

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ПРОБЛЕМАМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ФИЗИОЛОГИЧЕСКИМ НАУКАМ

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

РЕЦЕПЦИЯ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

6-9 июня 2005 г.

МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ

Пушино 2005

ЛИТЕРАТУРА

1. Cuello F., Schulze R.A., Heemeyer F., Meyer H.E., Lutz S., Jakobs K.H., Niroomand F., Wieland T. // 2003, J. Biol. Chem. 278(9), 7220-7226;
2. Hippe H.J., Lutz S., Cuello F., Knorr K., Vogt A., Jakobs K.H., Wieland T., Niroomand F. // 2003, J. Biol. Chem. 278(9), 7227-7233;
3. Kaziro Y. // 1978, Biochim. Biophys. Acta, 505, 95-127;
4. Kimura N. // 1993, Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 108/II (Dickey, B.F., and Birnbaumer, L., eds) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 485-498;
5. Kimura N., Shimada N., Fukuda M., Ishijima Y., Miyazaki H., Ishii A., Takagi Y., Ishikawa N. // 2000, J. Bioenerg. Biomembr. 32, 309-315;
6. Orlov N.Ya., Kimura N. // 1998, Biochemistry (Moscow) 63, 171-179;
7. Orlov N.Ya., Orlova T.G., Nomura K., Hanai N., Kimura N. // 1996, FEBS Lett., 389, 186-190;
8. Otero A.S. // 1990, Biochem. Pharmacol. 39, 1399-1404;
9. Pugh E.N., Jr., Lamb T.D. // 1993, Biochim. Biophys. Acta 1141, 111-149;
10. Stryer L. // 1983, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 48, 841-852;
11. Zhu J., Tseng Yu-H., Kantor J. D., Rhodes C. J., Zetter B. R., Moyers J. S., Kahn C.R. // 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(26), 14991-14918.

ТРЕХМЕРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА И МИТОХОНДРИЙ В ГИППОКАМПАЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ И ВКУСОВЫХ РЕЦЕПТОРНЫХ КЛЕТКАХ СУСЛИКА И КРЫСЫ

Попов В.И., *Моренков Э.Д., Демин И.П., Клименко О.А., Краев И.В.,
Патрушев И.В., Розачевский В.В.

Институт биофизики клетки РАН, Пушкино,
*Биологический факультет МГУ, Москва

Представлены результаты ультраструктурного анализа организации цистерн эндоплазматического ретикулума и митохондрий в аксонах и дендритах нейронов в гиппокампе (поля CA1 и CA3, зубчатая фасция) сусликов (нормотермия и гибернация) и крыс (аудиогенные судороги; пространственное обучение в водном лабиринте; стресс-обездвиживание) с использованием трехмерных реконструкций на больших сериях ультратонких срезов.

В работе были использованы гиппокампы взрослых животных после перфузии тканей раствором 3% параформальдегида и 0.5% глутарового альдегида, приготовленном на 0.1M Na-какодилатном буфере (pH 7.2-7.4). После перфузии гиппокампы были выделены и порезаны перпендикулярно к их продольной оси на срезы толщиной 500-1000 μm . Срезы фиксировали в 2.5% глутаровом альдегиде с постфиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия (в каждом 2-4 ч) при комнатной температуре. Оба фиксатора были приготовлены на том же какодилатном буфере. Срезы заключали в смесь эпоксидных смол (эпон-аралдит) и полимеризовали при 60°. Используя левый край стеклянного ножа как фрезу, готовили призмы высотой 50-60 мкм, имеющие в сечении прямоугольник. Серийные срезы (60-70 нм) в виде лент (80-150 срезов на серию) вылавливались на бленды, покрытые тонкой пленкой пиолоформа. Срезы окрашивали в растворах уранилацетата и цитрата свинца. Электронно-микроскопические изображения были сканированы с разрешением 1200 dpi и введены в IBM компьютер. Выстраивание срезов проводили с помощью программы "SEM Align". С использованием программы "IGL Trace" контуры каждой исследуемой структуры обрисовались вручную, а на основании этих контуров генерировались трехмерные изображения в файлы wrl/vrml формата. Обе программы, разработанные Dr. John Fiala [4] (<http://www.synapses.bu.edu>), позволяют определять линейные размеры исследуемых структур, а также их объемы и площади их поверхностей.

Показано, что во всех типах аксонов митохондрии представлены как отдельные органеллы, длина которых не превышает 3 μm . В отличие от аксонов дендриты нейронов содержат гигантские разветвленные митохондрии. На трехмерных изображениях нами показано ветвление митохондрий и последующее слияние митохондриальных ветвей. Принципиально важным результатом является то, что митохондрии образуют тонкие нити около 100 нм в диаметре, а на поперечных срезах такие нити содержат 1-2 кристы. Такой диаметр митохондрий находится за пределами разрешения светового микроскопа. Collins et al. [2-3], используя такие флуоресцентные зонды на митохондрии как DsRed1 и calcein, с помощью конфокальной микроскопии показали, что в культивируемых нейронах максимальная длина митохондрий не превышает 5 мкм. В этой связи возникает вопрос: возможна ли прямая визуализация тонких (около 100 нм в диаметре) и длинных митохондриальных нитей при использовании лазерной сканирующей конфокальной микроскопии и флуоресцентных зондов. Использование метода ультратонких серийных срезов связано с техническими сложностями при размещении последовательных срезов на большом

числе сеток, поэтому обычно число срезов в серии не превышает 100. Так серия, состоящая из 100 тонких срезов (60-70 нм толщиной), позволяет реконструировать митохондрию длиной обычно около 10 μm , когда используются поперечные профили митохондрий. В настоящем докладе мы демонстрируем митохондрии в апикальных дендритах клеток зерен зубчатой фации гиппокампа крыс до 36 μm в длину. Не менее важен вопрос о связи митохондрий с дендритными шипиками, образующими аксо-шипиковые синапсы, которые доминируют в коре и гиппокампе. Так в работе Li et al. [5] на основании данных конфокальной микроскопии утверждается проникновение митохондрий дендритов в дендритные шипики нейронов поля CA1 гиппокампа. Мы никогда не наблюдали такого проникновения для дендритов нейронов поля CA1 и зубчатой фации. Как это было ранее нами показано [7], проникновение митохондрий характерно для колючих шипов пирамидных нейронов поля CA3 гиппокампа. Для шипиков характерно присутствие цистерн эндоплазматического ретикулума (ЭР), который, согласно полученным нами трехмерным реконструкциям, часто сливается с наружной мембраной оболочки митохондрий. Образование гигантских митохондрий в фибробластах и кардиомиоцитах было показано ранее [1]. Образование непрерывного континуума между цистернами ЭР и наружной мембраной митохондрий наиболее вероятно связано с кальциевой регуляцией как в дендритах, так и в телах нейронов. Присутствие в дендритах гигантских митохондрий, или митохондриальных филаментов, позволяет предположить их функционирование в качестве электрических кабелей [6] для аккумуляции и передачи энергии между различными внутриклеточными компартментами, и, возможно, передачи электрических сигналов, приходящих на многочисленные синапсы. В отличие от аксонов, мембрана дендритов считается пассивной, так как локальные токи возникают только в областях активированных синапсов. Однако эта гипотеза требует тщательной проверки.

В настоящем докладе представлены трехмерные реконструкции митохондрий и цистерн ЭР во вкусовых рецепторных клетках всех трех типов вкусовых сосочков суслика как в состоянии нормотермии, так и гибернации. Показано, что в отличие от гибернации в нормотермии митохондрии вкусовых клеток окружают нервные окончания. Функциональное значение этой экспериментальной находки пока не ясно.

Представленные трехмерные реконструкции свидетельствуют о существовании непрерывной связи между цистернами ЭР и наружной мембраной оболочки митохондрий, что представляется крайне важным для функционирования нейронов и вкусовых рецепторных клеток.

Работа поддержана грантами РФФИ: 49635-а и 03-04-48747-а.