Пыльцевая трубка

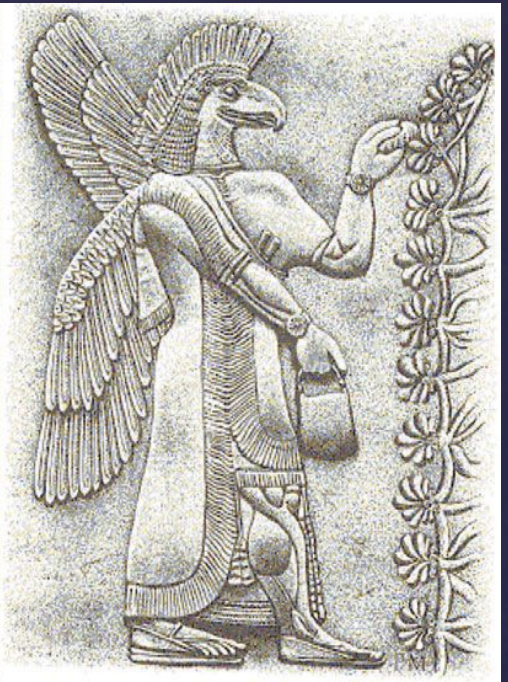
{ Основные механизмы полярного роста

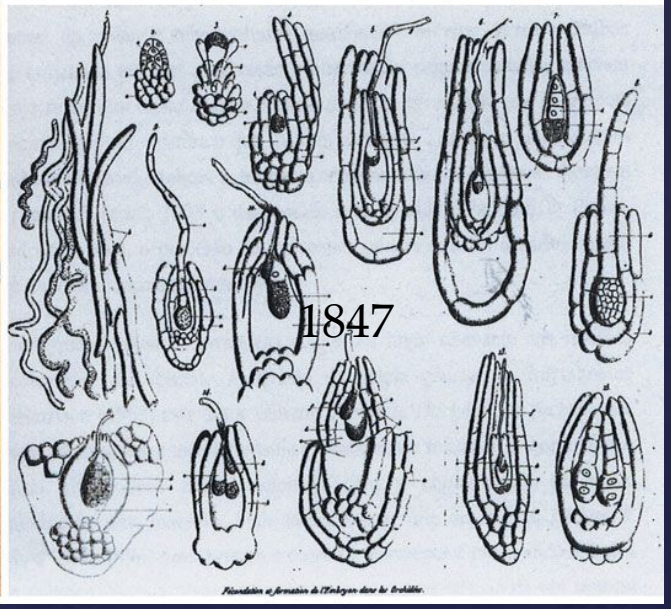
- Скорость роста – до 1 см/час!
- Длина – до десятков сантиметров!
- Безошибочная «адресная» доставка спермиев через ткани пестика
- Хранение без потери способности к прорастанию в течение десятков лет!
- И все эти возможности заключены в зернышке диаметром около 0,03 мм!

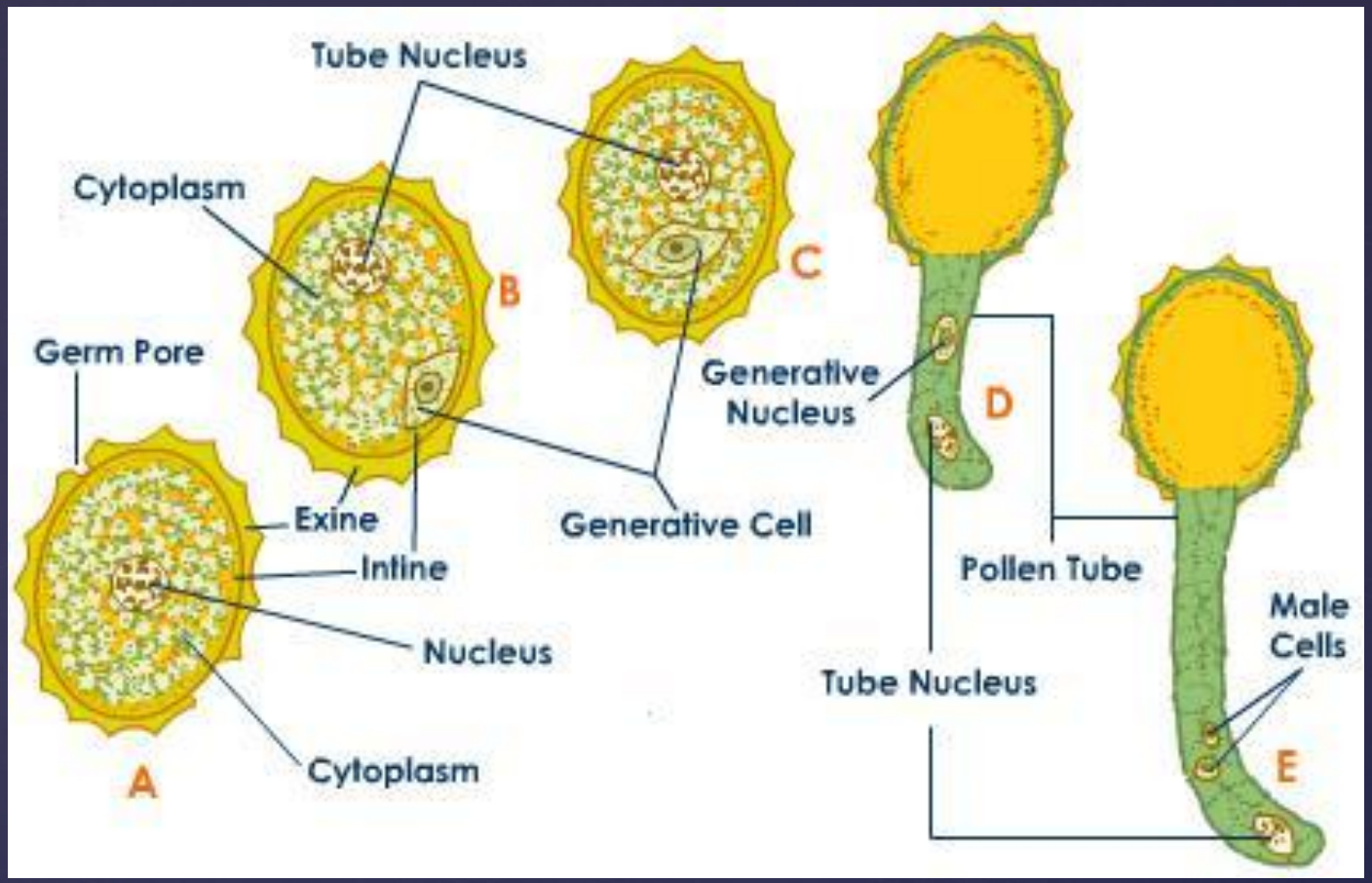
Огромные возможности маленького организма

Пыльца с нами тысячи лет

- Ассирийские священники и египетские боги изображались в процессе ритуального опыления пальмы (5000 лет до н.э.).
- Уже тогда было известно, что для гарантированного получения семян требуется переносить пыльцу на рыльце
- Однако точное установление роли пыльцевой трубки в доставке «мужской компоненты» - только в середине XIX века







Что представляет собой пыльца?

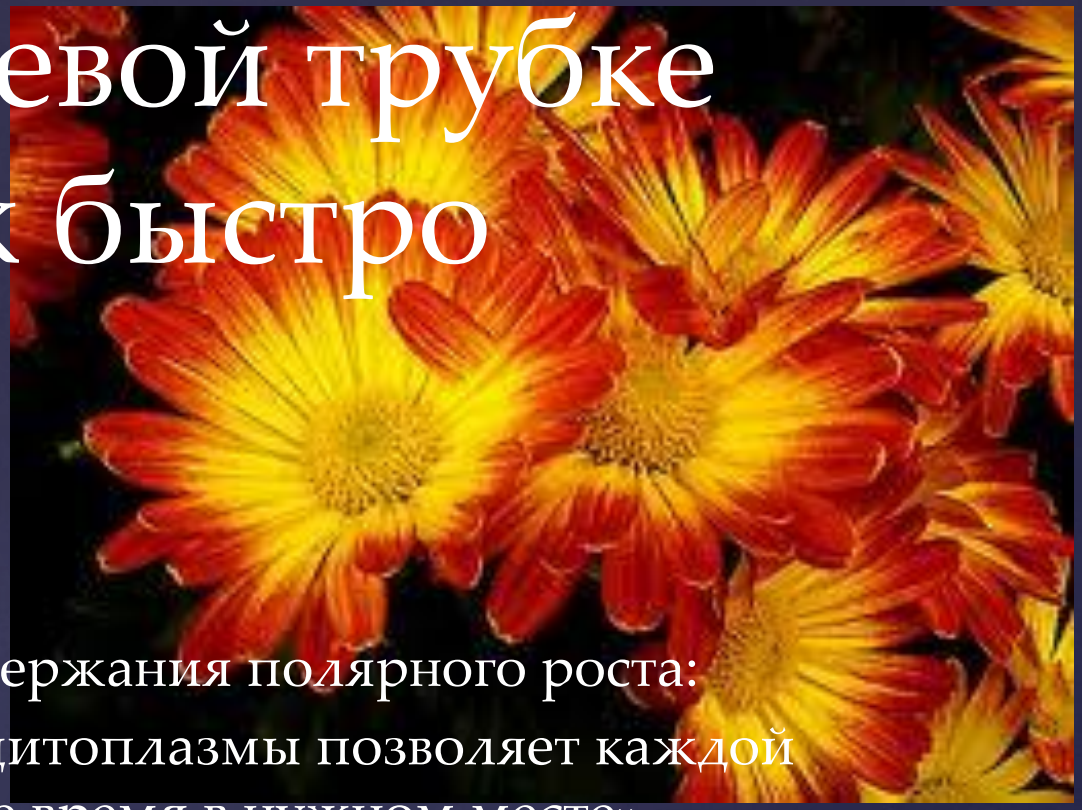
Мужской гаметофит – гаплоидное поколение семенных растений, у цветковых - организм из 2х или 3х клеток

Жизнь пыльцы

Пыльцевая трубка как модельный объект

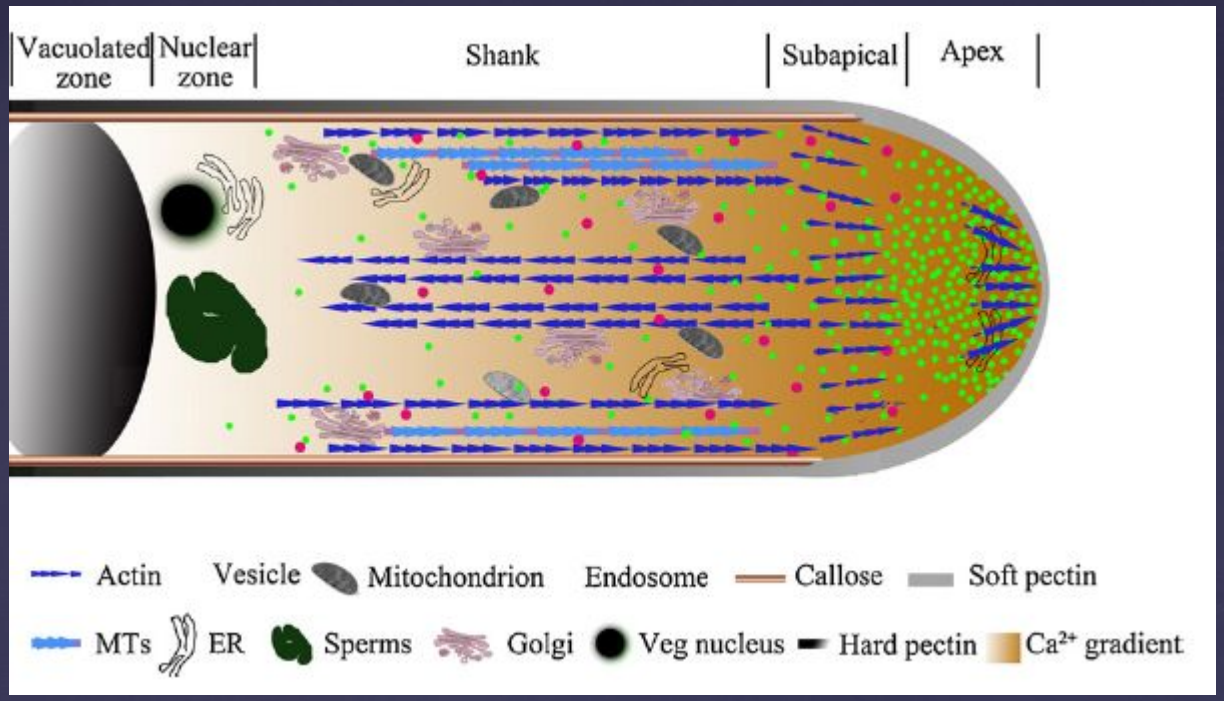
- Гаплоидный геном – легко выявить важные гены
- Отсутствие межклеточных контактов – напрямую реагирует на внешние воздействия
- Малый размер и состояние покоя – удобно хранить и культивировать
- Сходство с другими объектами, характеризующимися полярным типом роста
- Высокая скорость роста (у цветковых)

Как пыльцевой трубке удается так быстро расти?



Ключевые механизмы поддержания полярного роста:

- Зональная организация цитоплазмы позволяет каждой органелле быть «в нужное время в нужном месте»
- Неоднородность в строении клеточной стенки позволяет тургору растягивать клетку направленно
- Каллозные пробки и вакуоли позволяют не наращивать объем цитоплазмы бесконечно
- На молекулярном уровне: сигнальные сети контролируют процесс через цитоскелет и поляризованную секрецию

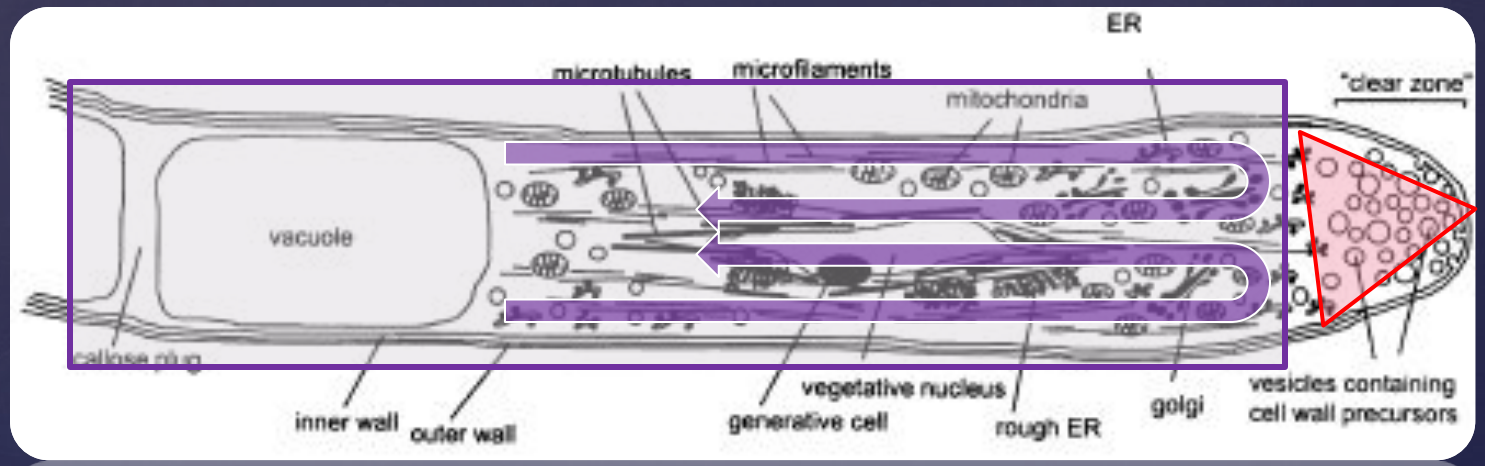


Основные игроки

- Везикулярный транспорт и движение органелл по цитоскелету: доставка стройматериалов и энергообеспечение
- Клеточная стенка – механическая составляющая
- Ионные градиенты и мембранный потенциал
- ГТФазы и другие компоненты сигнальных каскадов (активно изучаются)
- АФК (малоизучено)

Полярность структуры

Апикальный рост пыльцевой трубки поддерживается за счет полярной организации цитоплазмы. Она разделена на функциональные компартменты:

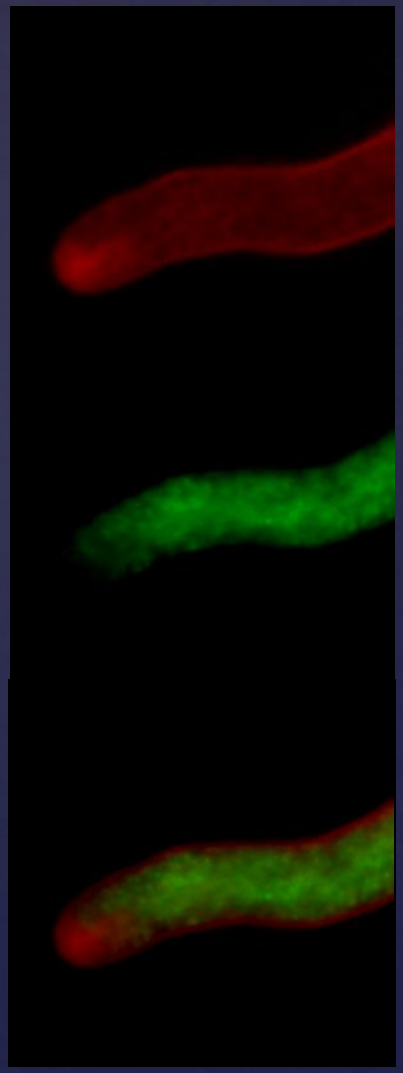


Апикальный (или «растущий») компартмент

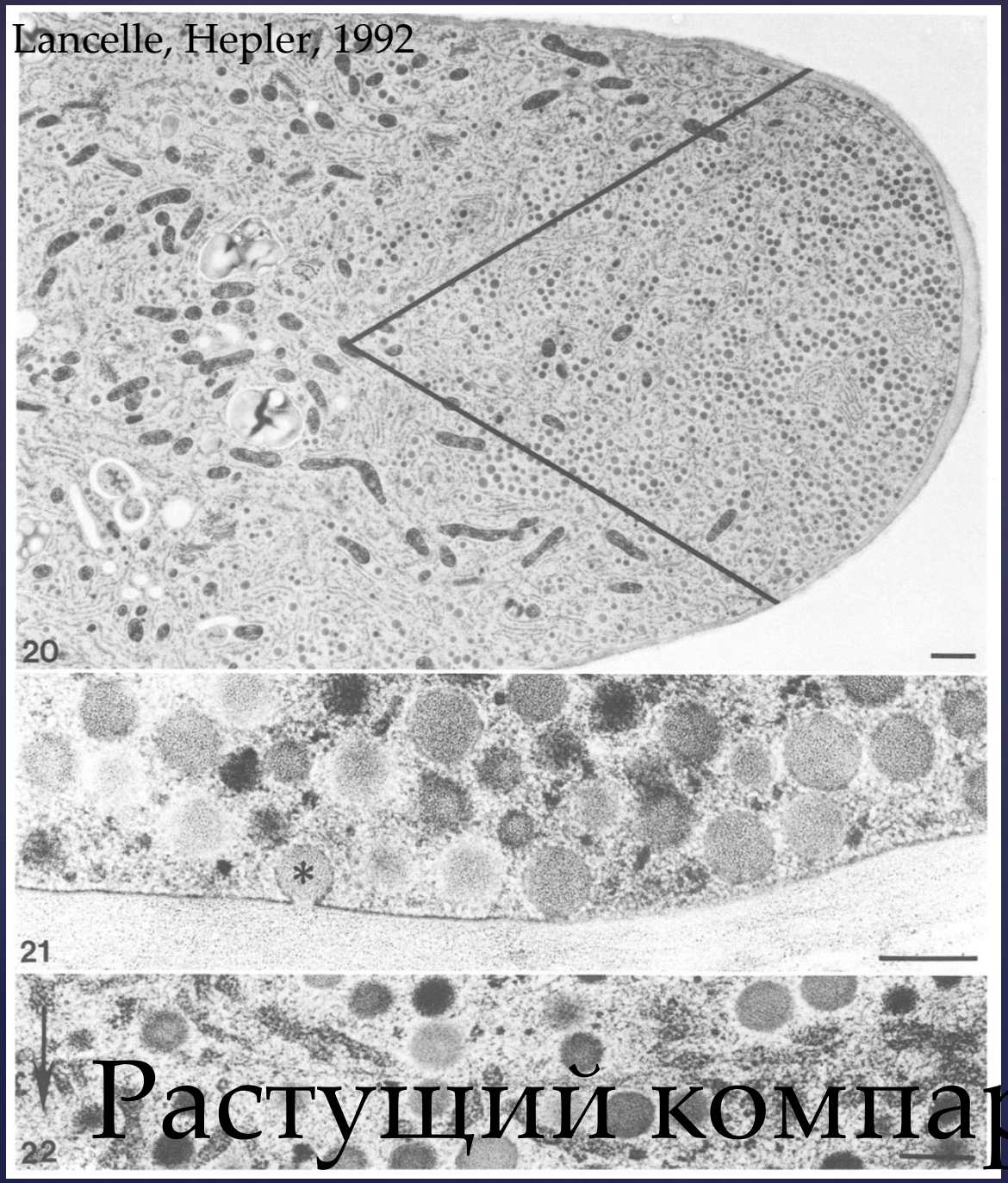
Базальный компартмент

Функции циклоза

1. Транспорт мужского гаметного модуля (MGU).
2. Транспорт в апекс сигнальных молекул и ферментов для взаимодействия с пестиком.
3. Строительные материалы, включая фосфолипиды, полисахариды, стеночные ферменты.
4. В апексе везикулы доставляются в определенные зоны поверхности, где происходит их экзоцитоз.
5. Эндоцитоз обеспечивает приток в трубку из пестика питательных веществ и сигнальных молекул, поддерживает «уникальность апекса» и правильное соотношение между материалами для строительства стенки и плазмалеммы.

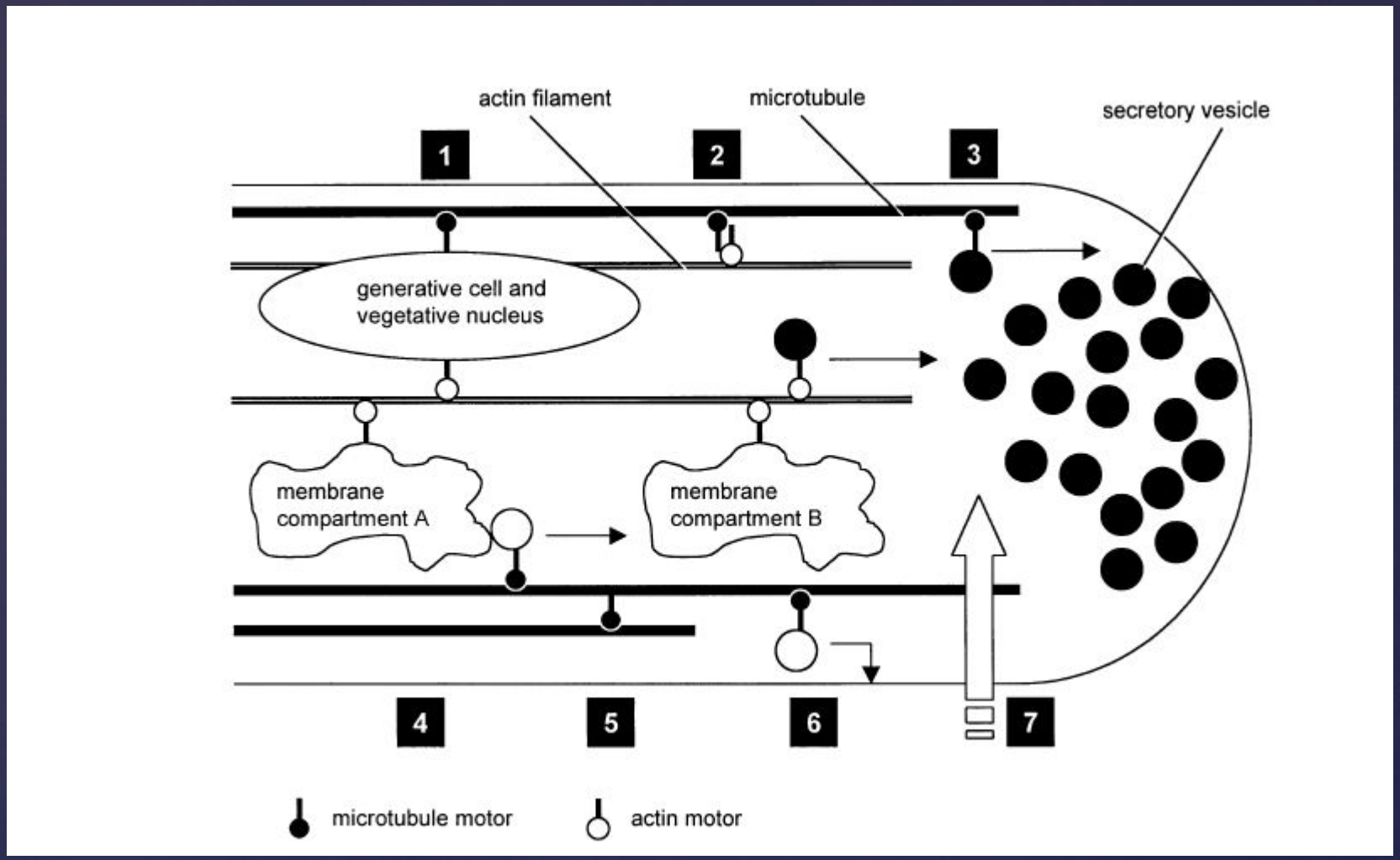


Lancelle, Hepler, 1992



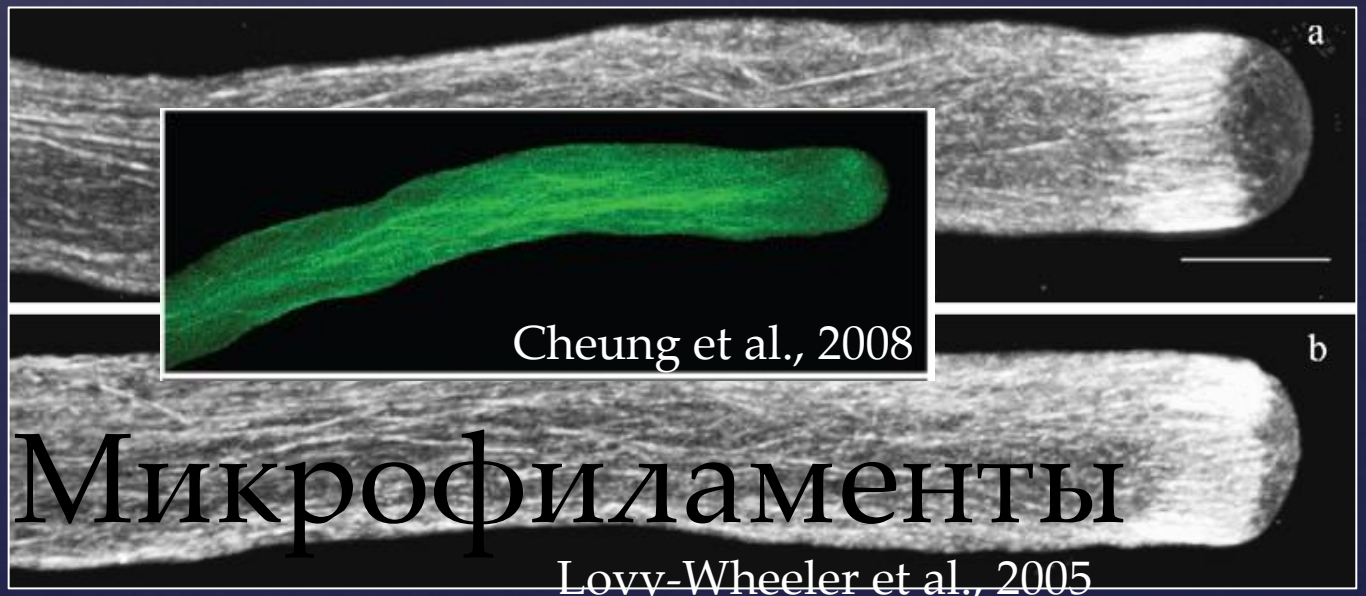
Брейгина и др., 2009

Растущий компартмент


actin filament
microtubule
secretory vesicle
1
2
3
generative cell and
vegetative nucleus
membrane
compartment A
membrane
compartment B
4
5
6
7
microtubule motor
actin motor

Цитоскелет

- Актиновый цитоскелет играет ключевую роль в поддержании полярного роста
- Продольные актиновые тяжи обеспечивают ток цитоплазмы (фонтан)
- Кольцевая структура в субапикальной зоне задает направление роста. Скорее всего, путем регуляции везикулярного транспорта
- Виллин стабилизирует филаменты актина там, где концентрация кальция низкая
- Профилин не дает тяжам сформироваться в апикальной зоне, где концентрация кальция на порядок выше.
- Кофилин и Actin depolymerizing factor (ADF) регулируются pH, их активность определяется pH профилем

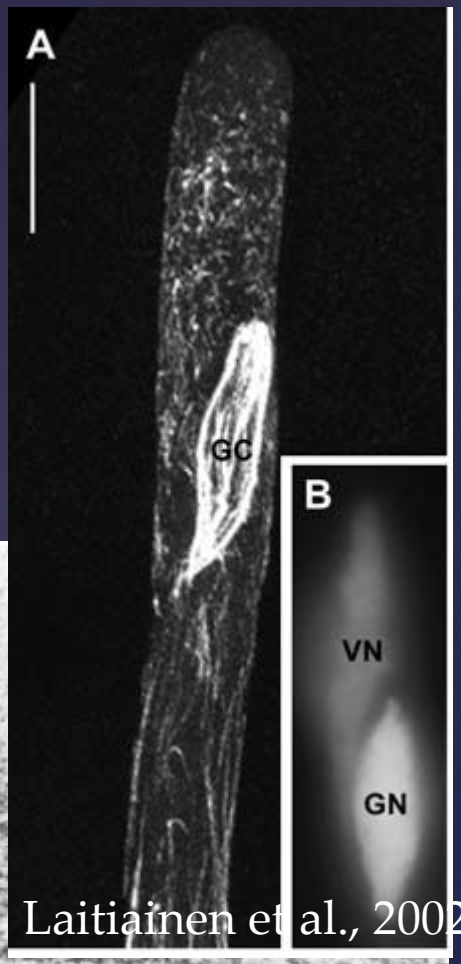


Cheung et al., 2008

Микрофиламенты

Lovy-Wheeler et al., 2005

- Отвечает за транспорт спермиев к зародышевому мешку
- Остальные функции неизвестны
- Ингибиторы не останавливают рост ПТ
- Кинезин идентифицирован
- Часто располагается вместе с МФ, а также образует комплексы с ПМ и ЭПР



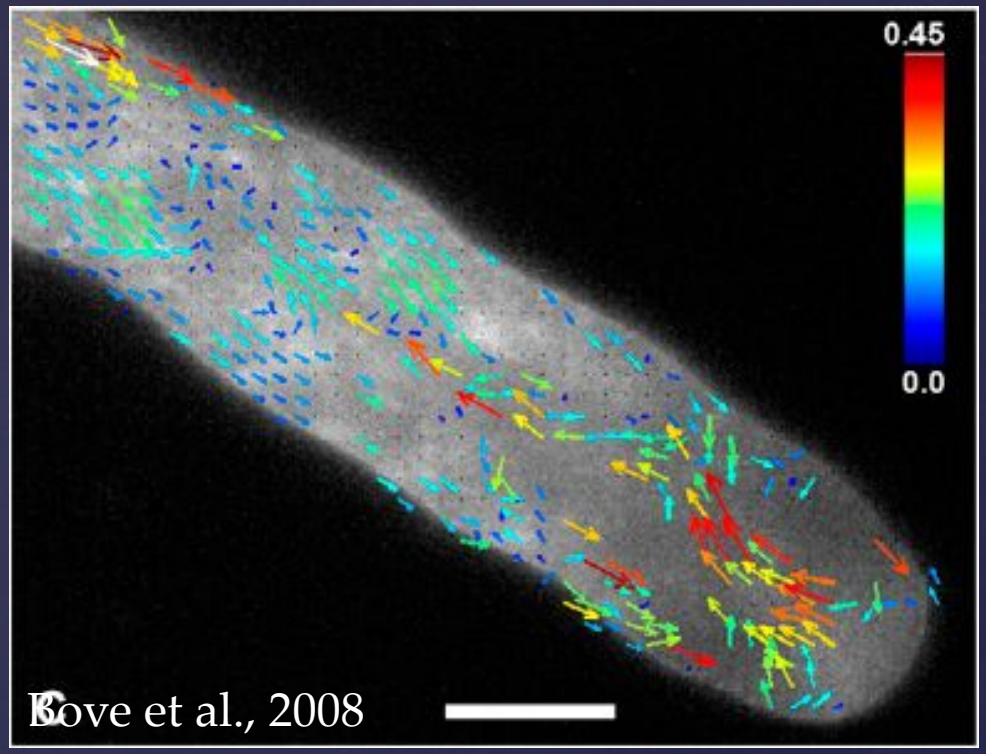
Laitiainen et al., 2002

Lancelle et al., 1987

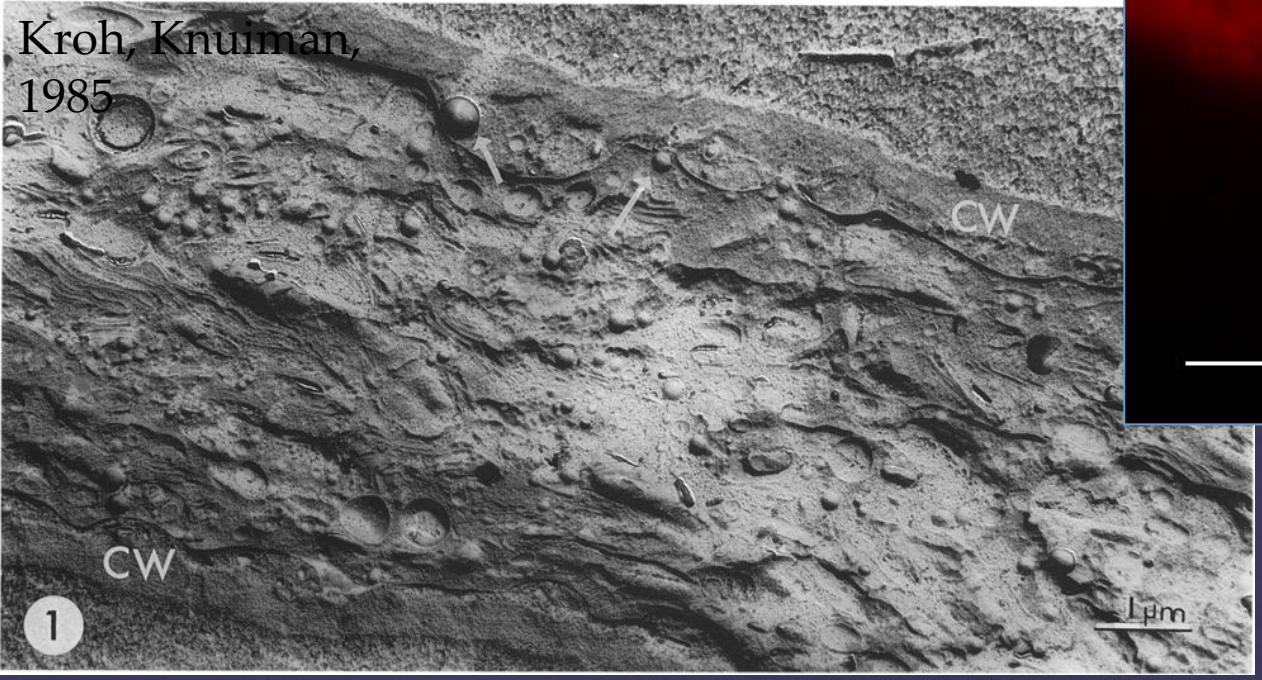
Микротрубочки

Эндоцитоз

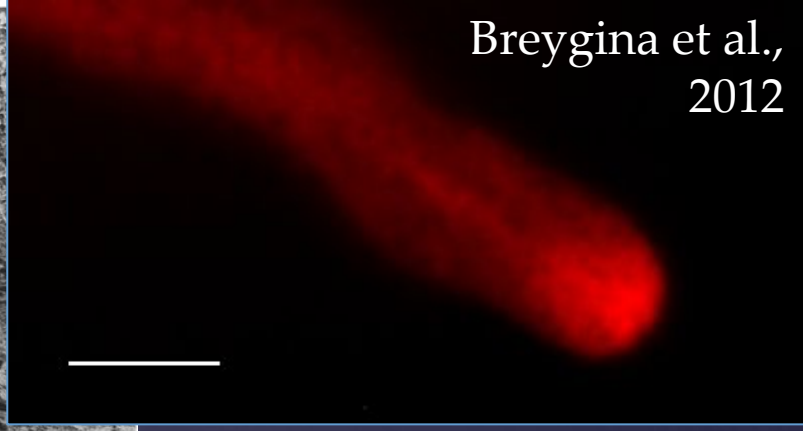
- Рециклирование мембран необходимо для поддержания полярности – «уникальность апекса».
- В пыльцевой трубке образование окаймленных пузырьков с клатриновой шубой происходит в субапикальной области
- Дальнейшее движение везикул происходит по актиновым филаментам «ошейника»
- Контроль за эндоцитозом осуществляет фосфатидил-инозитольная сигнальная система.



Bove et al., 2008



Kroh, Knuiman, 1985

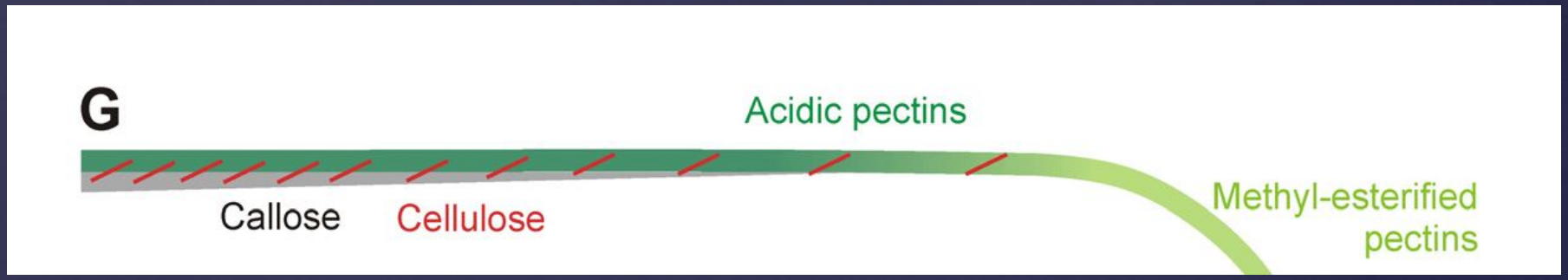


Breygina et al., 2012

Экзоцитоз

- Поляризованная секреция поддерживается благодаря актиновому цитоскелету, а также аннексину и белкам экзоцистного комплекса
- Экзоцисты предсталяют из себя октомерный комплекс из белков, отвечающих за движение пузырька вдоль цитоскелета, а также определяющих место его слияния с ПМ.
- Аннексины отвечают за слияние мембран. Их активность зависит от концентрации кальция
- Большинство ученых считают, что экзоцитоз происходит в самом кончике, однако есть и другая гипотеза.

- Движущей силой для роста является тургорное давление. Однако, оно не является векторной силой. За счет чего же рост становится направленным?
- Механический градиент жесткости
- Какие компоненты ответственны за него?



Chebli, Geitmann, 2007

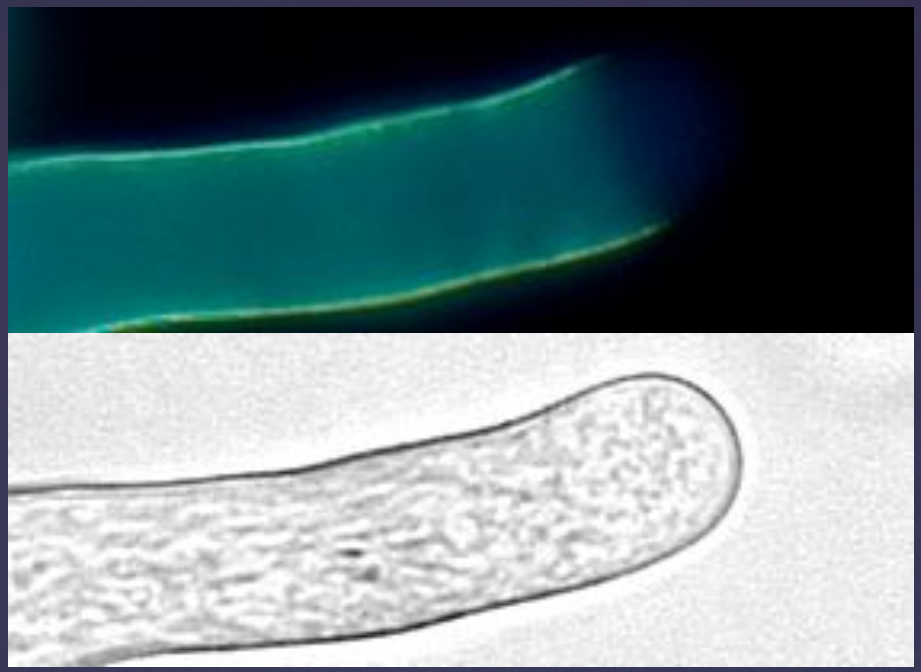
Клеточная стенка: градиент жесткости

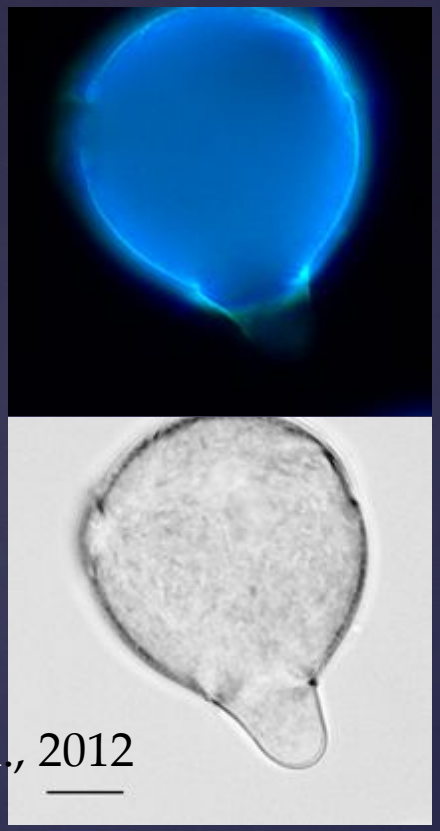
Parre, Geitmann, 2005

- Этерифицированные пектины откладываются в кончике трубки в процессе экзоцитоза
- По мере удаления от кончика они деэтерифицируются при участии фермента пектинметилэстеразы (ПМЕ)
- Кальций участвует в образовании сшивок между молекулами пектинов, увеличивая прочность полимерной сети
- Это обеспечивает градиент жесткости от кончика к ПЗ

Пектины

Li et al., 1994

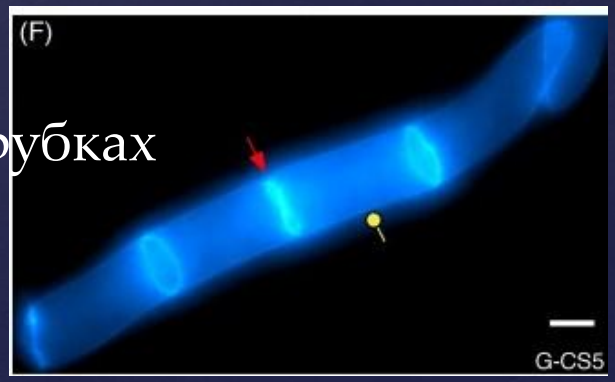




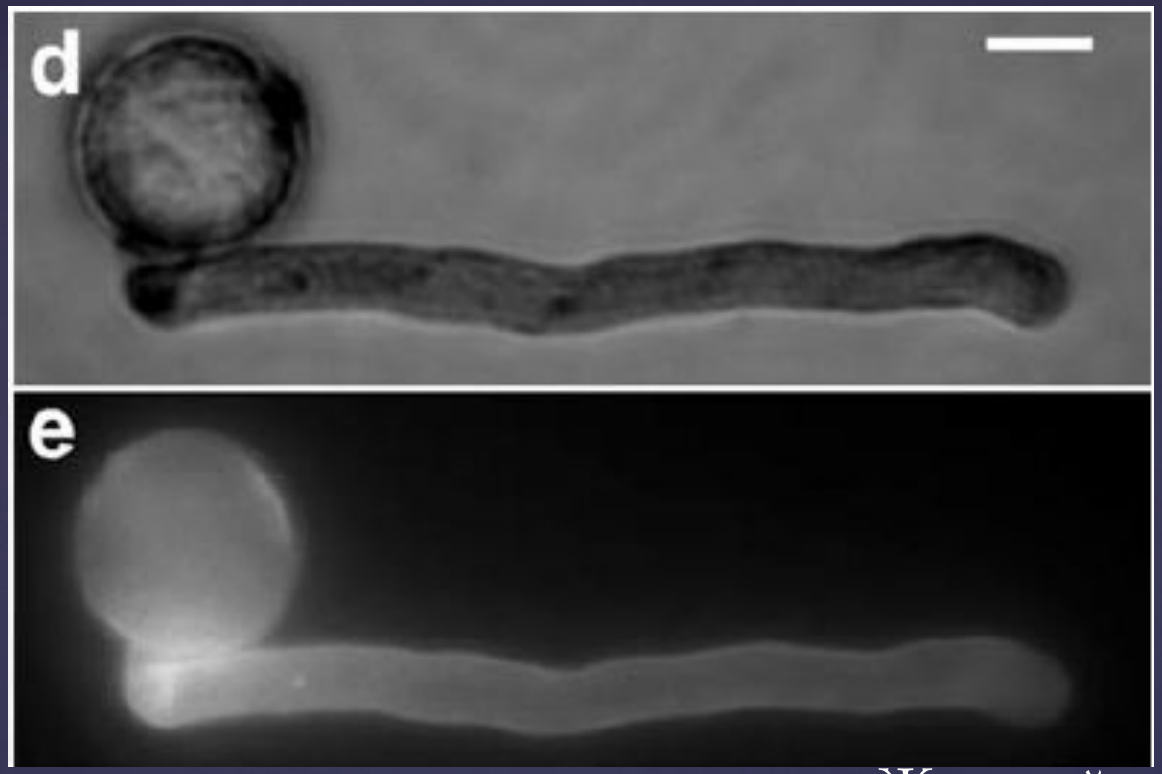
Каллоза

Breygina et al., 2012

Xie et al., 2012



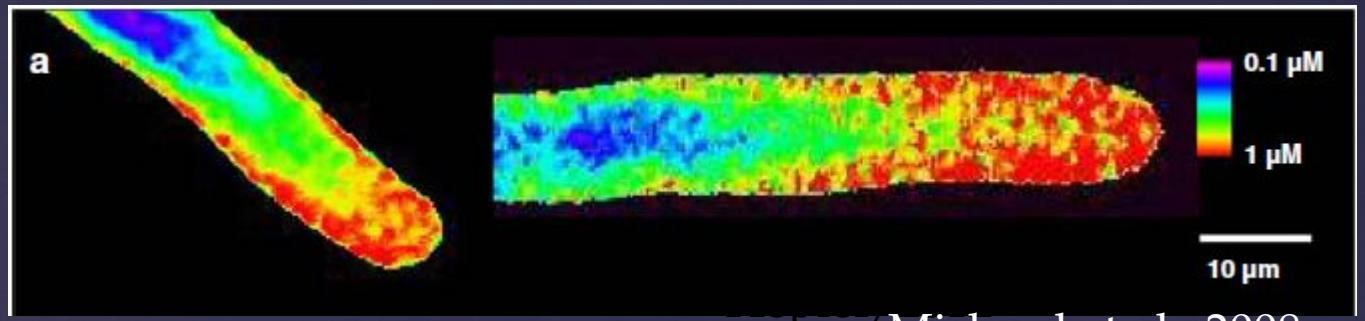
- Отсутствует в кончике
- Появляется на расстоянии 10-30 мкм
- Образует каллозные пробки в длинных трубках
- Откладывается в кончике в ответ на стрессовое воздействие



Parre, Geitmann, 2005

Целлюлоза

- Жесткий компонент, но его не очень много
- Отложение также неравномерное: в кончике отсутствует, далее постепенно накапливается по направлению к ПЗ.
- У голосеменных присутствует в кончике – медленный рост



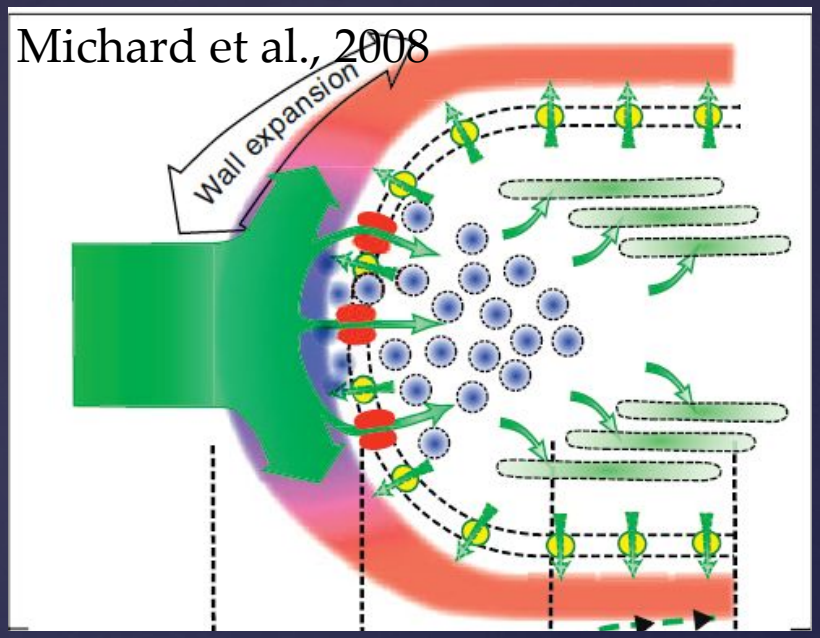
Michard et al., 2008

- Кальций входит в кончике трубки через каналы , а в субапикальной области входит в органеллы и выкачивается через ПМ с помощью помпы.
- Таким образом, поддерживается крутой градиент его концентрации в апикальной зоне
- Кальций – центральный регулятор роста, с нарушением градиента рост прекращается

Регуляторные механизмы: кальций

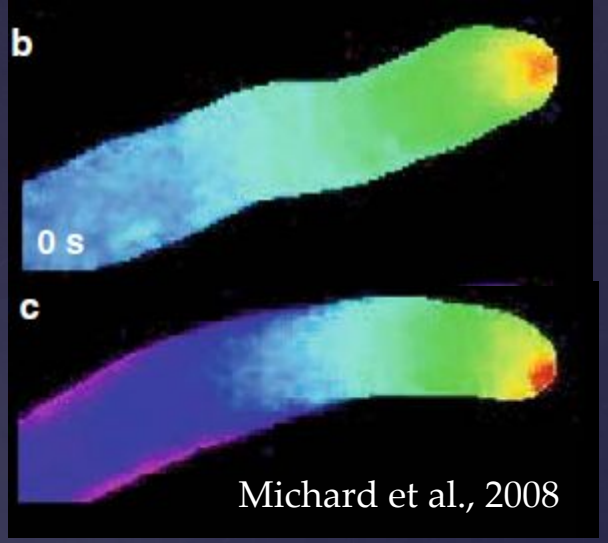
Регуляторные механизмы: кальций

- Кальциевый градиент определяет место слияния везикул с ПМ и, таким образом, задает направление роста
- Кальций регулирует динамику актиновых филаментов через Са-чувствительные актин-связывающие белки (ABPs),
- Кальций модулирует активность Са-зависимых протеин-киназ (CDPKs)

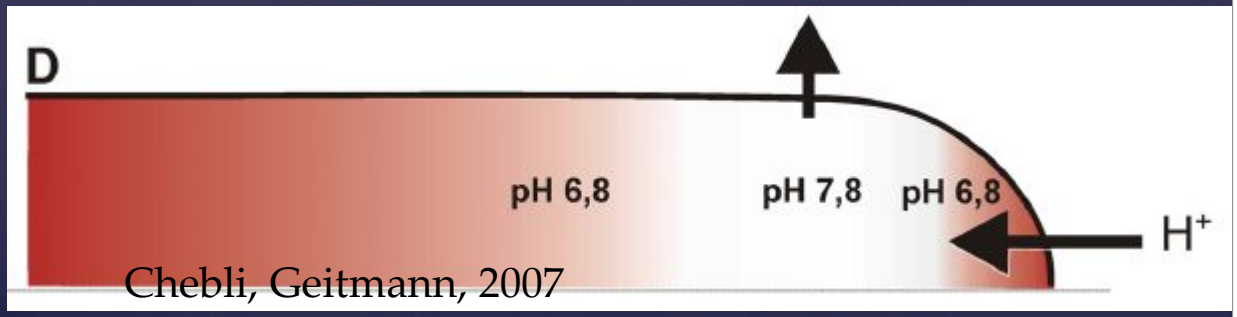


Michard et al., 2008

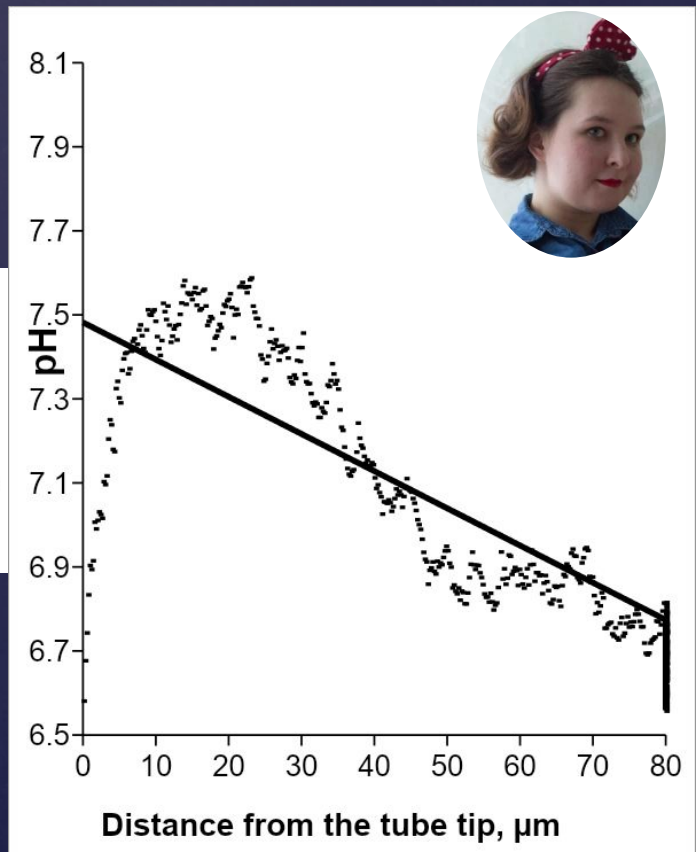
- В кончике pH кислый, протоны входят в цитоплазму, предположительно, через неспецифичные катионные каналы. Кислый кончик присутствует только в растущих трубках.
- В субапикальной зоне обнаружен «щелочной поясок», именно в этой зоне работают H^+-АТФазы, выкачивающие протоны. Присутствует даже в нерастущих трубках.



Michard et al., 2008

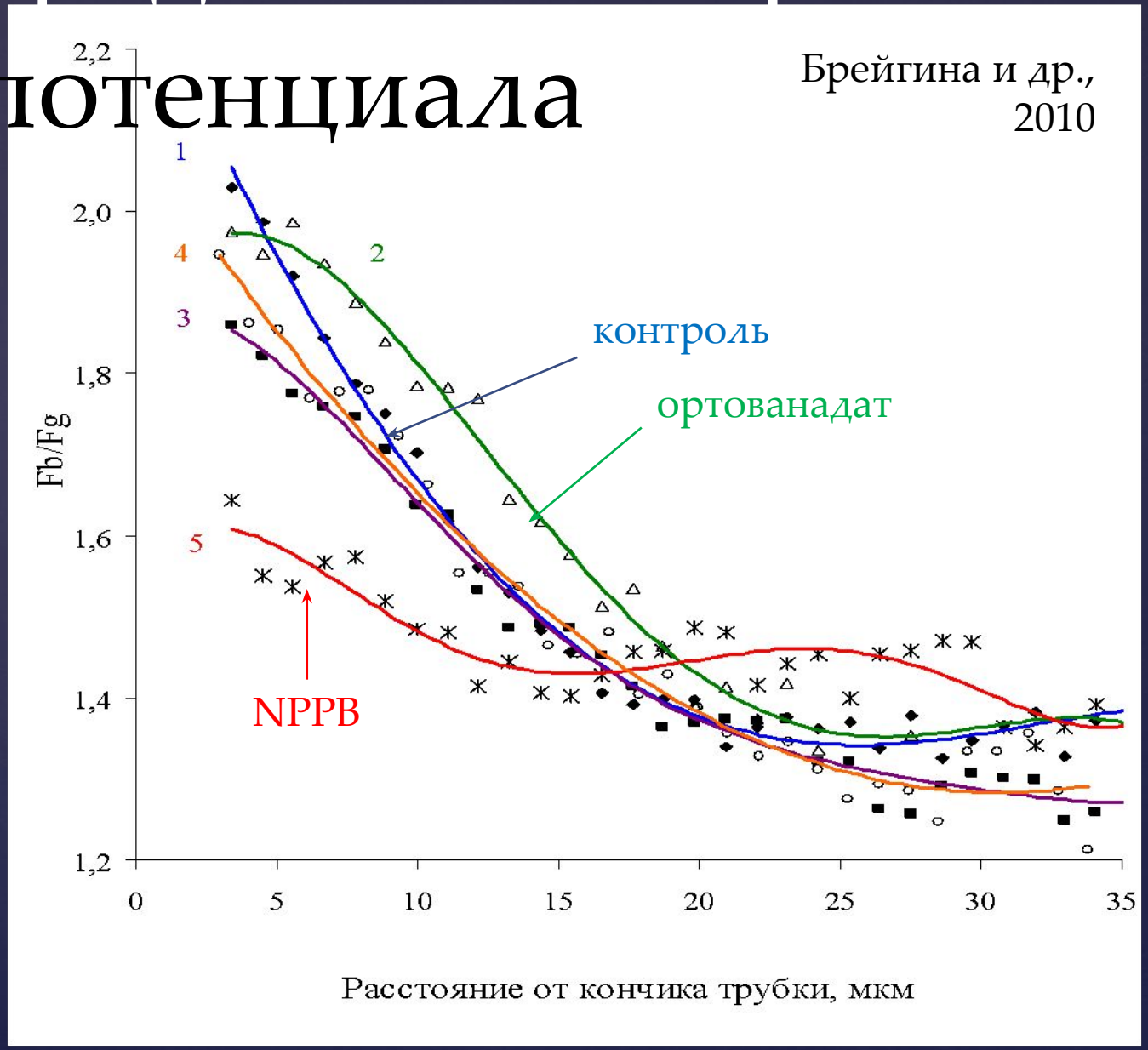


Chebli, Geitmann, 2007

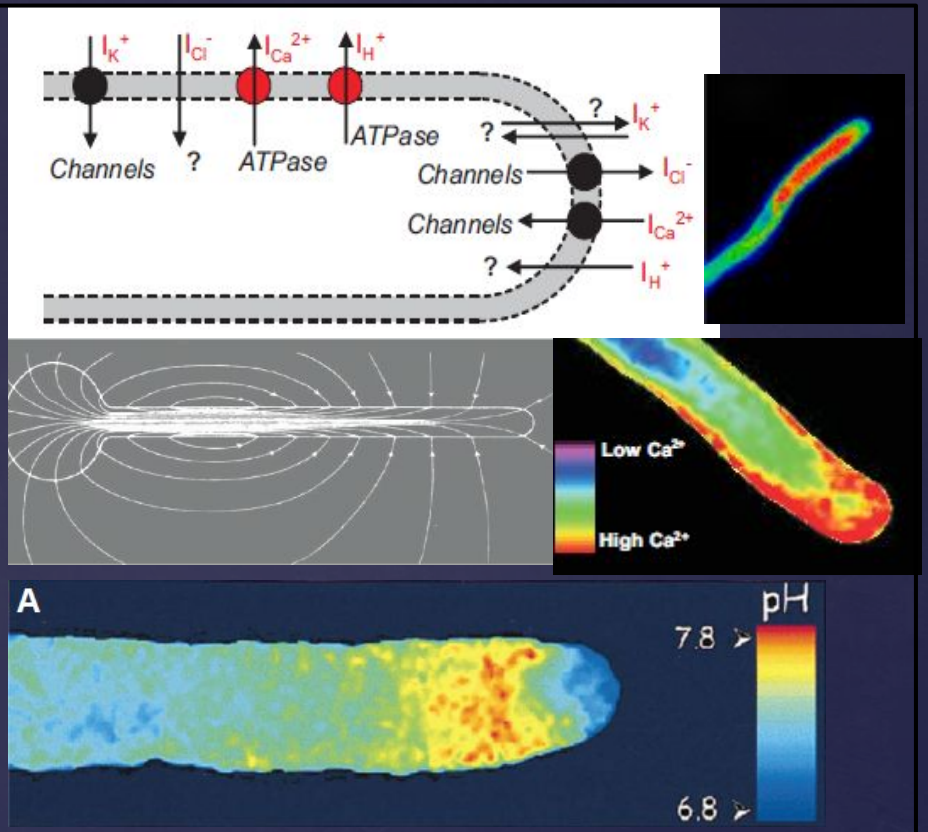


Протонный градиент

Градиент мембранного потенциала



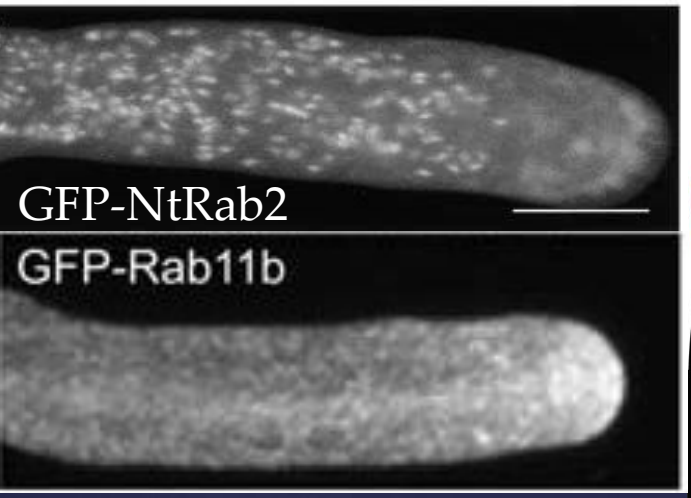
- Таким образом, пыльцевая трубка – прекрасная модель для изучения ИОННОЙ РЕГУЛЯЦИИ РОСТА, которая включает в себя
- Работу ионных каналов и помп
- Их дифференциальную регуляцию
- Градиенты концентрации ионов в цитоплазме
- Электрическое поле и мембранный потенциал

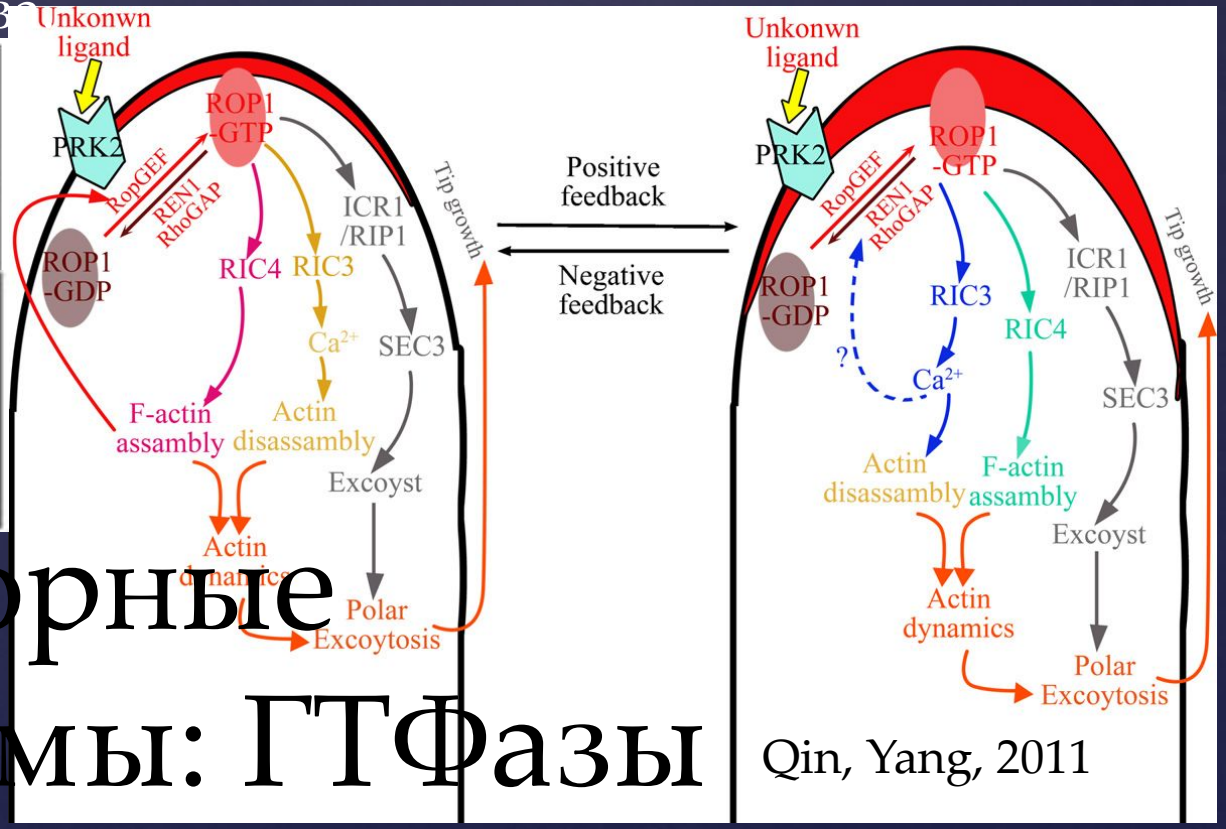


Michard E. et al. 2009. Int. J. Dev. Biol. 53: 1609-1622; Gutermuth T. et al., 2013. Plant Cell. 25: 4525.

Ионная регуляция

- Маленькие ГТФ-связывающие белки - универсальные переключатели сигнальных путей.
- Rab2 осуществляет контроль секреторного пути между ЭПР и аппаратом Гольджи в растущей пыльцевой трубке, локализован в аппарате Гольджи.
- Rab11b локализован в везикулах и отвечает за терминальный участок секреторного пути: слияние везикул с плазмалеммой
- ROP1 локализован в апикальной ПМ и важен для поддержания локального экзоцитоза



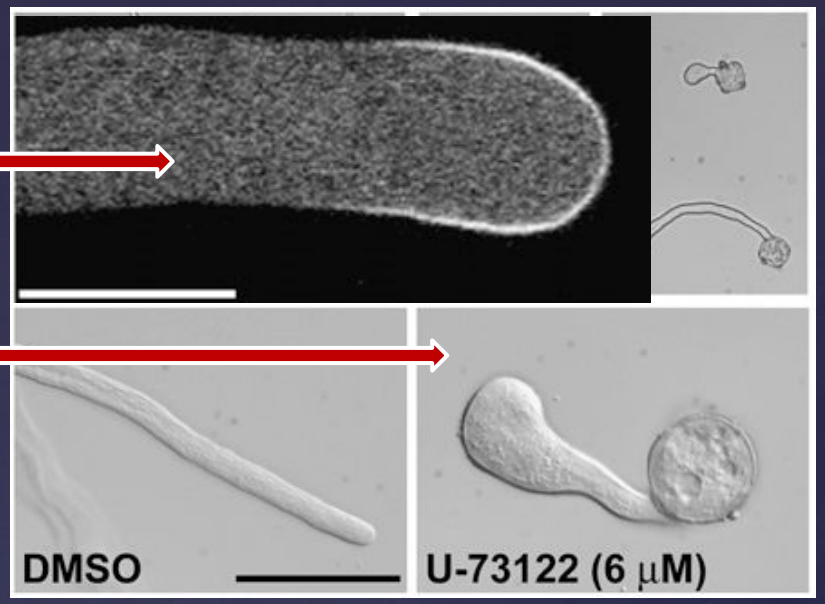


Регуляторные механизмы: ГТФазы

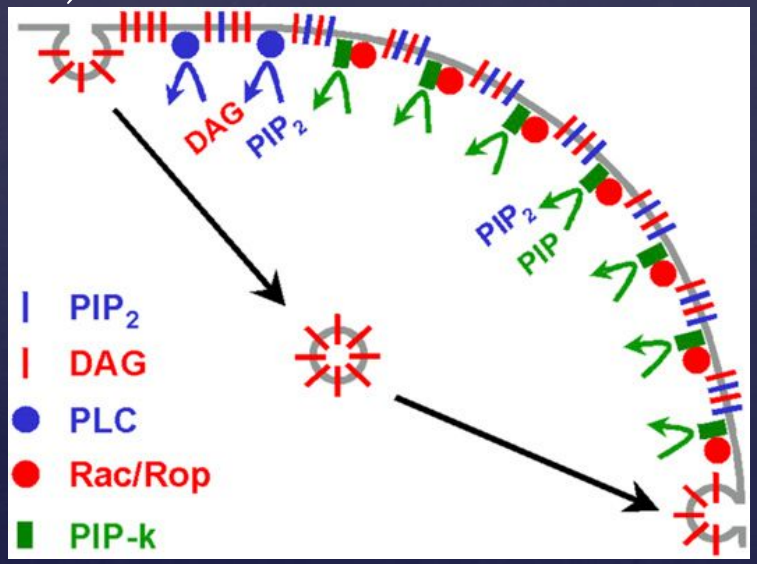
Qin, Yang, 2011

Регуляторные механизмы: фосфолипиды

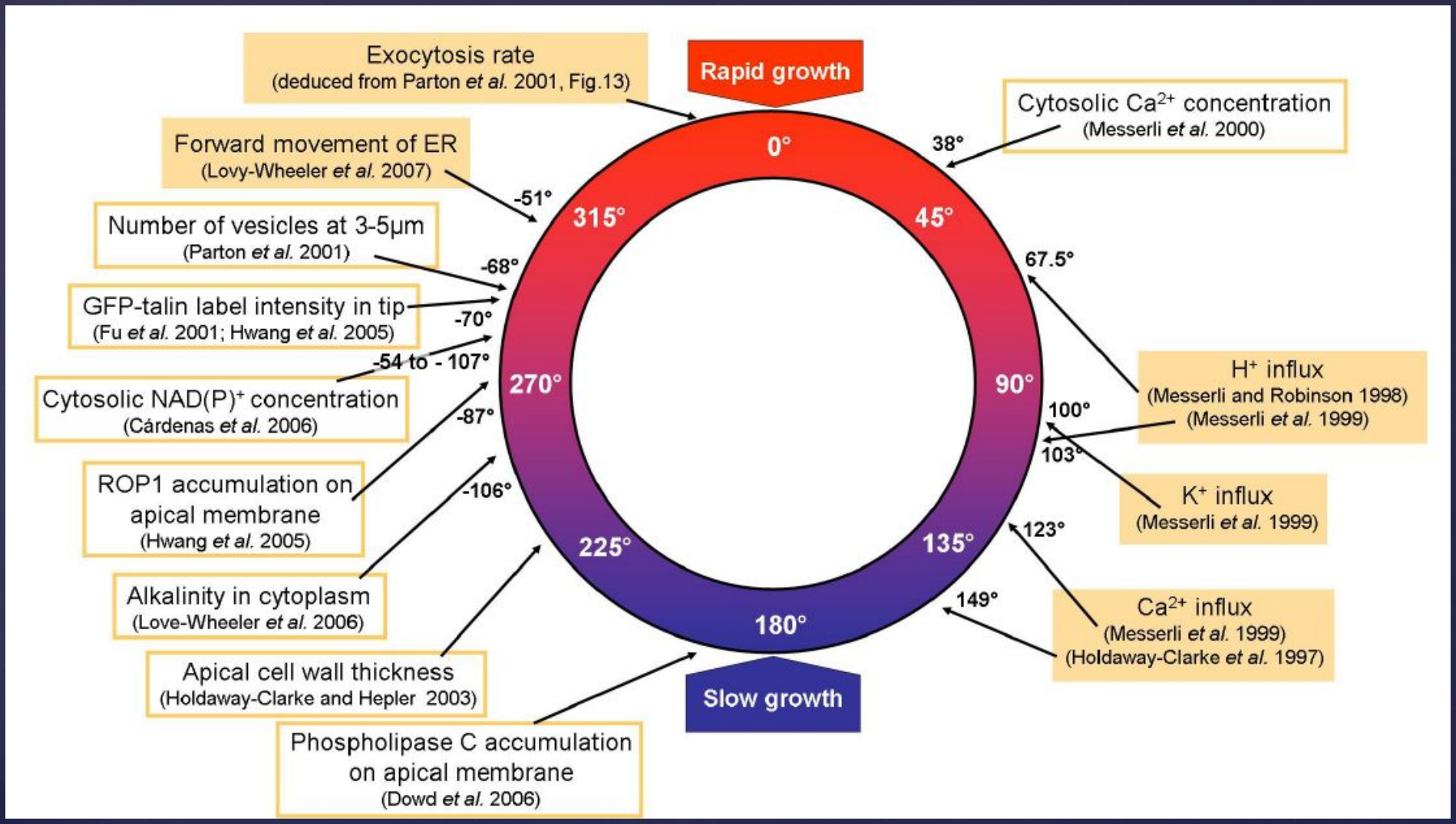
- Фосфатидилинозитолдифосфат (PIP2) есть только в апикальной мембране растущих ПТ
- Его узкая локализация обеспечивается белком phosphotidylinositol transfer protein (PITP) и фосфолипазой C (PLC), которая режет PIP2 с образованием инозитол-3-фосфата (IP3) и диацилглицерола (DAG)
- Этот процесс необходим для поддержания ионных градиентов и полярной структуры актиновых тяжей (через регуляцию актин-связывающих белков).



Helling et al., 2006



Chebli, Geitmann, 2007

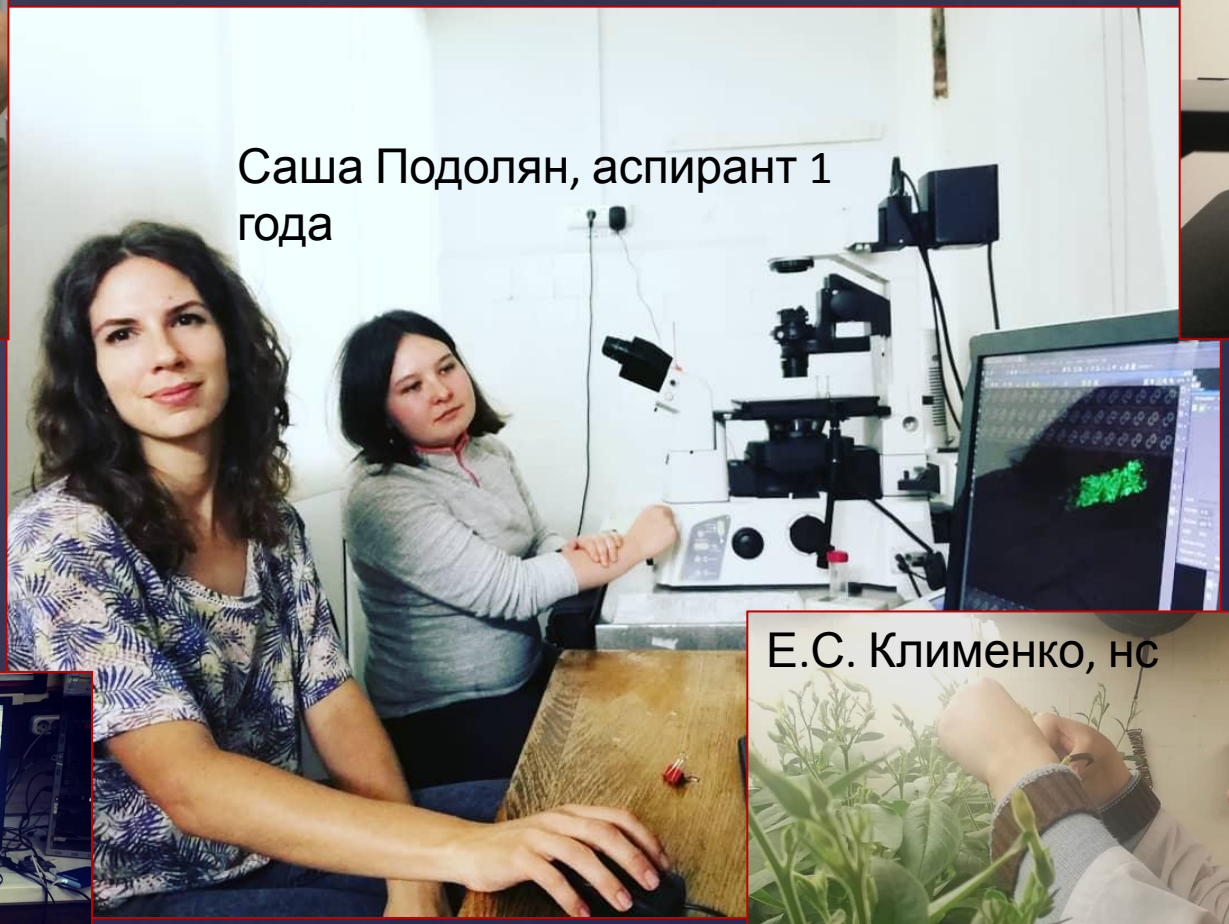


Осцилляции

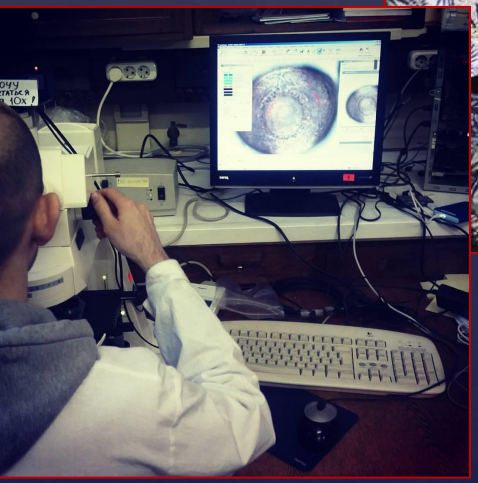
Группа репродуктивной физиологии растений МГУ

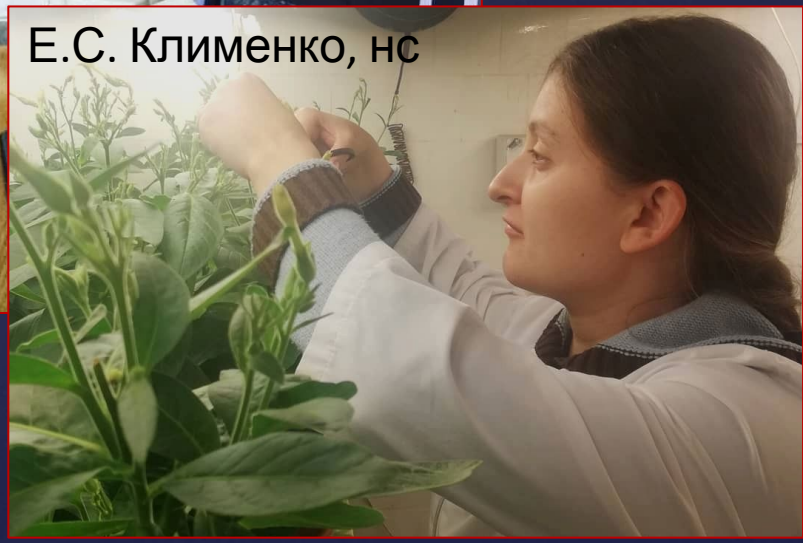
Группа в контакте: http://vk.com/club83308044

Никита Максимов, к.б.н.



Саша Подолян, аспирант 1 года

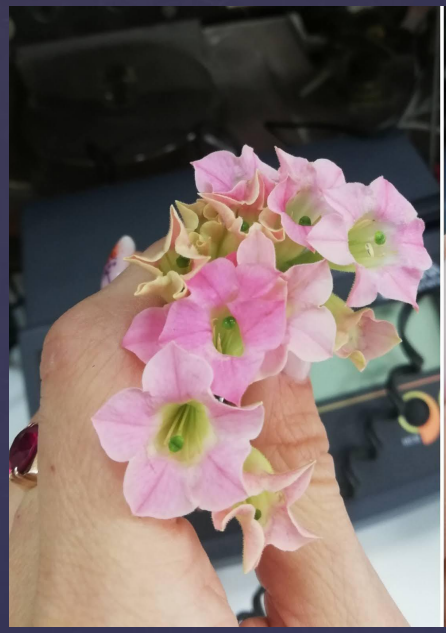


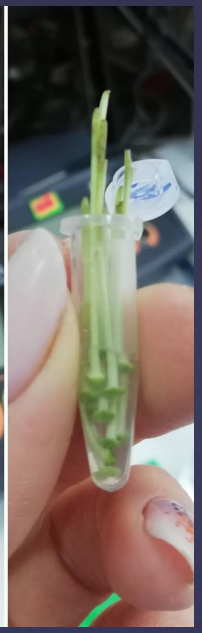


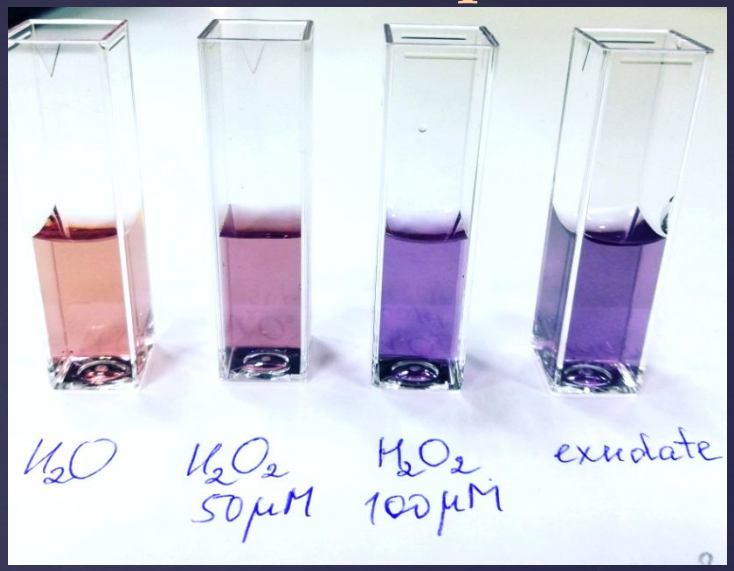
Е.С. Клименко, нс

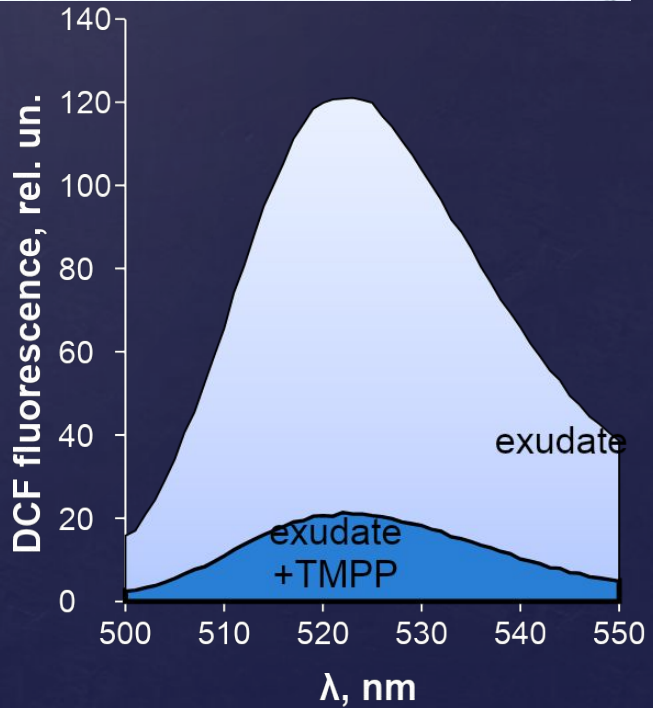
АФК как сигнал от «принимающей стороны»

1. Рыльце





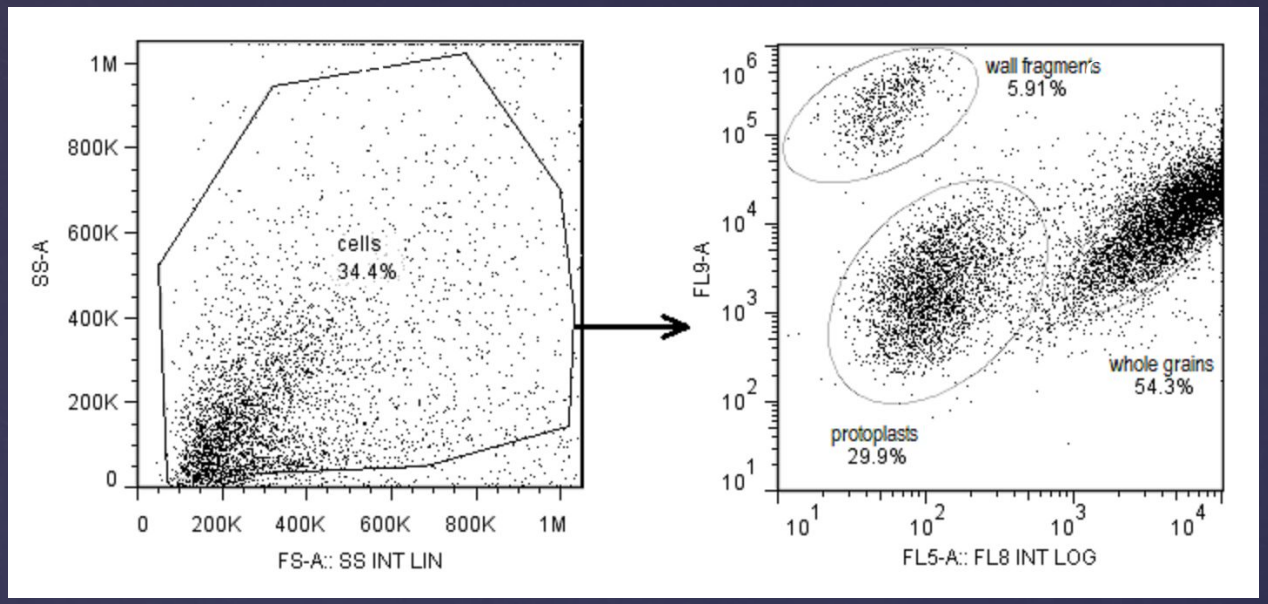




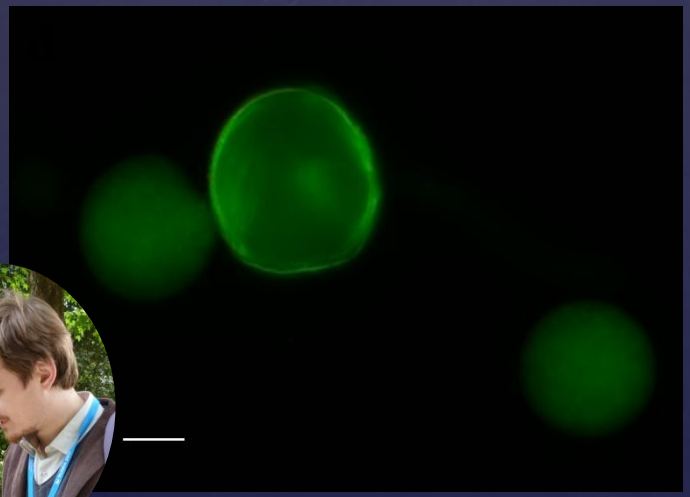
- АФК накапливаются в тканях рыльца различных видов при подготовке к опылению.
- АФК входят в состав рыльцевого экссудата

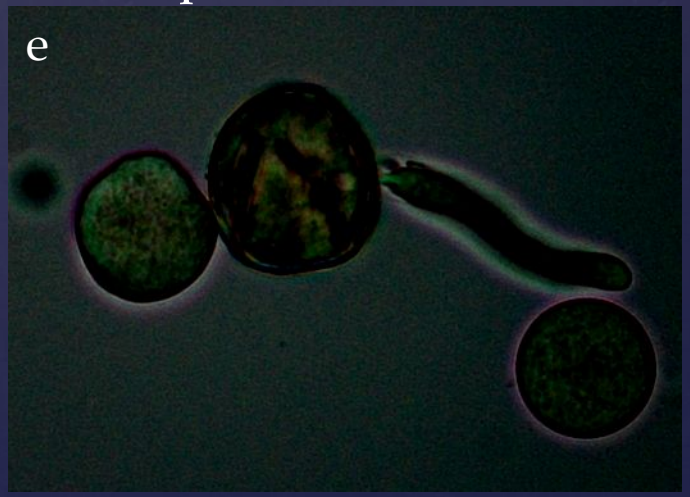
Проточная цитометрия: как?

a



- Что такое облако протопластов?!

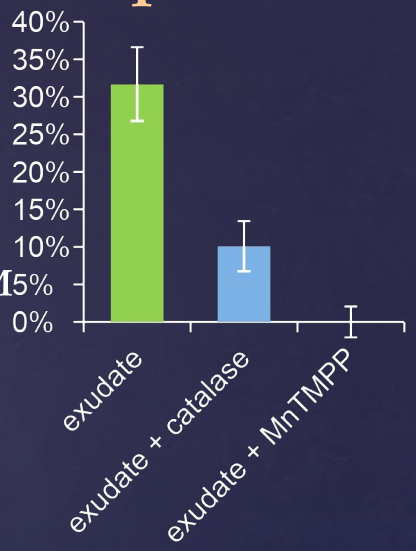


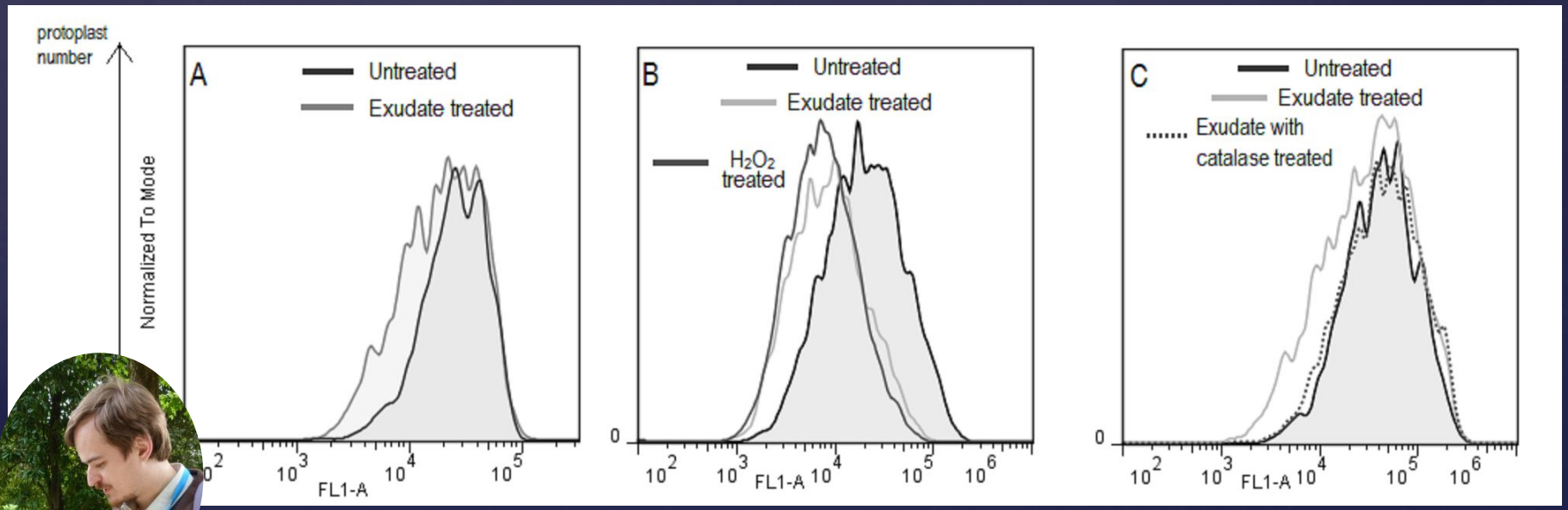


Данные получены в сотрудничестве с Е.Шиловым

АФК как сигнал от «принимающей стороны»

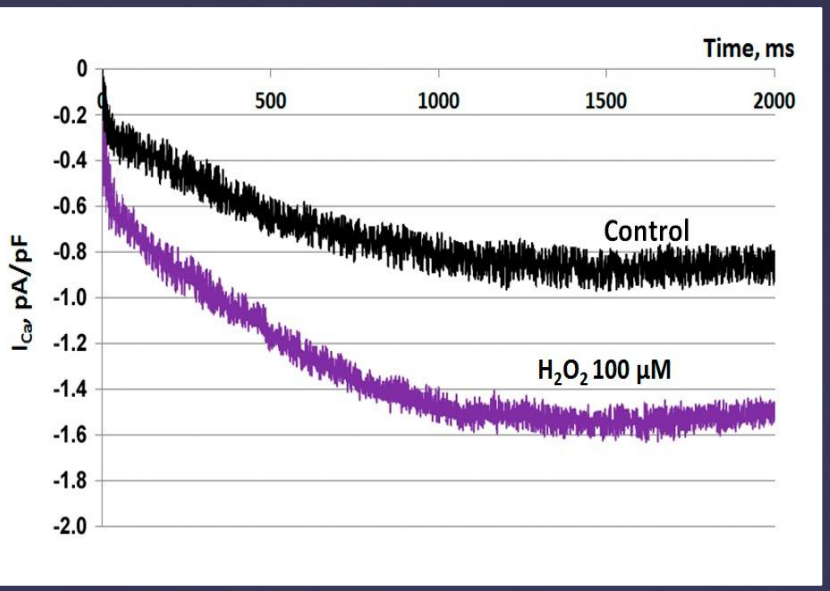
- Экссудат рыльца и экзогенный H_2O_2 вызывают гиперполяризацию мембраны пыльцевых протопластов
- Эффект экссудата снимается каталазой и тушителем MnTMPP
- Основное действующее на МП вещество экссудата - H_2O_2

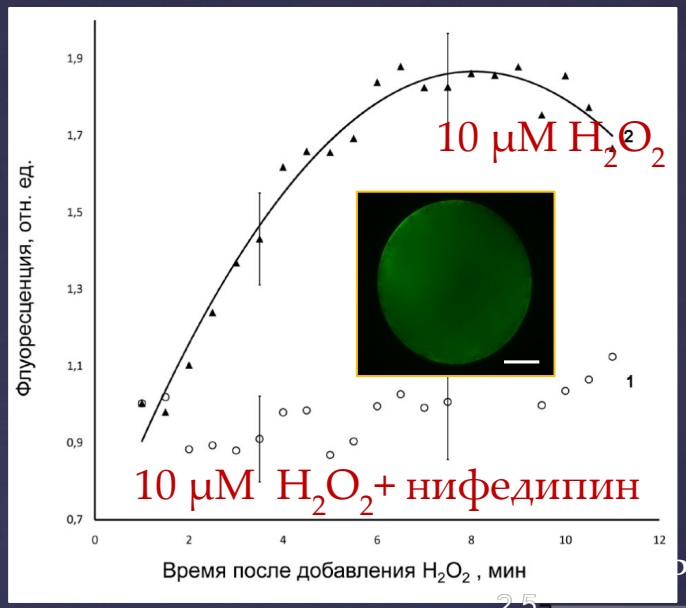




Данные получены в сотрудничестве с Е.Шиловым

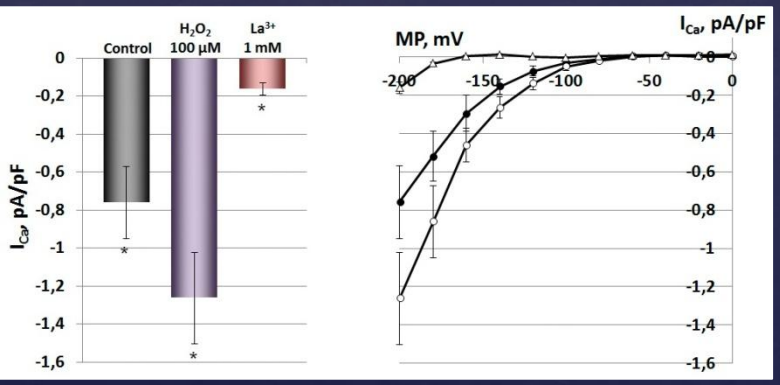
АФК как сигнал: H_2O_2 активирует Ca^{2+} ток и вход Ca^{2+} в цитоплазму



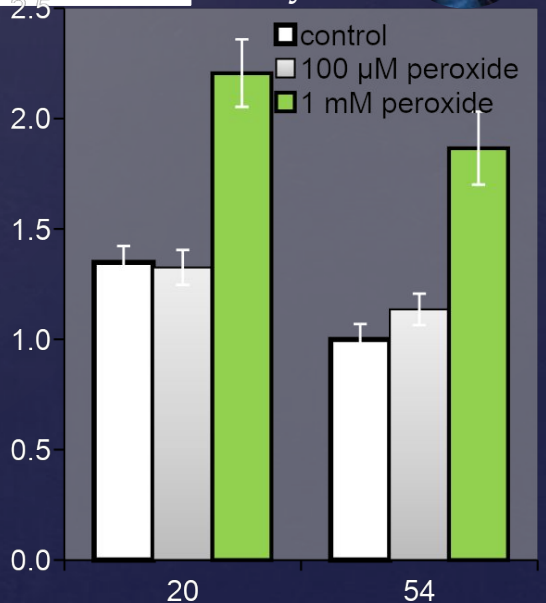


Podolyan et al., 2019

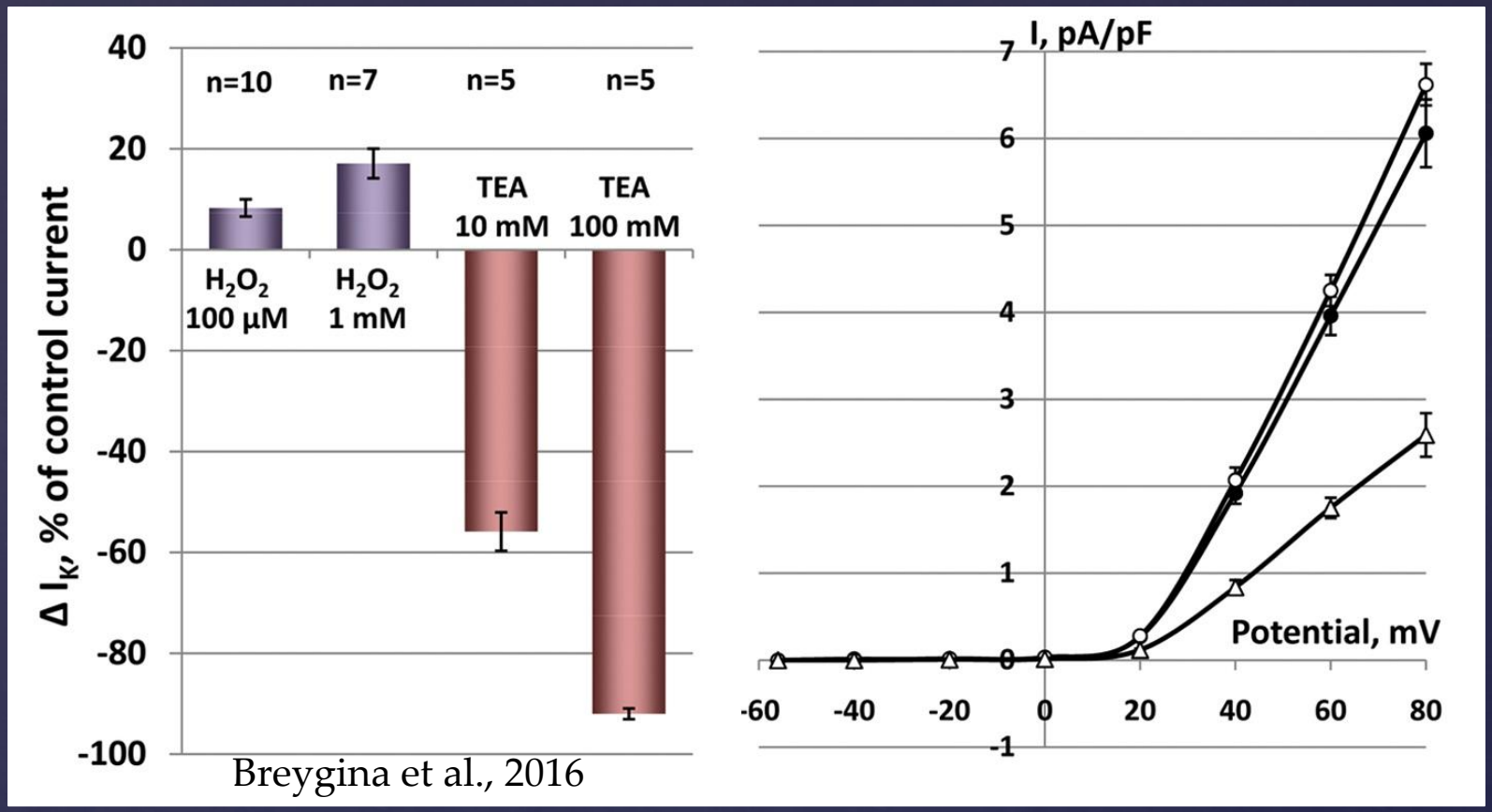
H_2O_2 активирует входящий Ca^{2+} ток в протопластах лилии



H_2O_2 индуцирует вход Ca^{2+} в цитоплазму (краситель Fluo-3) в протопластах табака и трубках лилии



АФК как сигнал: H_2O_2 активирует ток K^+



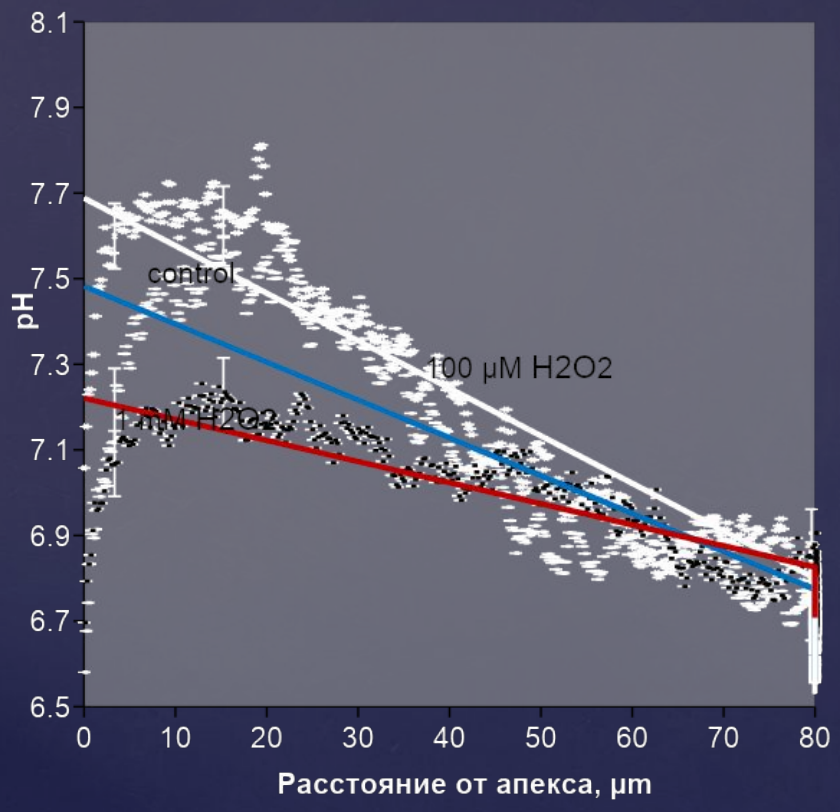
Breygina et al., 2016

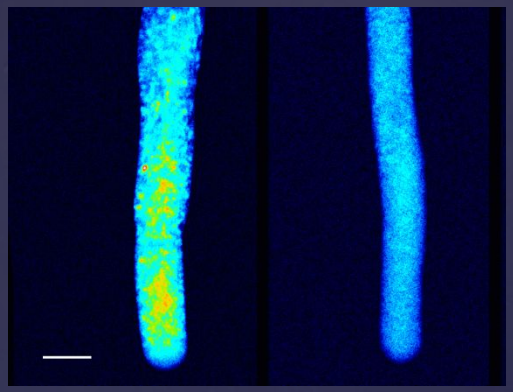
Сравнение средней плотности тока при (в % от контроля).

H_2O_2 – активирует K^+ ток; TEA – ингибитор K^+ каналов, блокирует ток.

Средние вольт-амперные характеристики выходного K^+ тока.

АФК как сигнал: H_2O_2 убирает в трубках «щелочной поясок»





контроль H_2O_2

- В растущих трубках лилии вслед за массированным входом кальция происходит сглаживание градиента pH, что указывает на ингибирование H^+-АТФазы

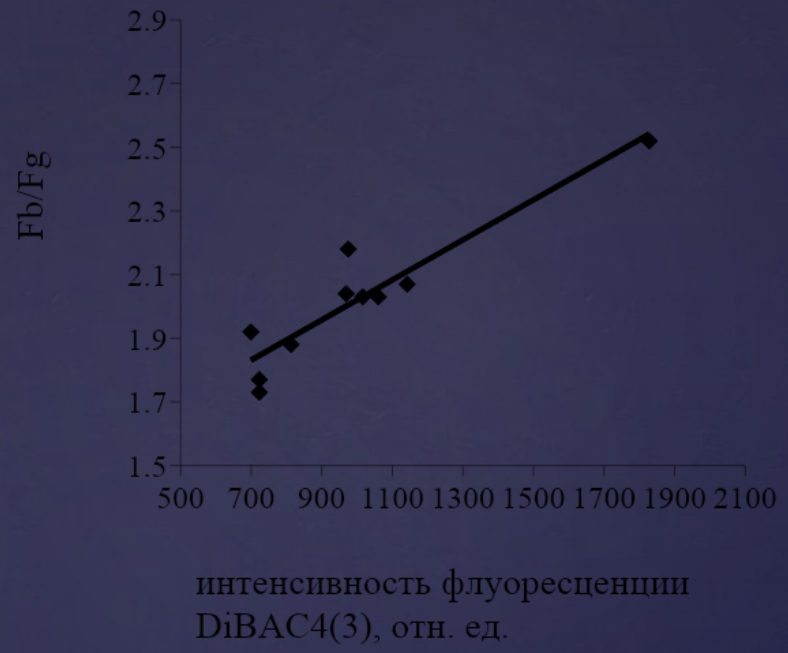
Podolyan et al., 2019

Два оптических метода оценки E_m

<u>Ратиометрический быстрый краситель Di-4-ANEPPS:</u>

✔Съемка в двух каналах при возбуждении синим (Fb) и зелёным (Fg) светом – нет зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации красителя;

✔Не выцветает и быстро реагирует на изменения – позволяет регистрировать динамику.



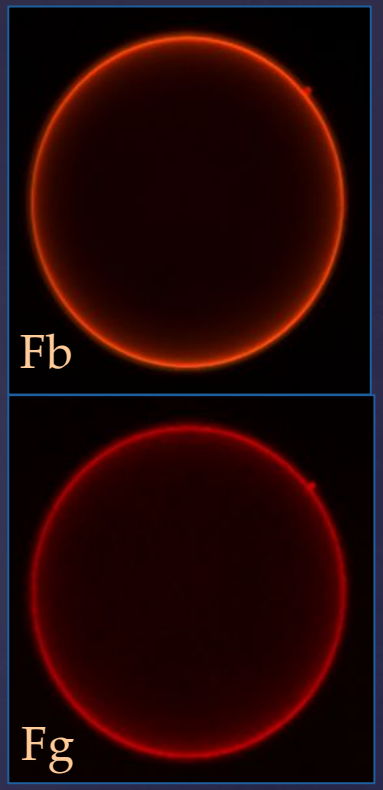
<u>Медленный краситель $DiBAC_4(3)$:</u>

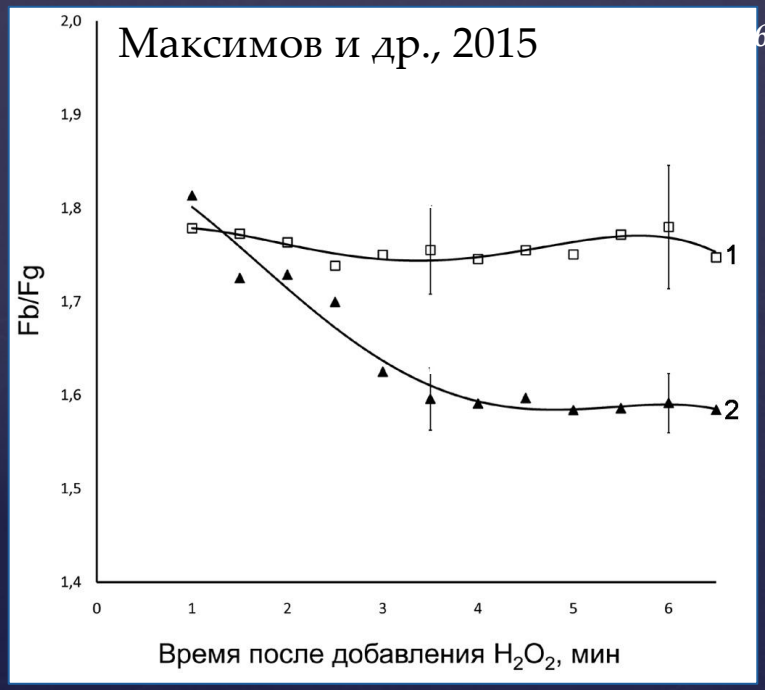
✔ позволяет определить абсолютные значения E_m (расчет ведется относительно полностью деполяризованных клеток)

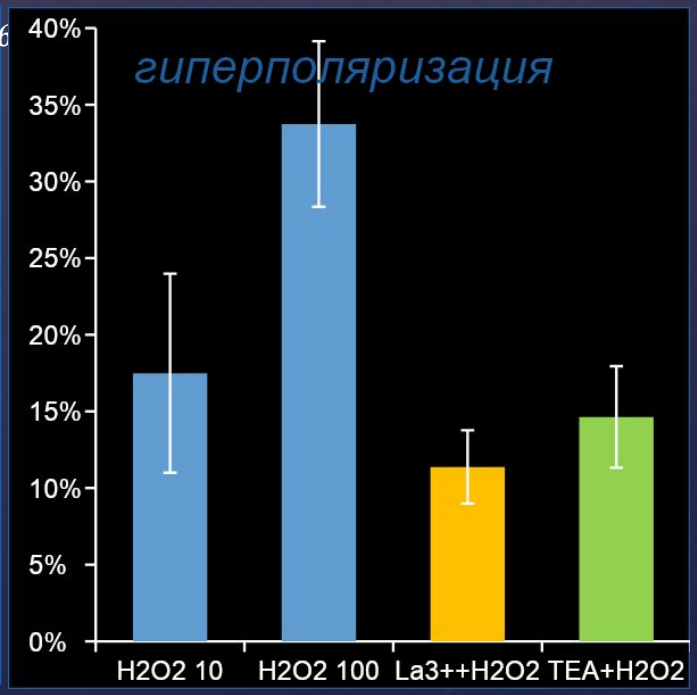
✔Прост в использовании: позволяет работать с большими популяциями клеток, набирая статистические данные.

АФК как сигнал: H_2O_2 вызывает гиперполяризацию

- Количественная флуоресцентная микроскопия: динамика эффекта
- Проточная цитометрия с красителем $DiBAC_4(3)$: исследование большой популяции протопластов

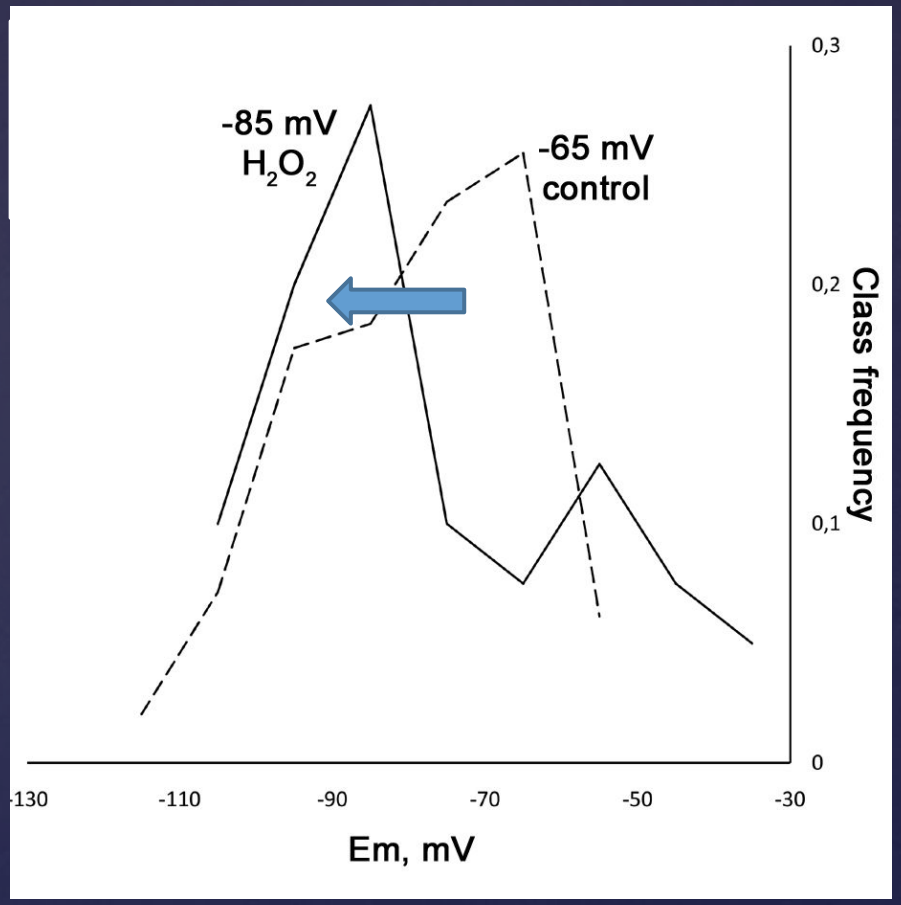






Данные получены в сотрудничестве с Е.Шиловым

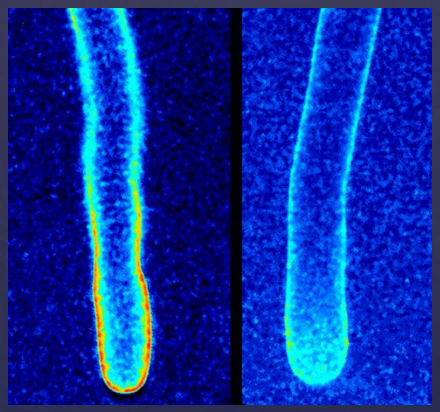
Гиперполяризация плазмалеммы при действии H_2O_2 (10 μM) - распределение



После 10 минут инкубации происходит достоверное смещение популяции в область более отрицательного потенциала.

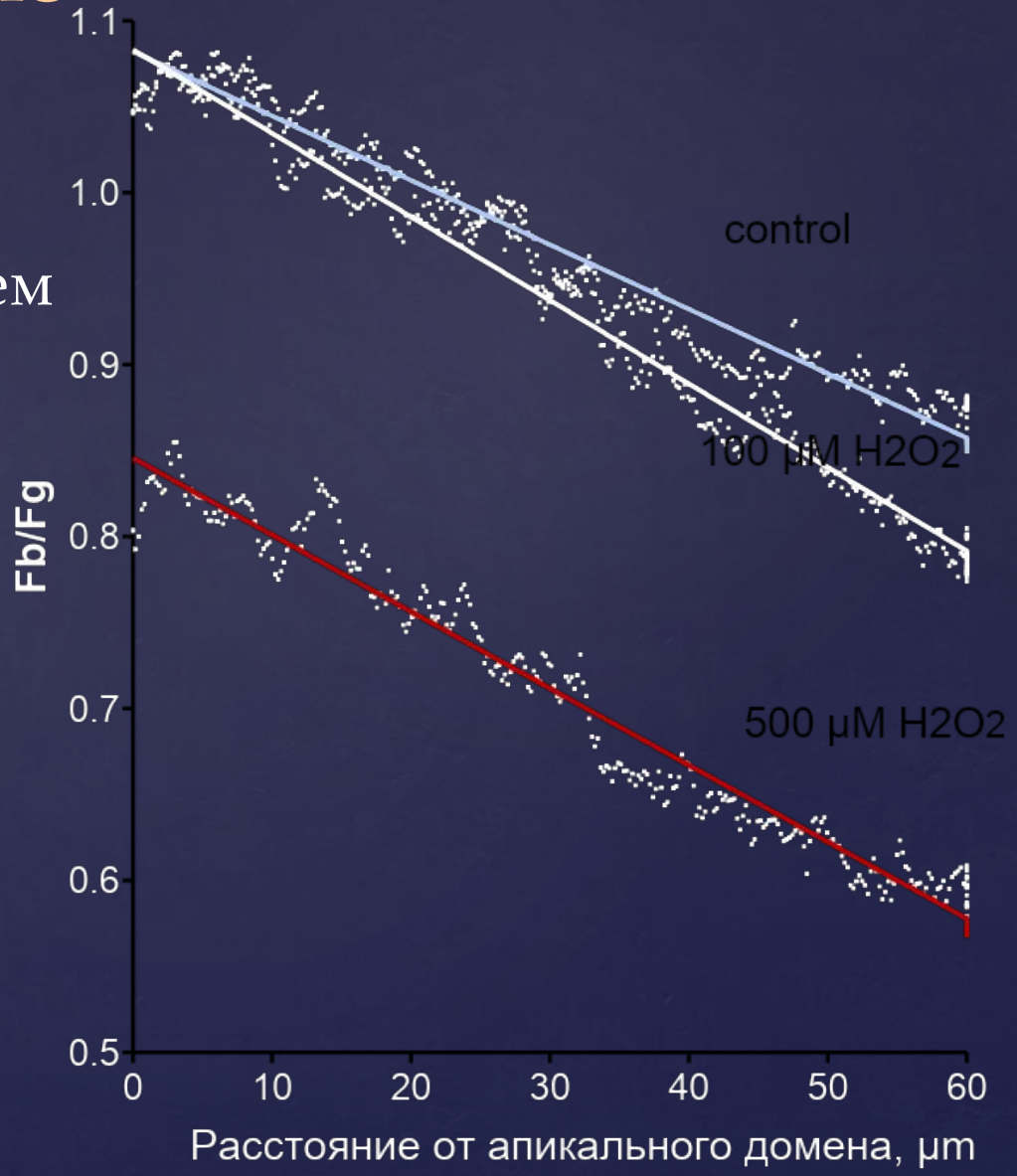
АФК как сигнал: H_2O_2 вызывает гиперполяризацию

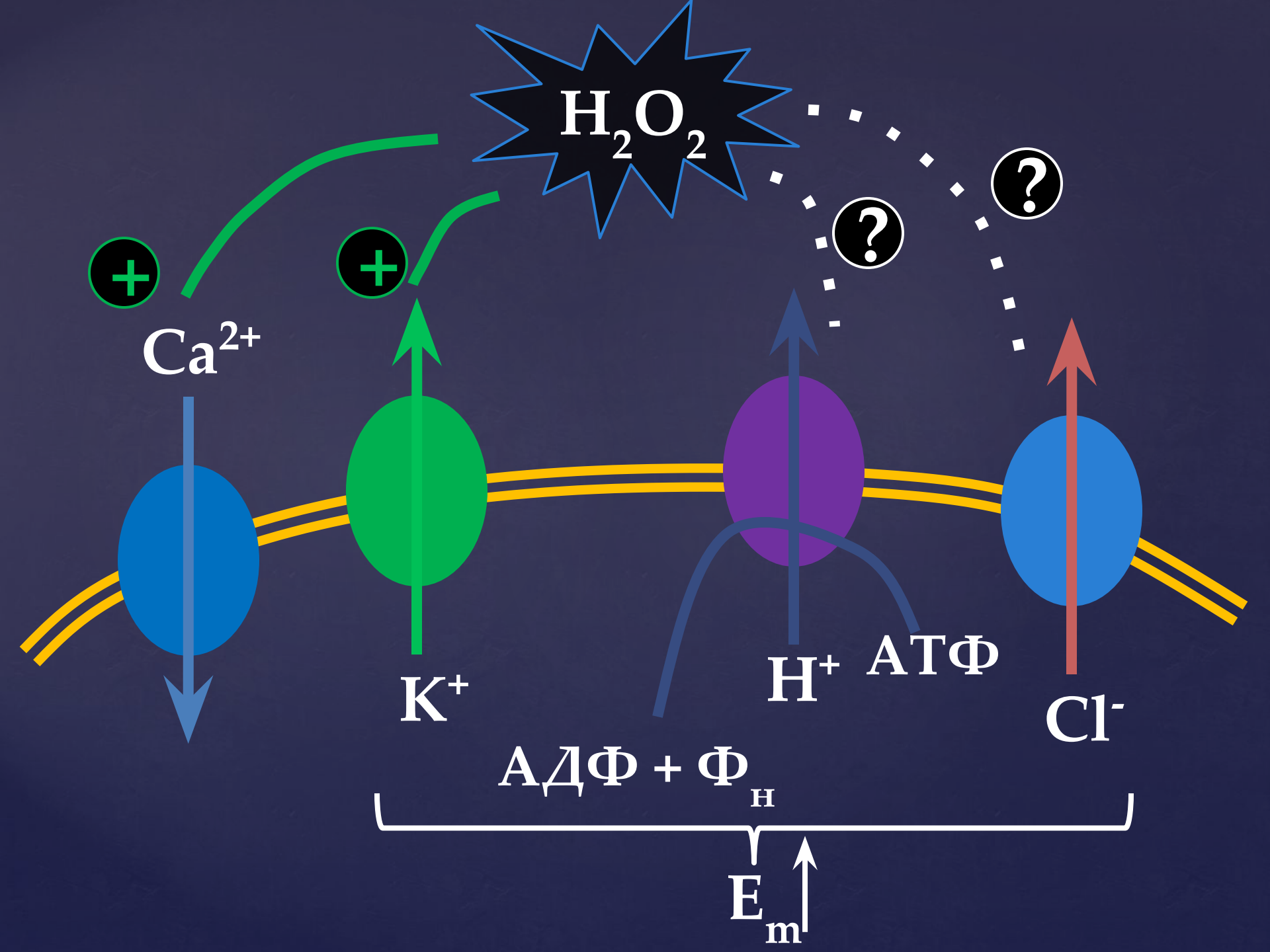
- Количественная флуоресцентная микроскопия с красителем di-4-ANEPPS: растущие трубки лилии



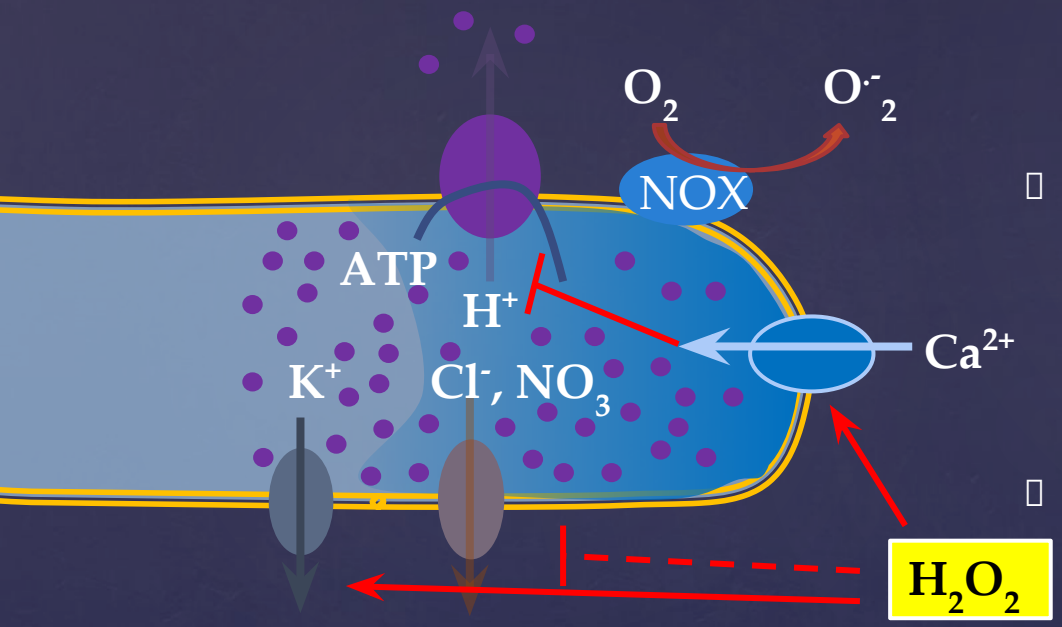
контроль 500 μM H_2O_2

Podolyan et al., 2019

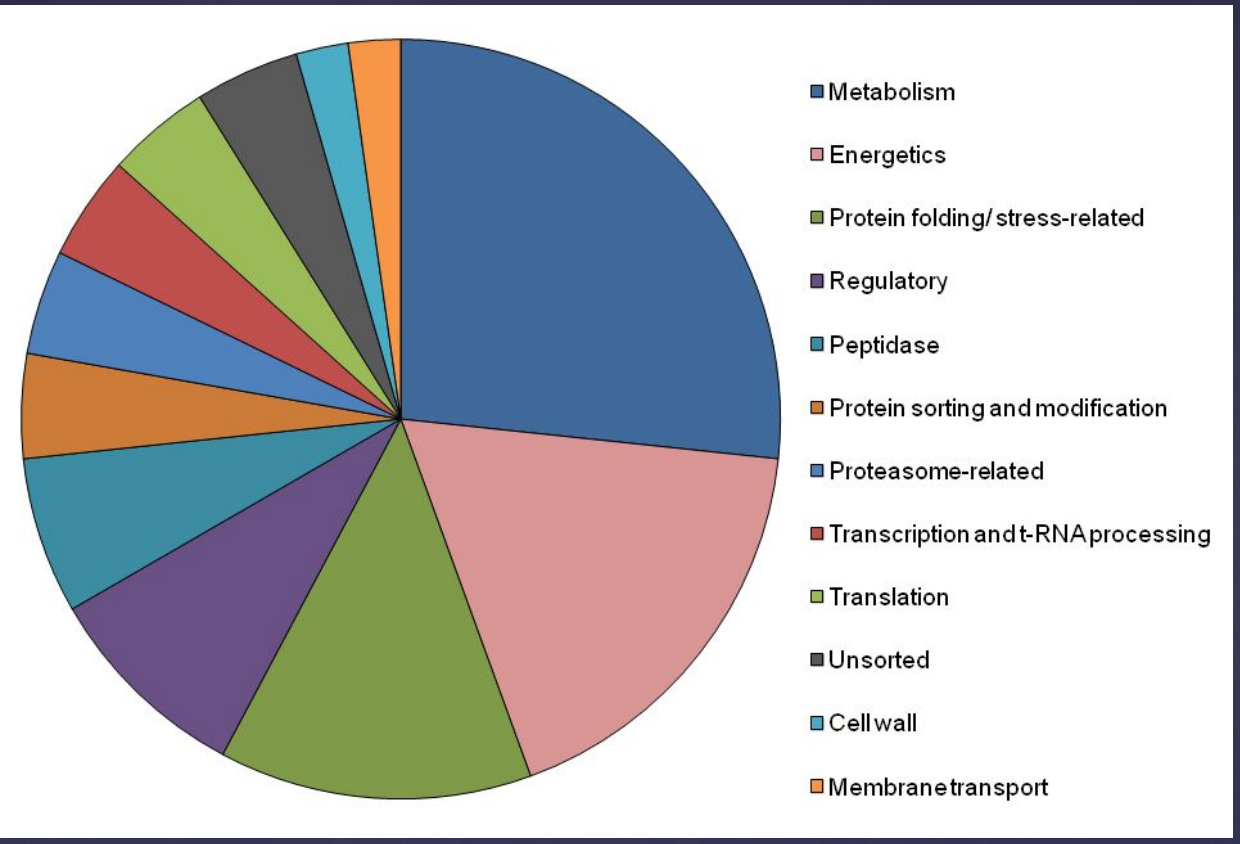



H_2O_2
?
?
+
+
Ca^{2+}
K^+
H^+
АТФ
Cl^-
АДФ + $Ф_н$
E_m

АФК как сигнал: H_2O_2 вызывают перестройку всех градиентов



- В трубке ион-транспортные системы расположены полярно
- Они формируют в цитоплазме динамичные градиенты концентраций, а на мембране – градиент МП
- АФК-сигнал, приходя в трубку, меняет прямо или косвенно работу практически всех ион-транспортных систем
- Тем самым АФК вызывают перестройку внутренних градиентов



- Пероксид водорода вызывает изменения протеома пыльцы. Появляются более 50 белков, которых не было в контроле.
- Основные направления: энергетика, метаболизм, синтез белка
- Всё для активного роста!
- Ни одного антиоксиданта!

АФК как сигнал: протеомика

Данные получены в лабораторией протеомики ИБХ РАН

Цветковые VS Хвойные

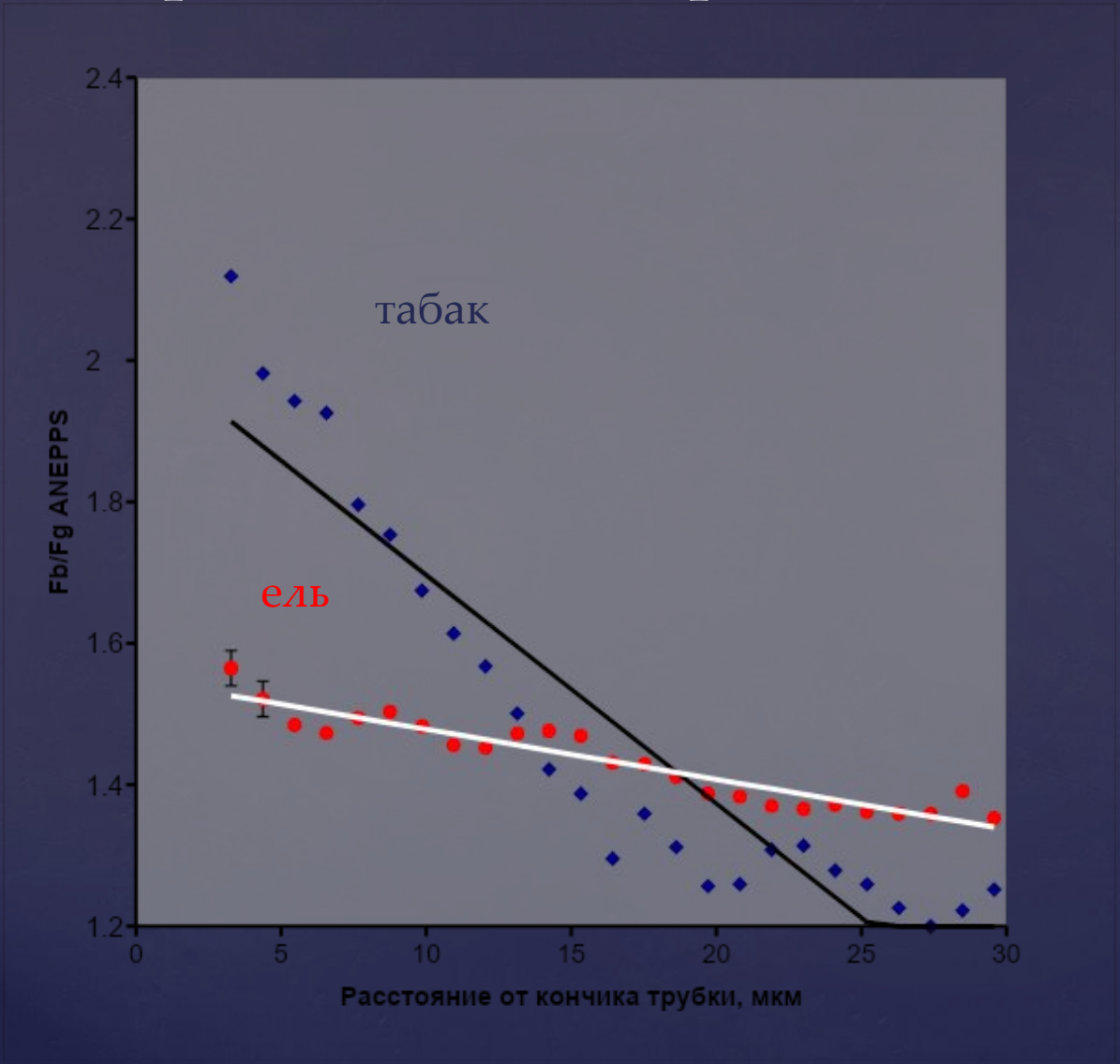
Цветковые

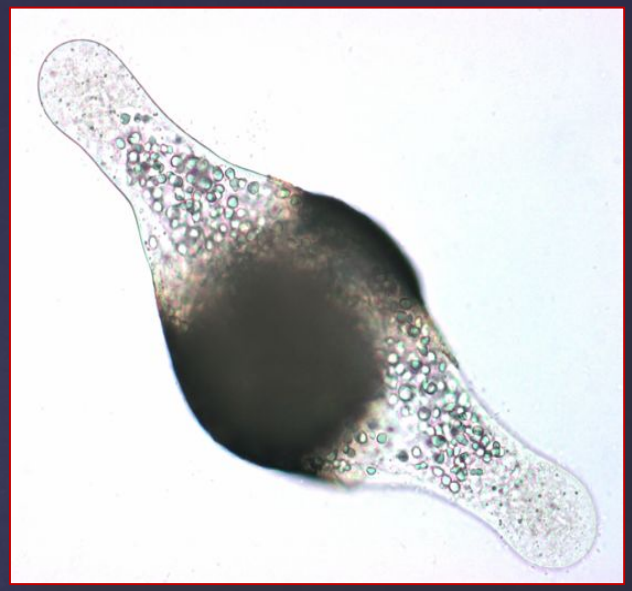
Хвойные

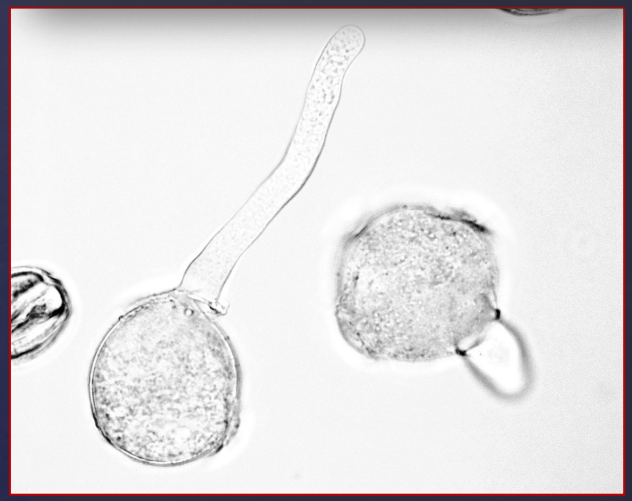
- Изученный модельный объект
- Быстрый рост
- Униполярный рост
- Обращенный фонтан
- Крутой градиент Ca^{2+}
- Крутой градиент МП
- *Зависимость от межклеточного взаимодействия*

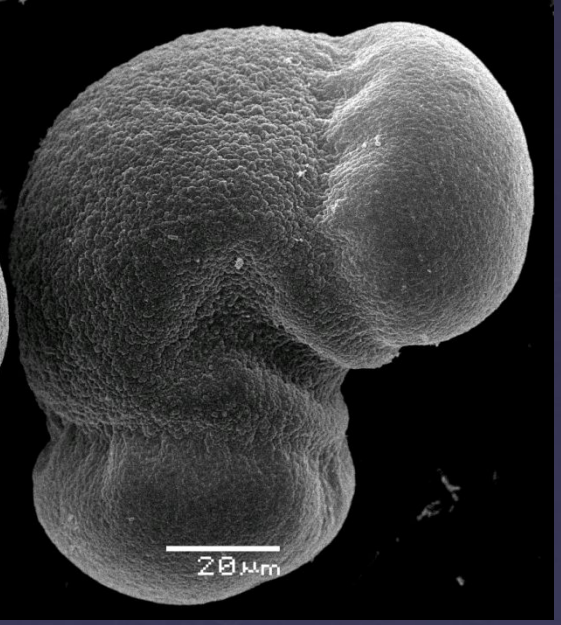
- Относительно новый объект
- Медленный рост
- Возможность биполярного роста
- Прямой фонтан
- Плавный градиент Ca^{2+}
- Плавный градиент МП
- *Больше «автономности»*

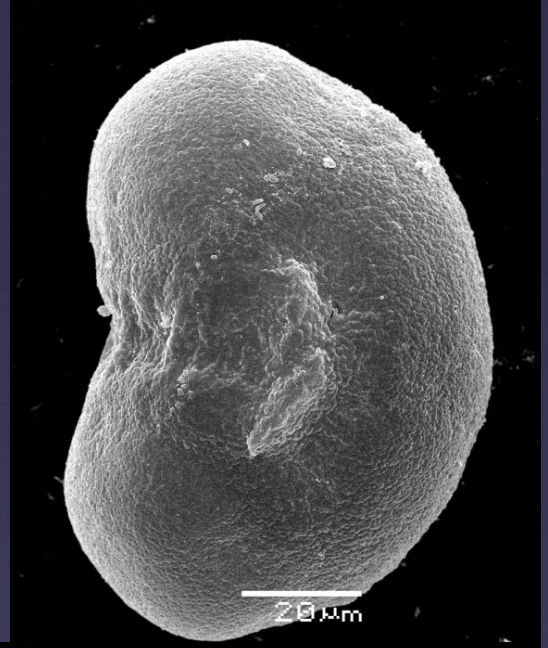
Градиент мембранного потенциала

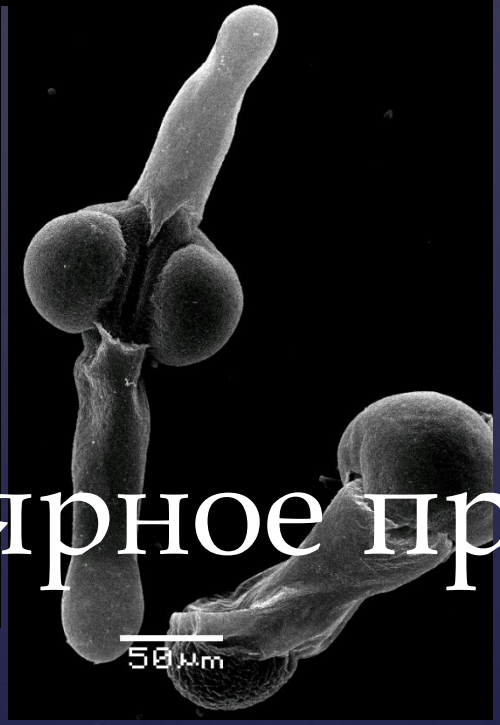






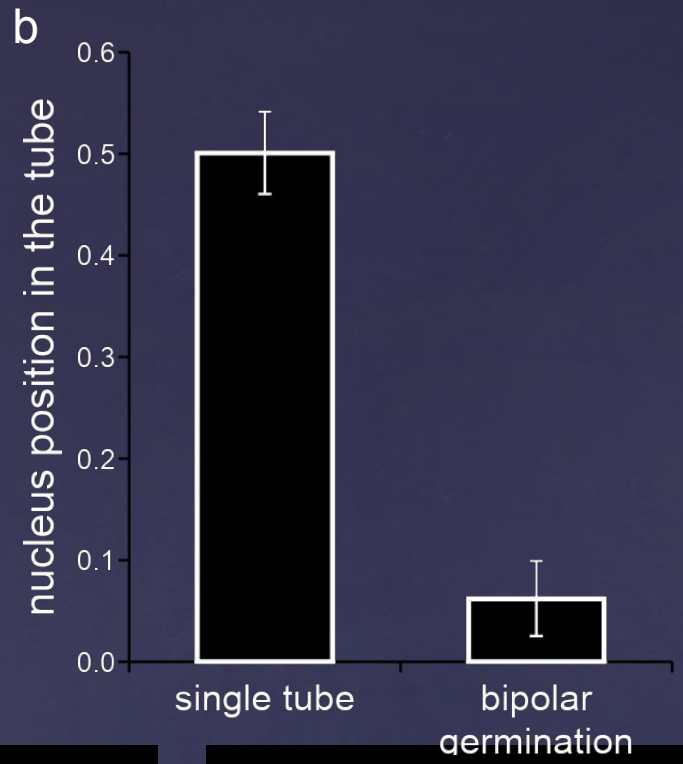






Breygina et al., 2019
(в соавторстве с Полевовой С.В.)

Биполярное прорастание у ели



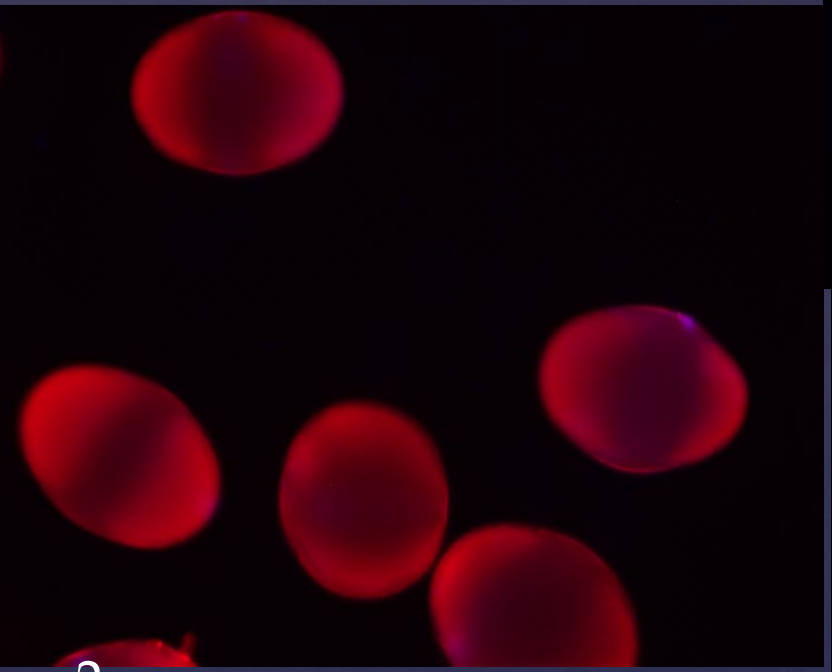
- Две трубки, а МГМ один. Куда же он пойдет?
- Он тоже сомневается…

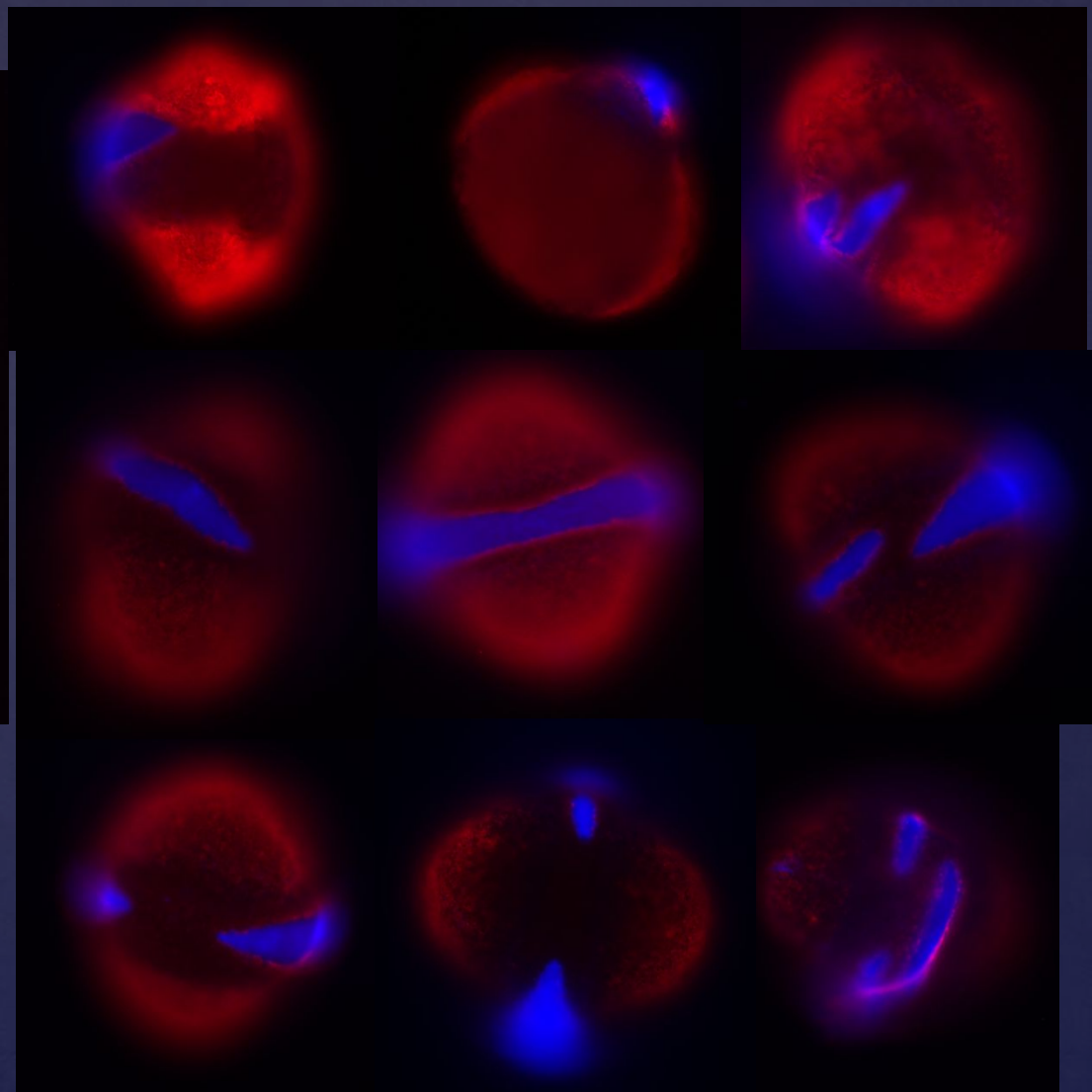
Breygina et al., 2019

Биполярное прорастание: ядро

Биполярное прорастание: динамика

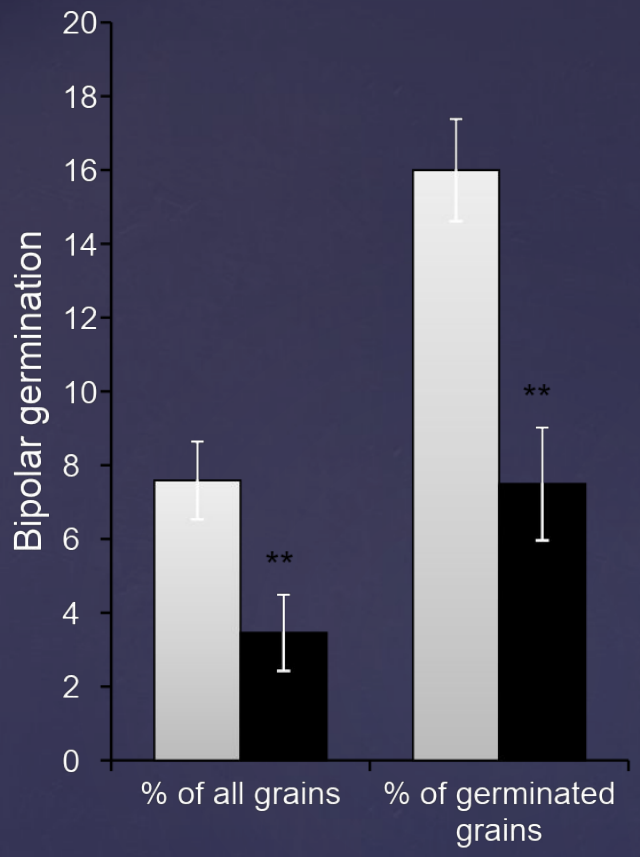
Breygina et al., 2019

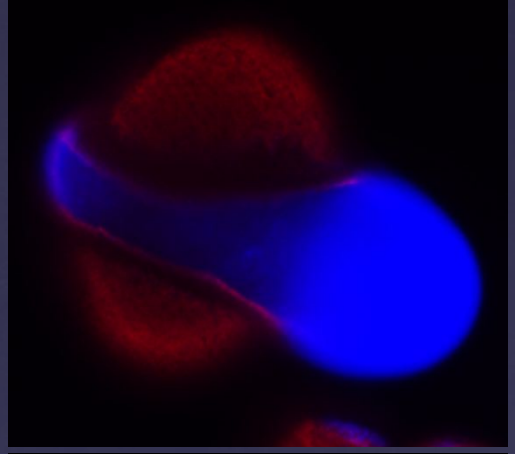


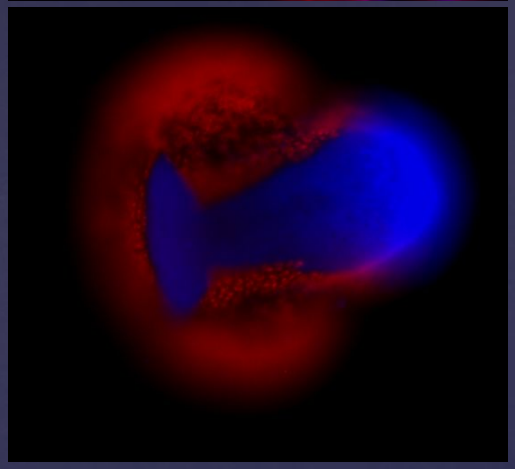


- 2 часа
- 6 часов
- 9 часов

Сколько разрывов – столько и трубок

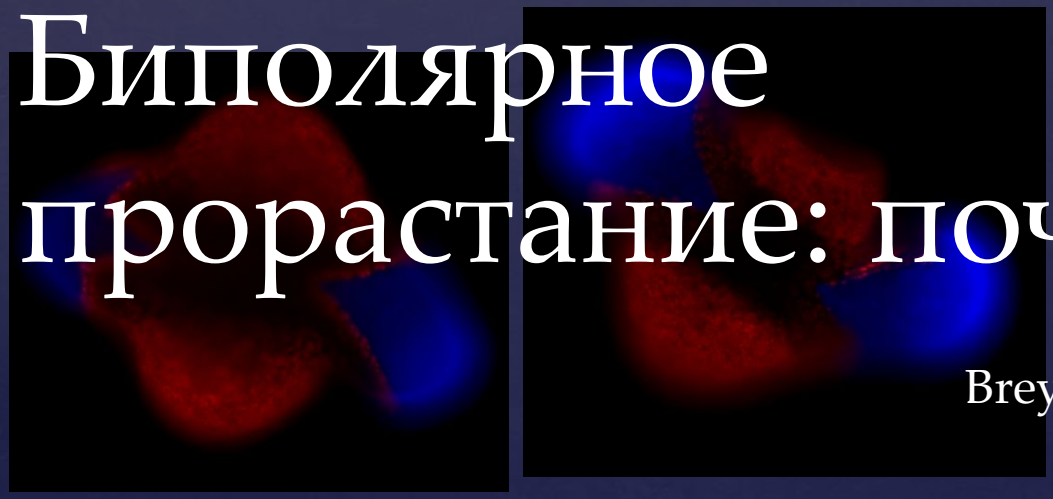






- Биполярное прорастание характерно для мешковой пыльцы
- Мы описали феномен и посмотрели, можно ли на него повлиять
- Снова АФК!

Биполярное прорастание: почему?

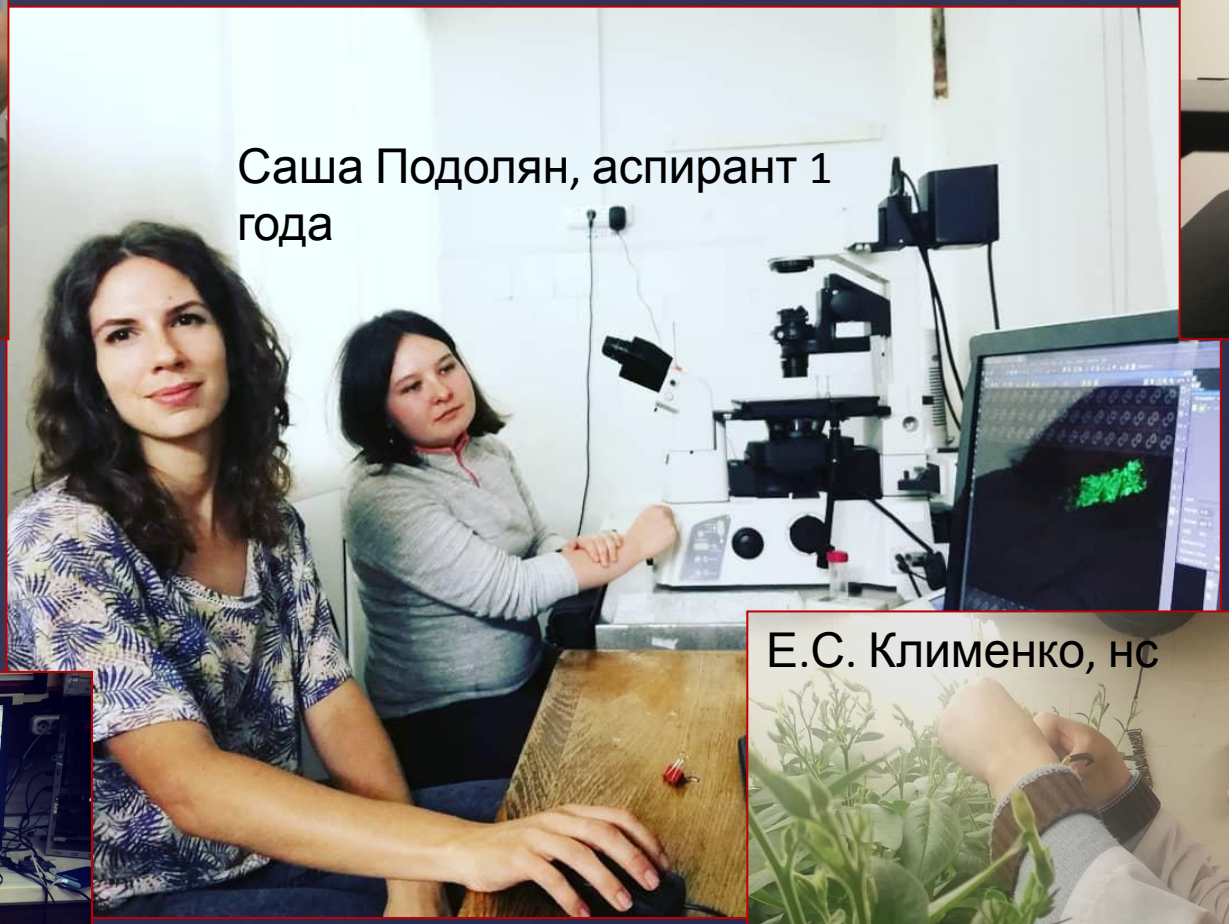


Breygina et al., 2019

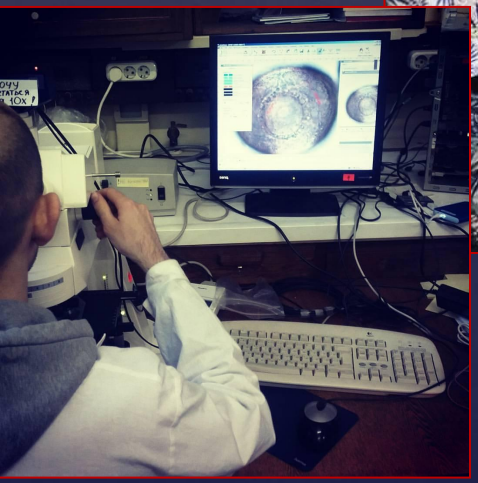
Группа репродуктивной физиологии растений МГУ

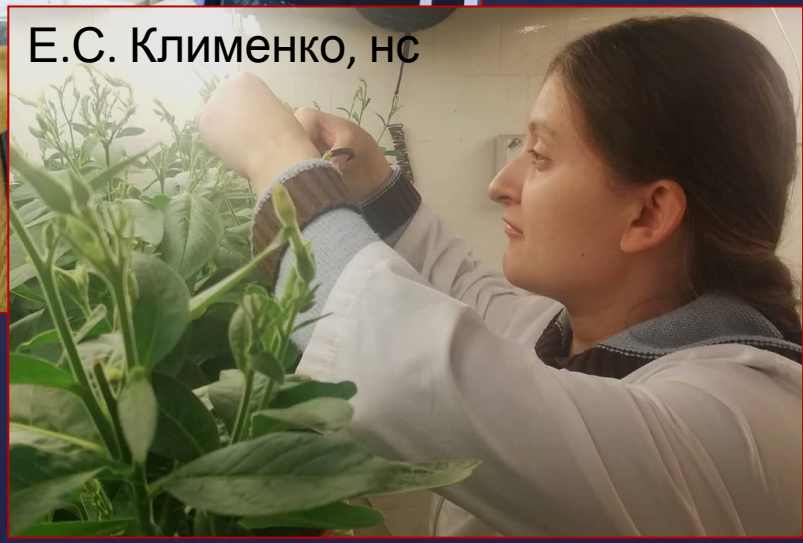
Группа в контакте: http://vk.com/club83308044

Никита Максимов, к.б.н.



Саша Подолян, аспирант 1 года





Е.С. Клименко, нс

Спасибо за внимание!

Работы выполнены при поддержке

- РФФИ (19-04-00282 рук. М. Брейгина)
- РНФ 19-74-00036 (рук. М. Брейгина)

Конфокальные микрофотографии сделаны на ББС МГУ

Пэтч-кламп выполнен в сотрудничестве с кафедрой физиологии человека и животных

Проточная цитометрия выполнена в сотрудничестве с кафедрой иммунологии

Протеомика выполнена в сотрудничестве с лабораторией протеомики ИБХ