Ноттингеме и исследователями из Университета в Гуттенберге они использовали в работе микроскоп высокого разрешения STED и обнаружили новые поразительные факты о митохондриальных нуклеоидах. Эти факты важны для понимания генетики митохондрий. Вопреки прежним убеждениям упаковка и организация митохондриальных ДНК определенно содержит в себе не несколько, а часто только одну молекулу ДНК.

Не все гены находятся в ядре

Эволюционные предшественники современных митохондрий прекратили свое независимое существование как бактерии 2 миллиарда лет назад, для того чтобы жить в симбиозе внутри другой клетки (эндосимбиоз). У клетки есть только одно решение для извлечения, преобразования и хранения энергии: митохондрия. Только митохондрия может преобразовать различные виды энергии в АТФ (аденозинтрифосфат) энергию, используемую клеткой. Митохондрии используют 80% кислорода, который мы вдыхаем, чтобы преобразовывать потенциальную энергию в энергию, используемую клеткой. В процессе окисления освобождается большое количество энергии, которая сохраняется митохондриями в виде молекул АТФ. Симбиоз виден также в том, что гены почти всех 750–1000 различных митохондриальных белков локализованы в ядре. Белки, кодируемые этими генами, продуцируются в цитозоли клетки, а затем импортируются в митохондрию.

Однако, несколько субъединиц белкового аппарата дыхательной цепи, в которой последним шагом является создание АТФ, являются прямо продуцируемыми митохондриями. Гены для этих 13 белков и для молекулы тРНК, необходимые для генетического копирования (и также для двух других молекул РНК) расположены внутри митохондрии на кольцевой молекуле ДНК (митохондриальной ДНК, мтДНК).

В отличие от ядерных ДНК, которые присутствуют в каждой клетке ровно дважды (от отца и от матери), в каждой клетке присутствует от 1000 до 2000 молекул мтДНК. Что случится, когда некоторые из молекул мтДНК мутируют, как молекулы мтДНК распространились в дочерние клетки после клеточного деления и ответы на другие захватывающие вопросы рассматриваются такими учеными как Кристиан Кукат и другими группами исследователей по всему миру.

Митохондриальная ДНК — на многие вопросы предстоит еще ответить

В отличие от генных мутаций в ядре, которые могут случиться однажды из-за двойного набора хромосом (гетерозиготность или гомозиготность, соответственно) митохондриальные мутации теоретически могут возникнуть в любом процентном соотношении — от 0 до 100% из-за тысяч или более копий мтДНК в клетке. Этот феномен называется гетероплазмия. Многие болезни, вызванные мутациями митохондриальной ДНК, проявляют себя только, когда пропорция мутированных молекул мтДНК в клетке превышает определенный порог от 30% до 80% в зависимости от болезни. Как правило, не все клетки специфических тканей поражены, но матрица клеток развивается, включая в себя клетки с функционирующими дыхательными цепями и клетки, где дыхательные цепи искажены. Точно неизвестно как можно регулировать пропорцию различных версий мтДНК и как эта пропорция меняется со временем жизни организма. Сейчас принято думать, что мутации мтДНК возрастают со временем и это способствует процессу старения.

В отличие от ядерной ДНК, которая содержит подавляющее большинство генов и в процессе полового размножения подвергается рекомбинации, так что потомки получают половину генов от отца, а вторую половину от матери, митохондрии и их ДНК ребенок получает только из материнской яйцеклетки — митохондрии сперматозоида обычно разрушаются после оплодотворения. По крайней мере также кажется, что только малая часть молекул мтДНК материнских половых клеток передается, когда ооцит развивается. Это так называемый эффект “узкого горла” важный и еще не решенный феномен генетики митохондрий. Это может служить для устранения неправильных копий мтДНК, таким образом, например, ооциты с слишком большой пропорцией молекул неблагоприятных мтДНК не выживают.

Митохондрия — не “бобовидный” объект, динамическая сеть

Благодаря изображениям срезов митохондрий под электронным микроскопом, а также из-за знаний об их бактериальных предках, митохондрия изображалась как бактерия или объект бобовидной формы. К сожалению, это представление все еще часто можно найти в

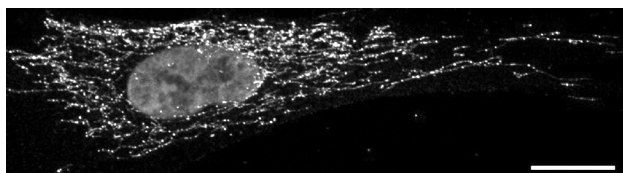


Рис. 2. Митохондриальная сеть. Митохондриальные ДНК (зеленый, анти-ДНК антитела) локализованы в тубулярной митохондрии (красный, анти-ТОМ-20) фибробластов человека. Ядро окрашено синим (синий с DAPI). Шкала соответствует 20 мкм [1, 2]

текстах современных биологических изданий. Первые изображения специфически окрашенных митохондрий в живых клетках окончательно доказывают, что для большинства видов клеток это представление не правильно. В зависимости от вида клетки и ткани, митохондрия чаще выглядит в виде тубулярной “митохондриальной сети”, разветвленной системы внутри клетки, которая постоянно меняется от деления к делению.

TFAM упаковка митохондриальных ДНК

На протяжении нескольких лет было известно, что молекулы мтДНК в митохондриальной сети распределены не случайно, а организованы в структуры, называемые “митохондриальные нуклеоиды”, аналогично ситуации с бактериями. Важным компонентом нуклеоидов является белок TFAM (mitochondrial transcription factor A, митохондриальный копирующий фактор А), который и был предметом исследования группы профессора Нильса-Гёрана Ларсона много лет. Эта работа способствовала сегодняшним знаниям о том, что TFAM выполняет ту же задачу в нуклеоиде, что и белки гистона в ядре, соединяющиеся с ядерной ДНК для формирования нуклеосомы: фактически полная длина мтДНК покрыта молекулами TFAM, мтДНК искривлена



Рис. 3. Доктор Кристиан Кукат за конфокальным микроскопом (Leica TCS SP5 X) в Институте биологии старения Общества имени Макса Планка, Кельн

в форме U и так “упакована” в более компактном пространстве, связываемая TFAM. В дальнейшем TFAM также играет роль, как следует из его названия, копирующего фактора, то есть он гарантирует, что мтДНК может читаться. Организация мтДНК в U-виде благодаря связыванию белком TFAM также очень важна.

Но, как точно структурированы нуклеоиды? Есть ли другие компоненты кроме TFAM и мтДНК? Новые результаты работы Кристиана Куката, Кристиана Ворма и их коллег должны внести ключевой вклад для ответов на эти вопросы.

STED воспроизводит действительные размеры митохондриальных нуклеоидов

До настоящего момента размер митохондриальных нуклеоидов измеряемый с помощью конфокального микроскопа был известен в пределах 200–300 нм. Этот размер лежал в рамках физического разрешения оптического микроскопа примерно в 260 нм. Следовательно, этот метод и традиционная световая микроскопия вообще не подходит для получения более детальной информации о структуре и точных размерах нуклеоидов.

Благодаря развитию нового метода микроскопии высокого разрешения в последнее десятилетие стало возможным преодолеть барьер ограничения физических пределов разрешающей способности. Например, используя микроскопы оснащенные технологией STED (STED: stimulated emission depletion — стимуляция подавления области возбуждения) достижима разрешающая способность менее 50 нм. В отделе создателя STED микроскопии профессора Стефана Хелла в Институте биофизической химии Общества имени Макса Планка в Ноттингеме разрешающая способность в 20 нм и ниже была достигнута с экспериментальными настройками. Когда Кукат, Ворм и их коллеги рассмотрели нуклеоиды при помощи STED микроскопа такого же типа, как и в Ноттингеме, они обнаружили, что нуклеоиды, отмеченные только анти-ДНК антителами имели средний диаметр 100 нм в изображениях STED. В конфокальном микроскопе нуклеоиды имели видимый диаметр в 300 нм. Вновь обнаруженный размер, несомненно, подтверждался всеми STED изображениями для всех клеток и клеточных линий, исследованных от различных типов тканей животных, в то время как размер нуклеоидов, определяемый на пределе разрешающей способности в изображениях конфокальной

микроскопии, был значительно больше. Кроме того, многие структуры, выглядящие как один нуклеоид при просмотре с помощью традиционной конфокальной микроскопии, представляют собой два или три и даже более отдельных нуклеоидов в STED микроскопии. Таким образом, клетка содержит больше нуклеоидов, чем предполагалось ранее.

Исследователи также проводили молекулярно-биологические методы для определения числа молекул мтДНК в клетке культивированного первичного фибробласта человека и коррелировали их с вновь определенным большим числом нуклеоидов. Вместо ранее опубликованных от 2 до 10 молекул мтДНК за нуклеоид, сейчас было 1.45 молекул мтДНК за нуклеоид. Заключение, что следует из этих результатов, полностью новое: большинство нуклеоидов содержит одну единственную молекулу мтДНК.

Анализ молекул TFAM на клетку культивированного первичного фибробласта человека выявил около 1500 молекул за нуклеоид или 1000 на молекулу мтДНК. Эти цифры близко согласуются с группой прежде сделанных измерений тканей мыши. Трехмерная структура молекул TFAM ограничивающая мтДНК была затем спроектирована при помощи техники моделирования и подсчитан общий объем этих структур, без использования рентгеноструктурных данных. Данный диаметр нуклеоида 100 нм, нуклеоид может содержать примерно 5000 мтДНК связанных молекулами TFAM. Следовательно, 1500 измеренных молекул составляют объем нуклеоида.

Новая цель в исследовании генетики митохондрий

Эти открытия имеют прямое значение для общей концепции нуклеоидов, которая до сегодняшнего дня имела “несколько философскую ауру”, как говорит Кукат. Неспособные заглянуть в нуклеоид, исследователи думали, что он содержит большое разнообразие белков для упорядочивания, транскрипции и репликации генов. Они несомненно присутствуют в нуклеоиде, но не являются главным компонентом. Сейчас точно известно, что нуклеоид — это упаковочная и организационная единица мтДНК, и что наималейшей наследуемой единицей мтДНК определенно является одна молекула мтДНК, а не количество от 2 до 10. И вновь определенный размер в 100 нм и менее указывает на то, что мтДНК и TFAM являются главными

компонентами. Возможно, типичный нуклеоид действительно состоит только из одной молекулы мтДНК, покрытой TFAM — другие необходимые белки будут дополняться по мере необходимости, как выше упомянутые белки для транскрипции, трансляции или репликации.

Результаты в определении размера наималейшей наследуемой единицы при передаче наследственных болезней значительны в процессах старения, а изменяется ли число и размер нуклеоидов в случае болезни и старения — это все требует дальнейшего исследования. Новая цель будет определена и достигнута. “Возможности микроскопии сверхвысокого разрешения позволяют получить более детальное изображение клеточных структур”, говорит Кукат. “STED микроскоп позволил нам полностью по новому проникнуть в митохондрии, и это действительно вызвало множество новых вопросов и идей для новых экспериментов.”

ЛИТЕРАТУРА

1. Kukat C., Wurm C.A., Spähr H., Falkenberg M., Larsson N.G., Jakobs S. *Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2011. — Vol. 108, № 33. — P. 13534–13539. Epub 2011 Aug 1. (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1109263108)*
2. <http://futurenow.dw.de>

ТЕХНОЛОГІЯ STED — МОЖЛИВІСТЬ ПРОНИКНЕННЯ В СУТЬ БІОЛОГІЇ СТАРІННЯ

С.В.Немова

Дослідники з Інституту біології старіння Товариства імені Макса Планка виявили нові важливі для розуміння генетики мітохондрій факти. Технологія мікроскопії, що дозволяє подолати бар'єр обмежень фізичної межі розподільчої здатності дозволила дослідникам визначити, що наймалішою одиницею мітохондріальної ДНК, що унаслідкується, однозначно є одна молекула мтДНК, а не приблизна кількість від 2 до 10, як було опубліковано раніше. Новий погляд у будову клітинних структур спричинив безліч питань та ідей для нових експериментів.

SUPER-RESOLUTION TECHNOLOGY OF MICROSCOPY OFFERS SURPRISING INSIGHTS IN BIOLOGY OF AGEING RESEARCH

S.V. Nemova

Max Planck Institute for Biology of Ageing researches were founded new important facts for understanding of mitochondrial genetics. Technology of microscopy, which allows overcoming of the limitation barrier of the physical resolution limit to detect that the smallest inheritable unit of the mtDNA, is therefore precisely one mtDNA molecule, not a number from 2 to 10, as previously published. New insight into cell structure naturally raises a whole lot of new questions and ideas for new experiments.