


Когда «родной» вовсе не значит «желанный»

САМОНЕСОВМЕСТИМОСТЬ

ТИПЫ НЕСОВМЕСТИМОСТИ

Три системы охарактеризовано на молекулярном уровне:

1. SSI – спорофитная самонесовместимость (*крестоцветные*)
2. S-гликопротеиновый (*маковые*)
3. SРНКазный тип, характерный для *паслёновых, розоцветных и подорожниковых*



Гаметофитная самонесовместимость

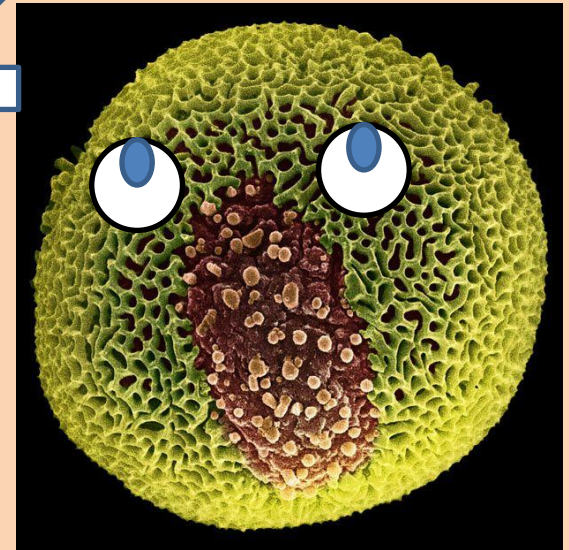
ГСН/ССН

- *Спорофитная СН*: фенотип пыльцы определяется геномом родителя (спорофита)
- *Гаметофитная СН*: фенотип пыльцы определяется гаплоидным геномом (гаметофитным)
- *Гаметофитная СН* шире распространена (60-90 семейств)

Гаметофитная самонесовместимость

- Рост пыльцы подавляется только тогда, когда она вошла в проводниковый тракт столбика.

А на рыльце казалось, что
всё у нас получится...





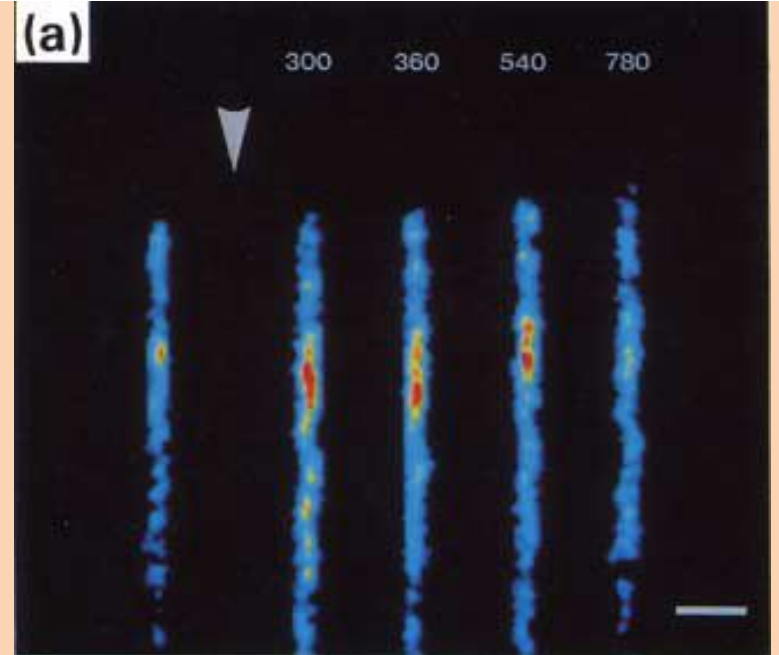
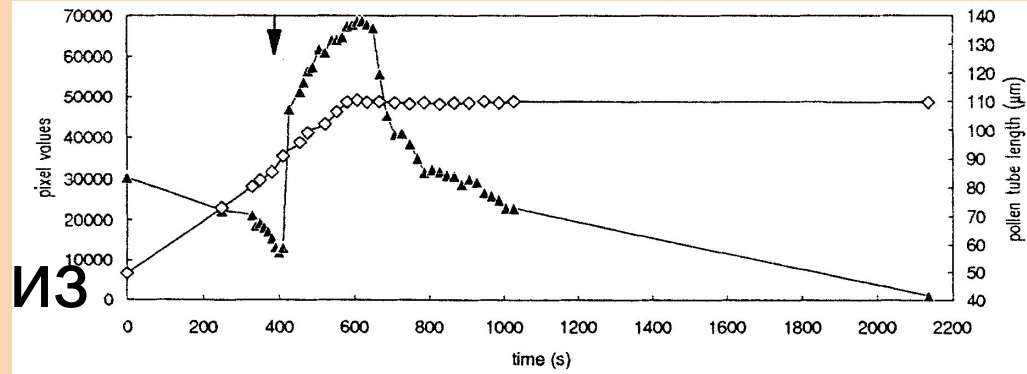
Гаметофитная SI у мака

Две *S*-детерминанты *S*-локуса мака уже достаточно хорошо изучены:

- *PrpS* кодирует трансмембранный белок ~20 kDa, специфичный для пыльцы
- *PrsS* ~14 kDa белок, выделяемый на поверхность пестика

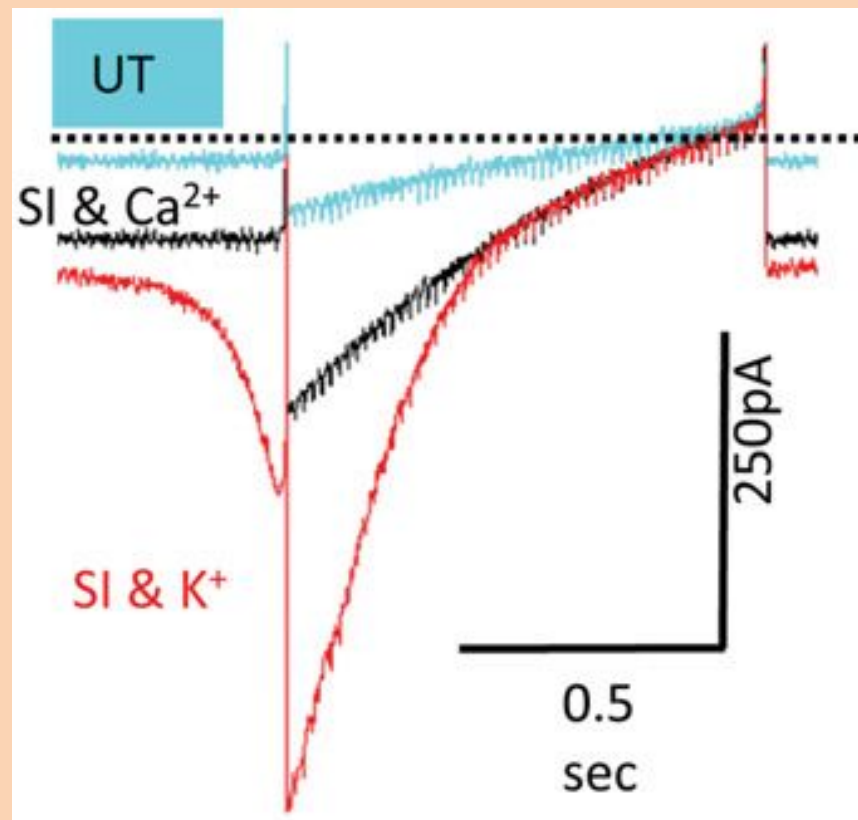
Вход кальция

- При СН ответе активируются катионные каналы
- Это наиболее ранний из зарегистрированных ответов СН трубок
- $[Ca^{2+}]_{цит}$ повышается почти мгновенно, однако максимум не в кончике, а в области ядра!
- Пик кальция совпадает по времени с остановкой роста

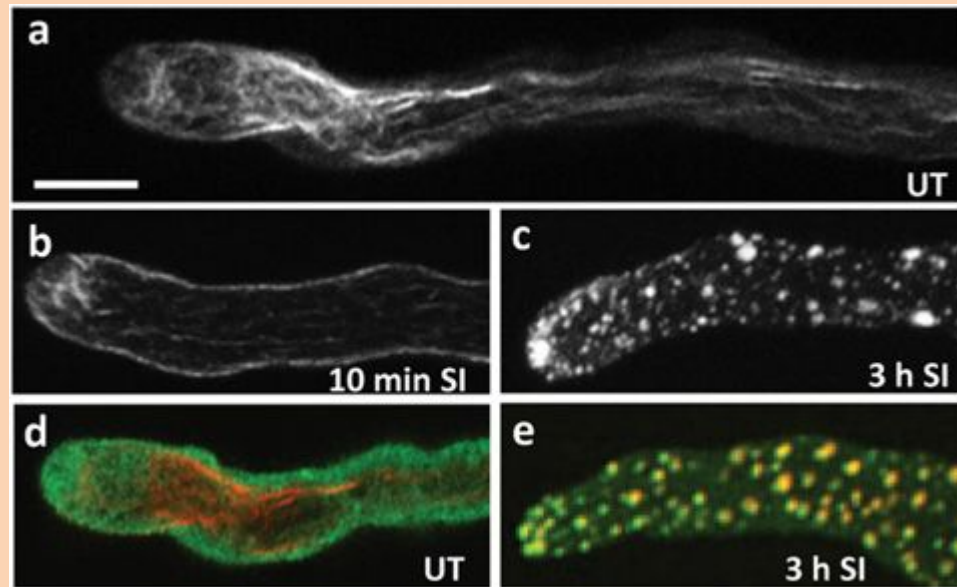


Вход калия

- На 15 лет позже был обнаружен также
- Вход калия, причем более массивный
- Происходил одновременно со входом кальция, но через другие каналы
- Оба тока в этом исследовании фиксировали методом пЭТЧ-кламп



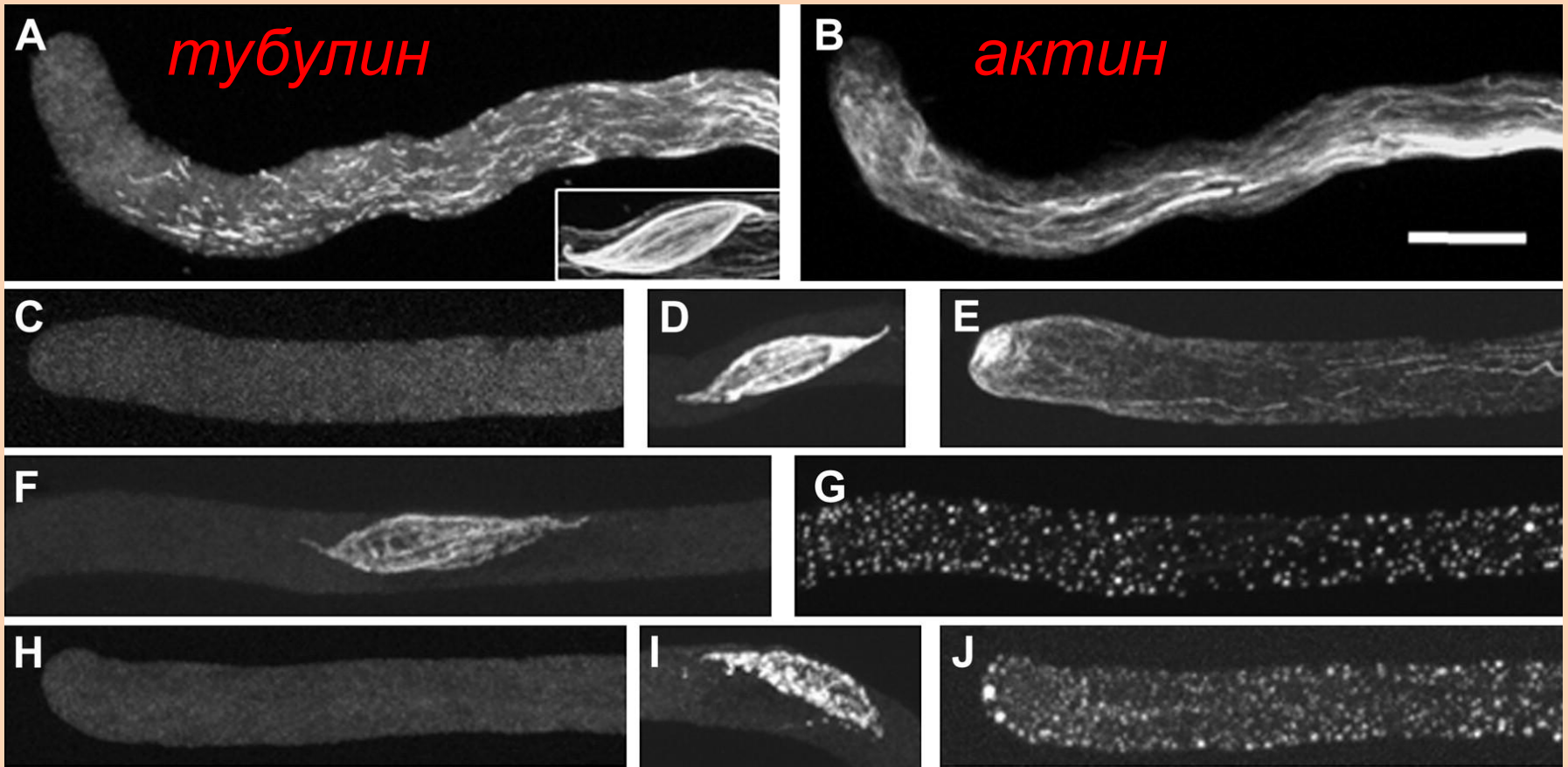
Нарушение микрофиламентов



- Уже через 10 минут нормальный актиновые филаменты разрушаются, а через 3 часа образуются «шарики» актина, которые растут со временем
- Актин-связывающий белок PrABP80 (*Paraver roeas* actin-binding protein 80), обладающий свойствами гельзолина – потенциальный посредник между кальцием и разрушением филаментов (возможно, совместно с профилином)
- Ещё два белка были локализованы в «шариках»: ADF (actin-denpolymerizing factor) и CAP (cyclase-associated protein)

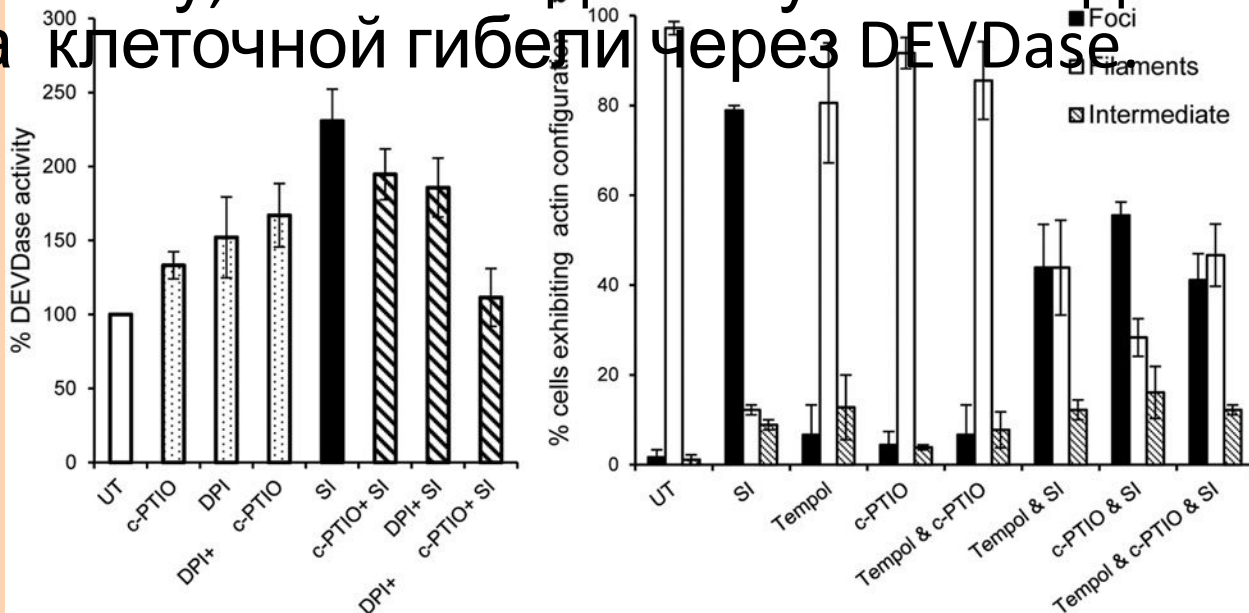
Нарушение микротрубочек

- Микротрубочки в трубке полностью разрушаются уже через 1 минуту!
- В генеративной клетке МТ остаются



АФК – ангелы смерти

- Через 5 минут после индукции СН происходит быстрое транзистентное повышение цитозольных АФК
- После этого происходит повышение NO
- Предварительная обработка ингибитором NADPH-оксидазы DPI и тушителем NO сPTIO существенно снижало активность каспазоподобного белка DEVDase. По отдельности тушители не могли справиться с этим.
- По-видимому, ROS и NO действуют в тандеме для запуска клеточной гибели через DEVDase.





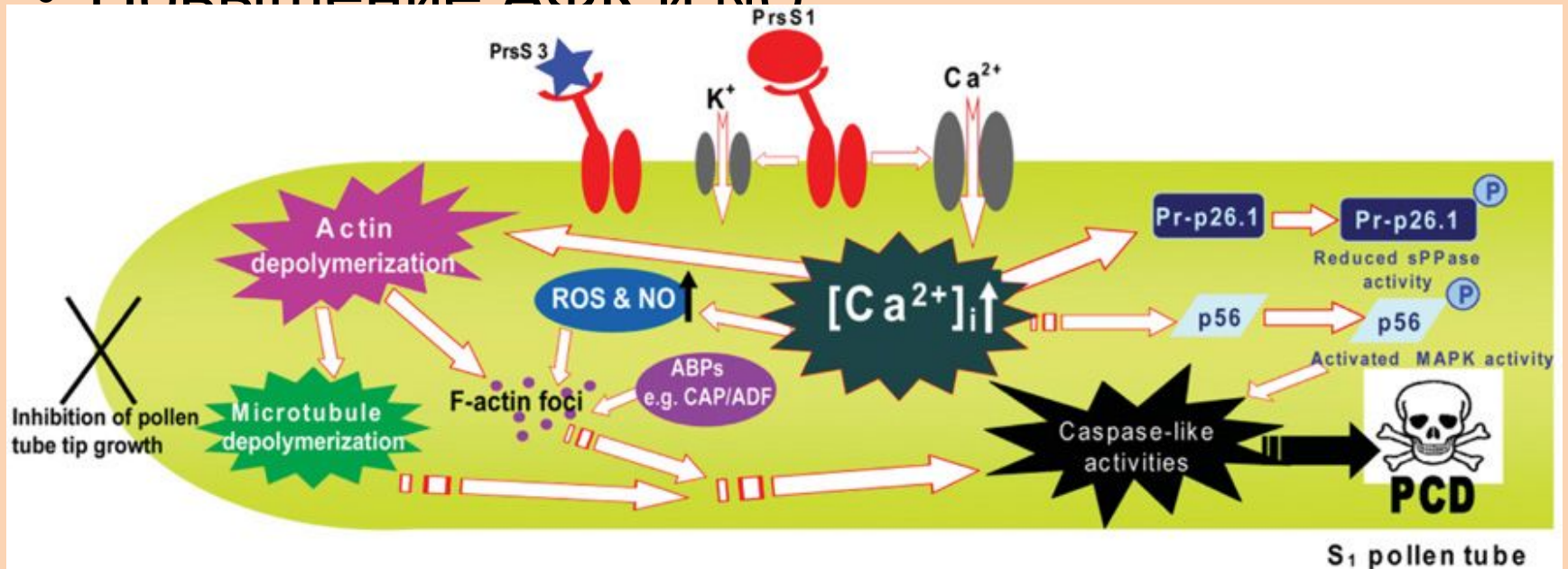
Ca²⁺

NO

ROS

Резюме по маку

- PrsS and PrpS узнают друг друга →
- Вход Ca^{2+} и сопутствующее повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$
- ЦИТ
- Ca^{2+} -зависимое фосфорилирование sPPases (soluble inorganic pyrophosphatases)
- Повышение ДФК и NO

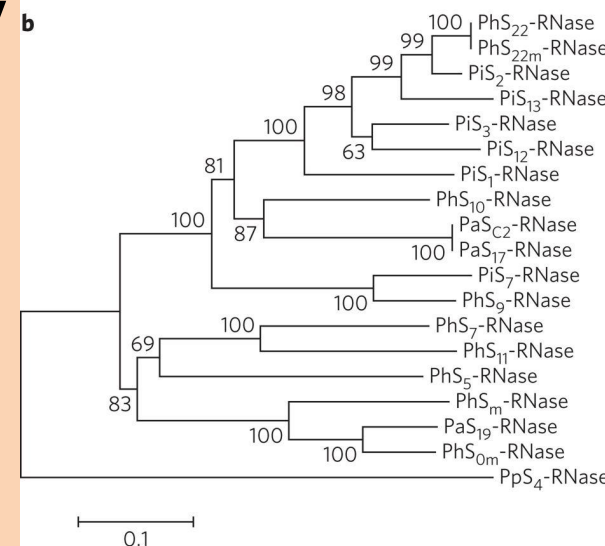
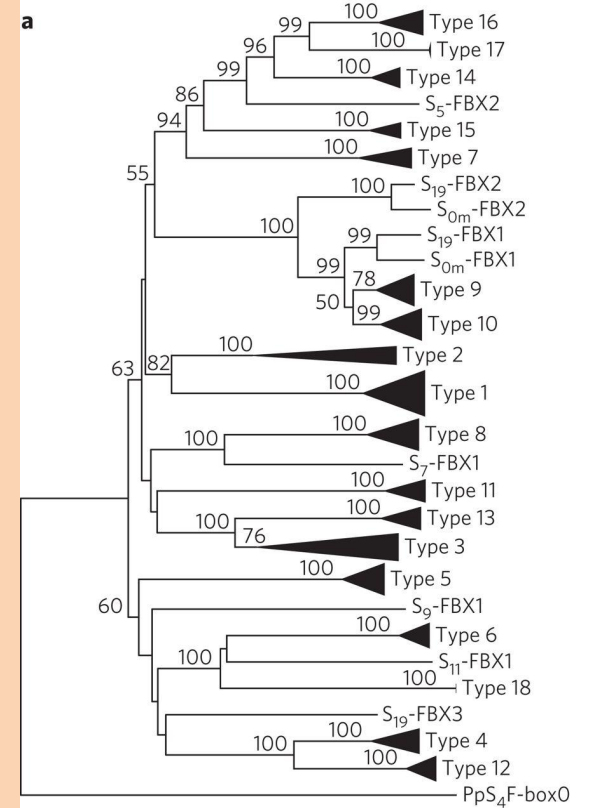


- Модификация цитоскелета: деполимеризация актиновых филаментов и образование «шариков»
- Активация MAPK (mitogen-activated protein kinase) p56
- Закисление цитозоля
- Кислый pH – оптимальный для активности каспаз
- Запуск PCD: утечка из митохондрий цитохрома c, активность каспаз и фрагментация ДНК



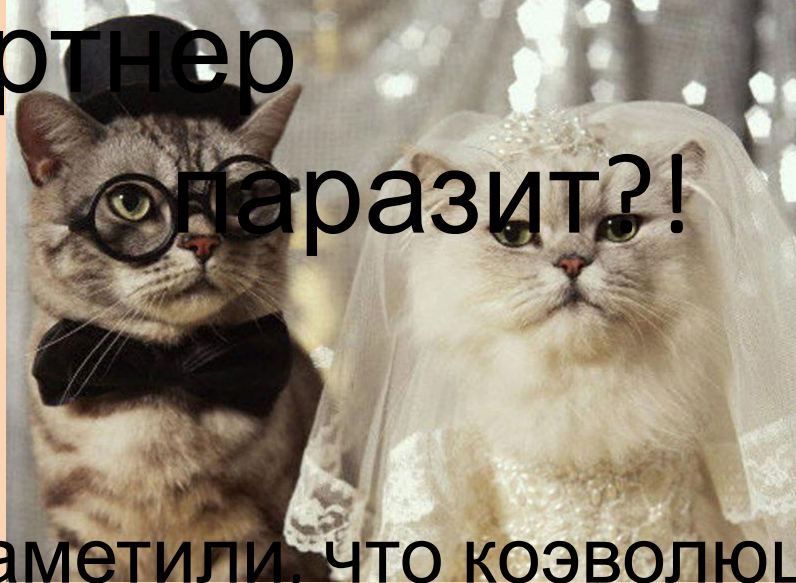
S-RNКазная СН

- Широко распространена
- Ген женской детерминанты *S-RNase* кодирует РНКазу
- Многочисленные генетические детерминанты с мужской стороны: *S-locus F-box (SLF)*
- 32 *S*-гаплотипов было обнаружено у петунии.
- SLF входит в класс E3 убиквитин лигаз, включенный в деградацию белков в 26S протеасоме



Партнер

или



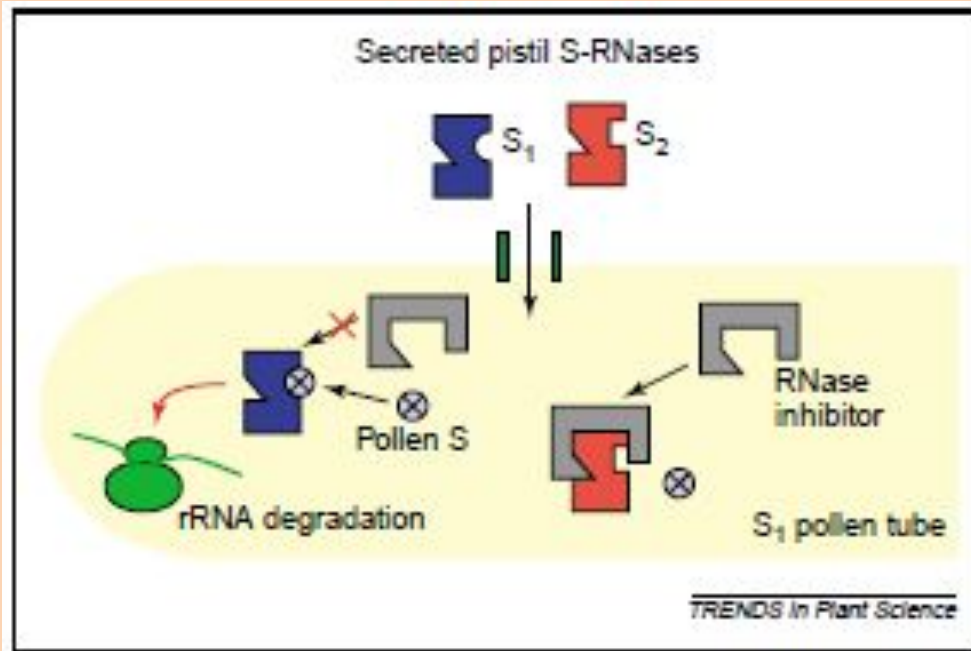
- Ученые заметили, что коэволюция женских и мужских детерминант идёт разными путями (у пасленовых).
- Если разнообразие мужских детерминант ведёт к \uparrow числа партнеров и \uparrow шансов на потомство (они могут распознать и обезвредить большее число РНКаз), то разнообразие женских (больше разных (РНКаз) – к противоположному эффекту
- Этот паттерн больше похож на модель «паразит – защита» или «болезнь – иммунитет», чем на другие модели

Каков же паттерн?

- S_x -РНКаза является мишенью для SLFn если S_x -аллель *SLFn* изменён или удалён.
- Этот упрощённый подход очень полезен для поиска S-РНКаз-мишеней для каждого типа SLF.

Так думали раньше...

- Считали, что транспорт S-РНКаз в трубку специфичный, и «несвой» просто не заходят
- Но оказалось, что заходят любые, и «решение» принимается внутри

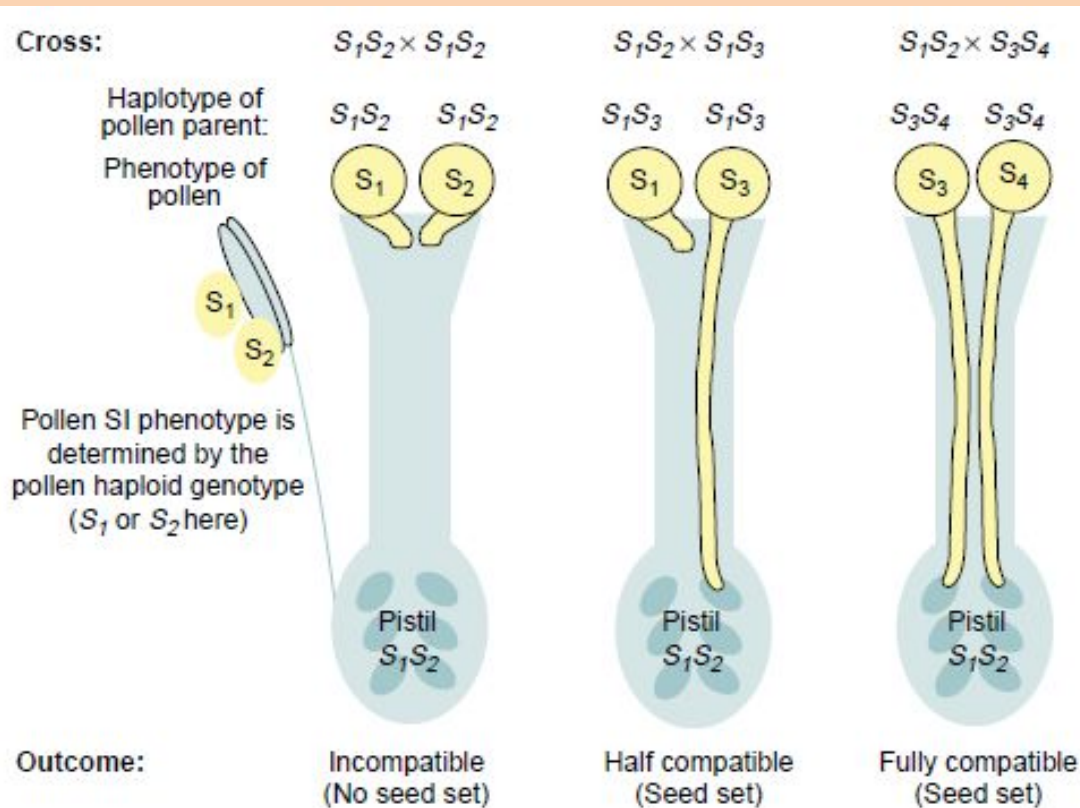


S-RNКаза

- S-RNКаза синтезируется в проводниковом тракте , пока пыльцевые трубки растут через столбик.
- Трубки поглощают все имеющиеся типы RNКаз: «свою», то есть ту, которая является продуктом того S-гаплотипа, который несёт пыльца, и «чужую».
- «своя» RNКаза не разлагается и ингибирует рост пыльцевой трубки (обычно в верхней трети столбика).
- Диплоидный пестик несёт 2 гаплотипа, каждый из которых продуцирует аллельный вариант S-RNКазы.

S-РНКаза (продолжение)

- Этот фермент деградирует рРНК в самонесовместимой пыльце
- При потере РНКазной активности СН не работа

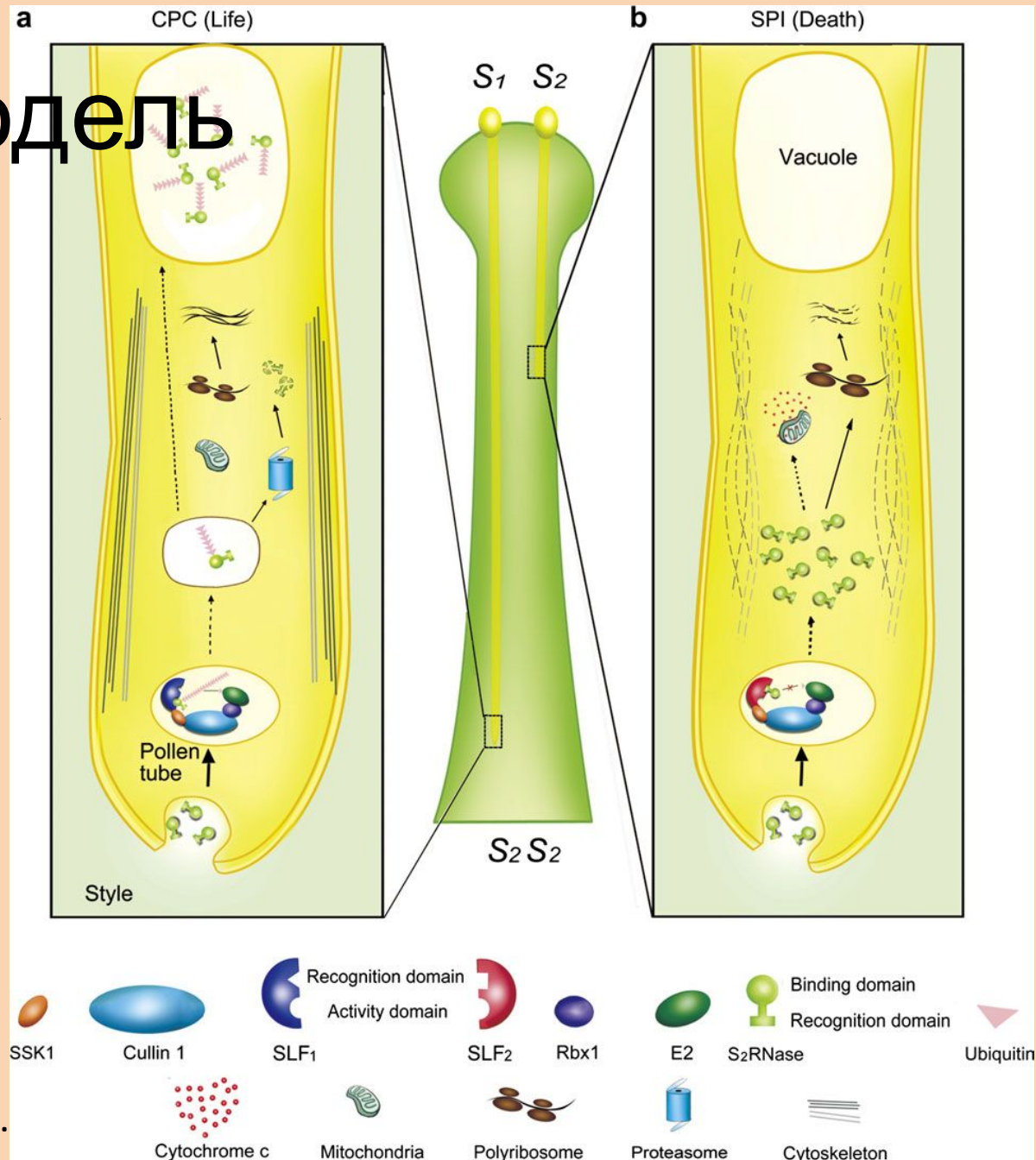


Более ранние модели

- Предполагали, что узнается своя РНКазы и не деградирует, а начинает своё чёрное дело
- В этом случае чужие РНКазы «не узнаются» и деградируют
- Однако, в последние 5 лет на смену этой модели пришла другая, более «абсурдная»

Старая модель

- Чужие SРНКазы «не узнаются» и отправляются на деградацию в протеасому
- Своя SРНКаза узнаётся рецептором SLF (S-locus F-box) в цитоплазме трубки и начинает работать

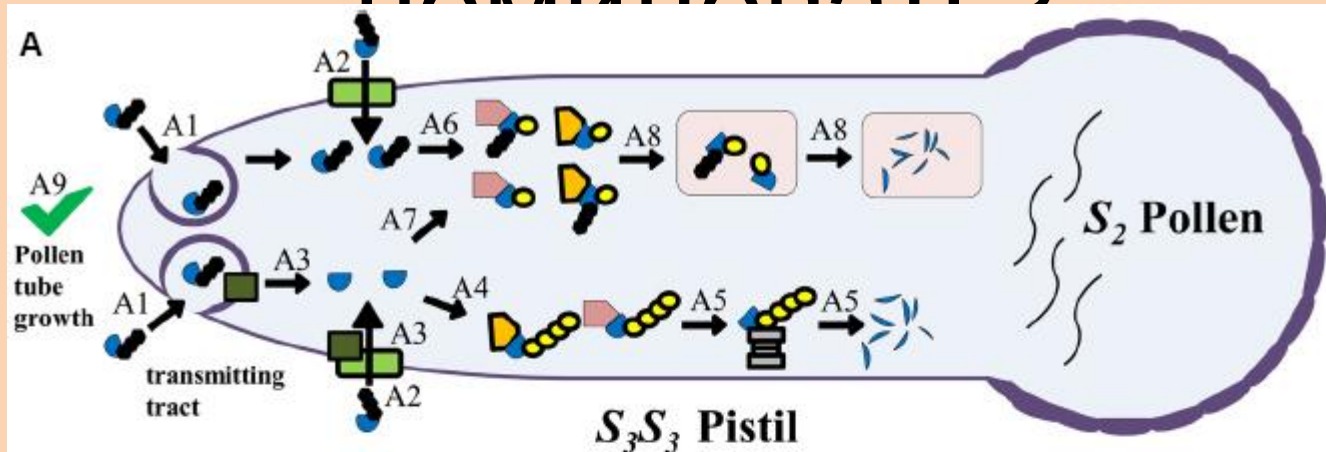


Новая модель: *коллективное узнавание*

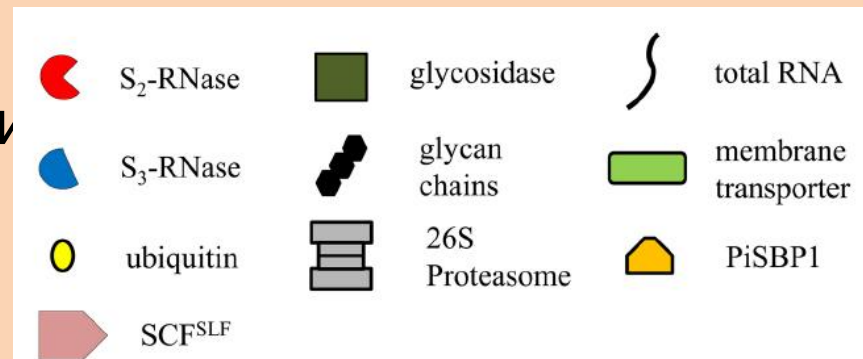
- Многочисленные SLF белки, которые производит пыльца данного S-гаплотипа, вместе узнают и дезактивируют все non-self S-РНКазы
- Каждая отдельная детерминанта SLF может взаимодействовать с ограниченным набором non-self S-РНКаз
- Ни одна из них не может взаимодействовать со «своей»

Резюме по петунии:

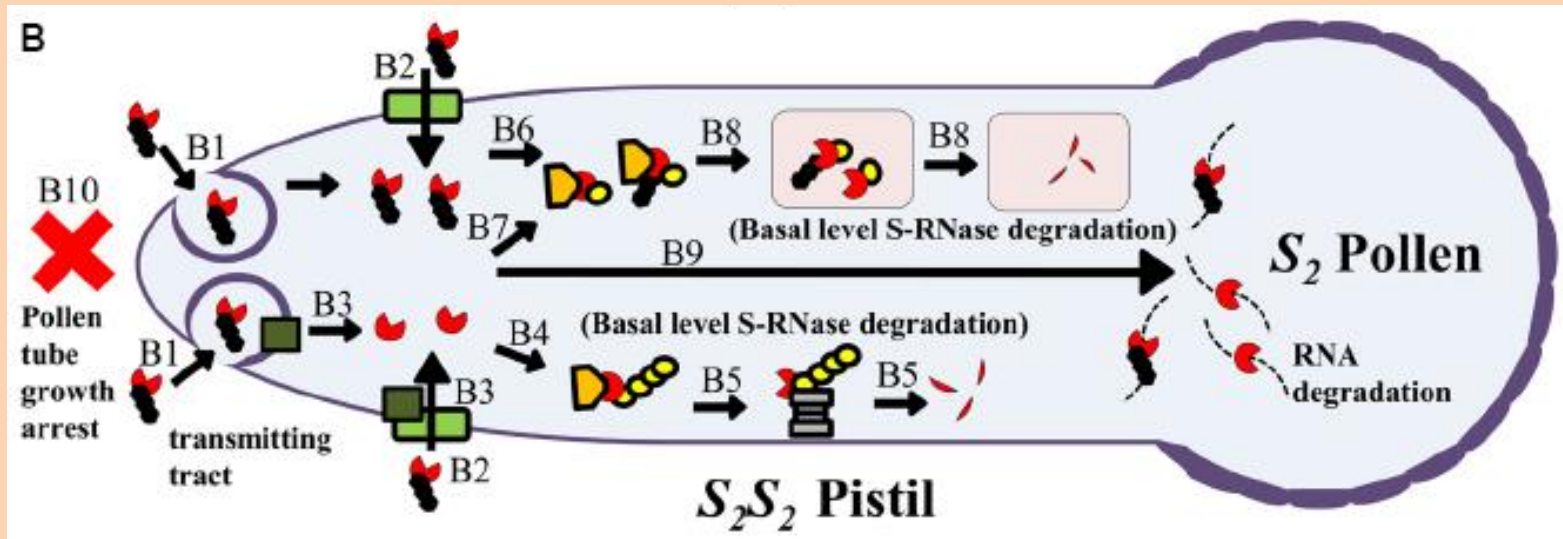
ПОМИДОВОТЫ?



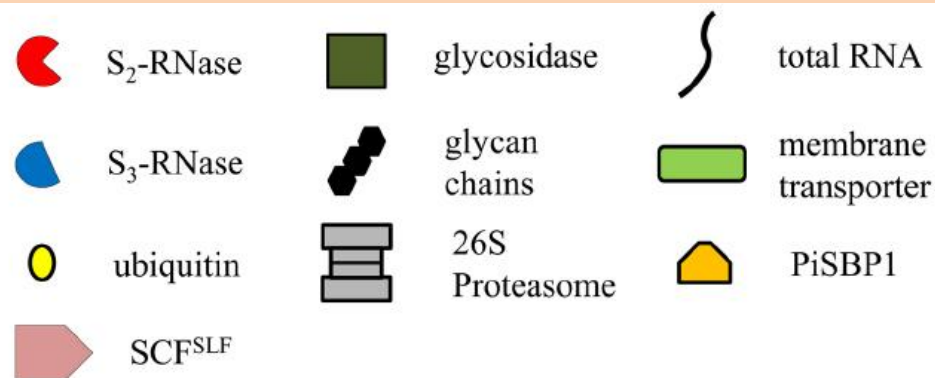
- Представлены два возможных механизма узнавания и деградации «чужих» РНКаз
- В любом случае первый процесс: вход (эндоцитозом или через мембрану)
- Параллельный процесс – дегликозилирование (необязательно)
- Далее узнавание и деградация



Резюме по петунии: казнить?

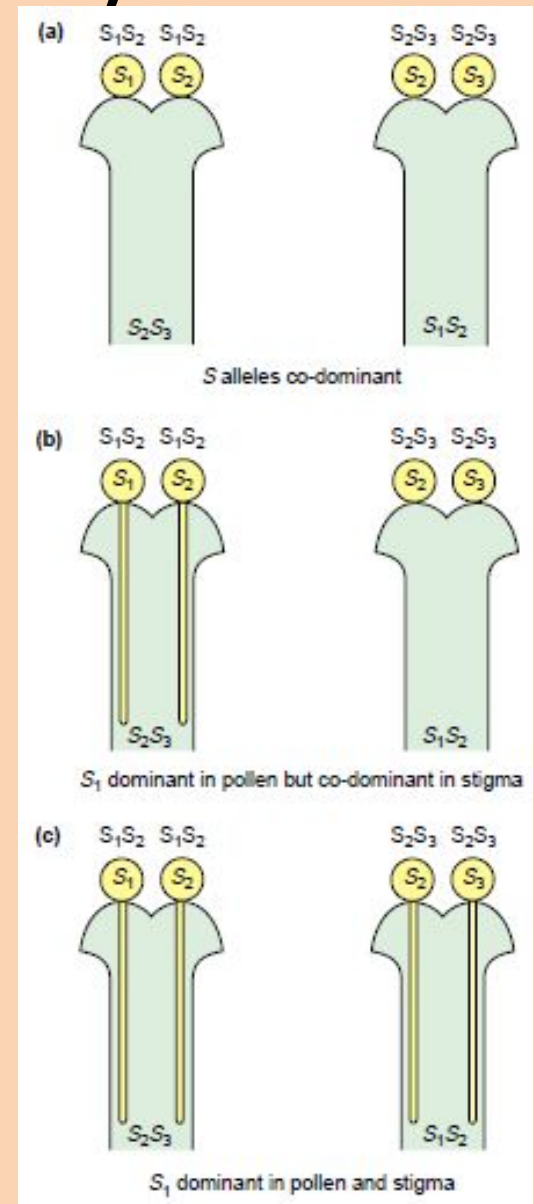


- Своя РНКаза также входит в трубку двумя возможными путями и дегликозилируется
- тоже немножко деградирует, но в отсутствии узнавания белка остается еще достаточно, чтобы всё порушить



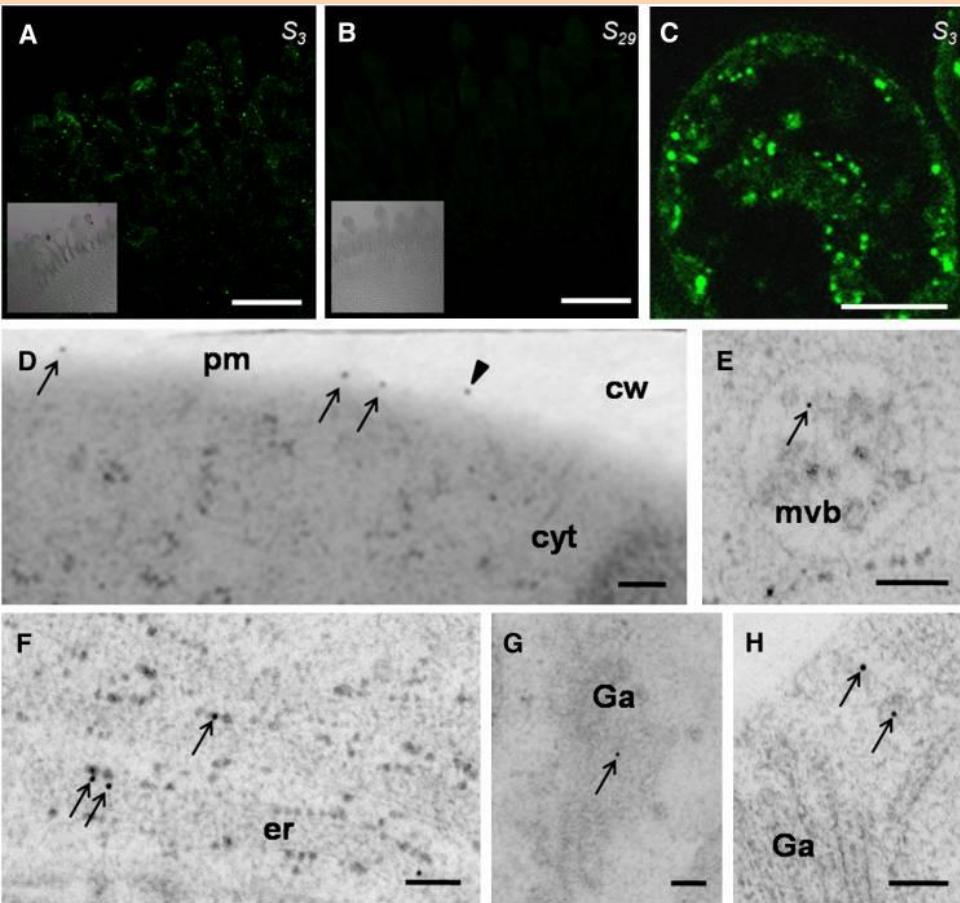
Спорофитная СН (крестоцветные)

- Меняемся ролями:
мужской пептид – лиганд,
женский – рецептор
- У капусты *S*-локус очень
сложный, включает 17
генов. Естественно,
высокий полиморфизм.
- Женская детерминанта –
SRK (*S*-receptor kinase)
экспрессируется в
папиллах рыльца
- *S*-домен (вариабельный)
торчит в межклеточное
пространство



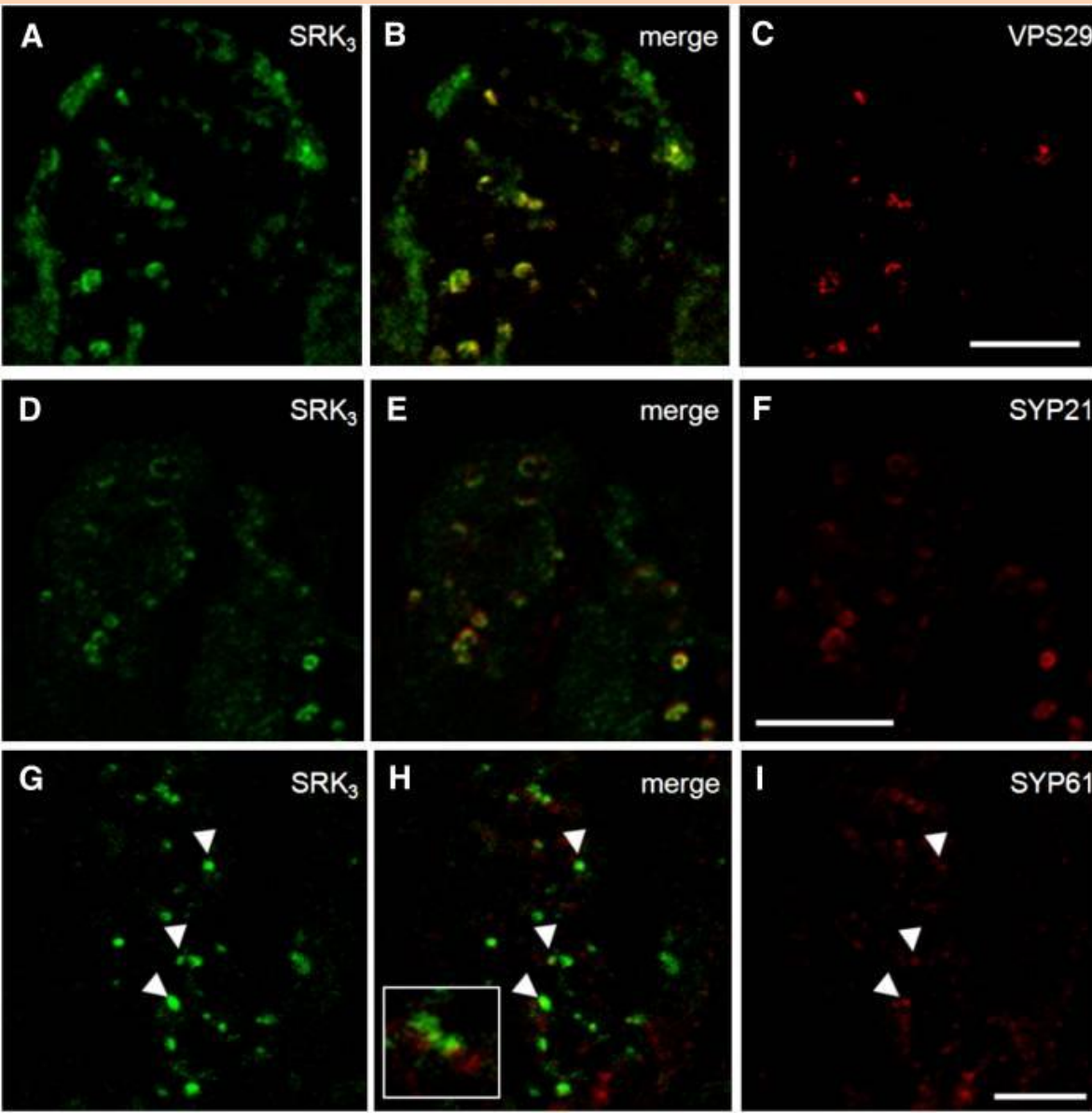
- Мужская детерминанта – SCR/SPP (S-locus cystein-rich protein, S-locus pollen protein)
- Полиморфизм мужской детерминанты выше
- Она экспрессируется в тапетуме и встраивается в трифину (pollen coat)
- Также в S-локусе присутствует SLG (S-locus glycoprotein) – секретлируемый гликопротеин рыльца.
- Он помогает, но не является обязательным.
- Возможно, стабилизирует/активирует накопление киназы

Субклеточная локализация SRK



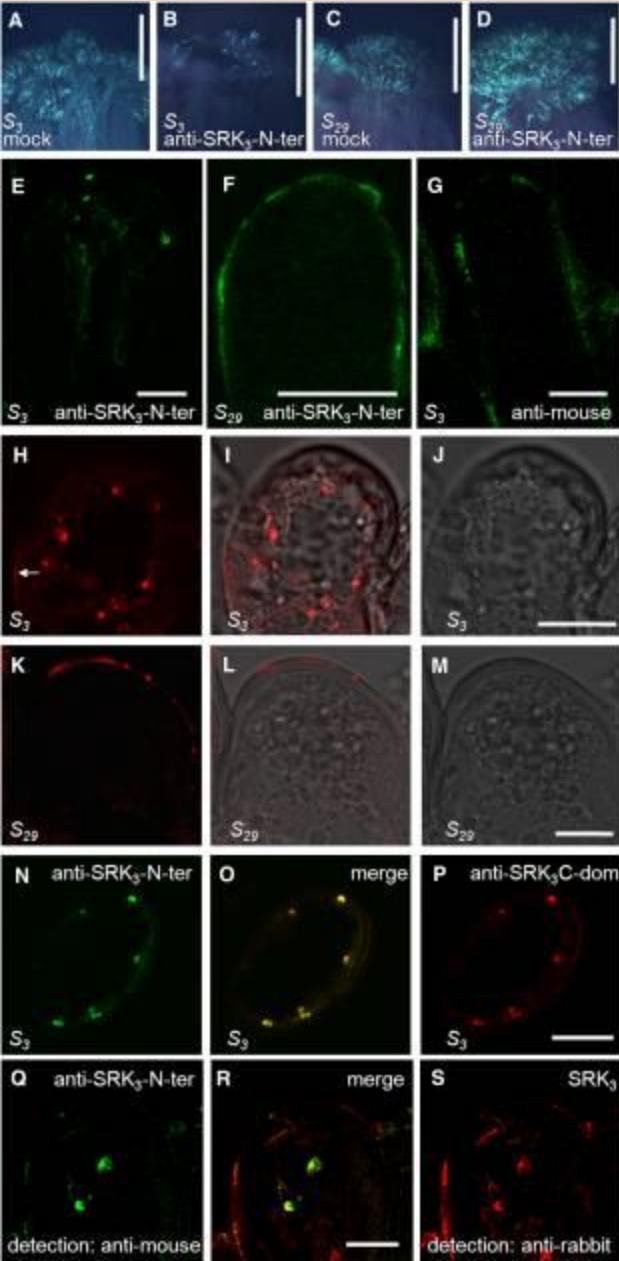
- SRK обнаружены в плазмалемме и эндосомах у капусты
- Присутствует на ПМ
- В цитоплазме локализуется как в МВТ, так и в ЭПР, Гольджи и везикулах около АГ

Колокализация с эндосомой



- Использовали 2 маркера эндосом, оба показали, что SRK находится там
- Для сравнения: транс-Гольджи

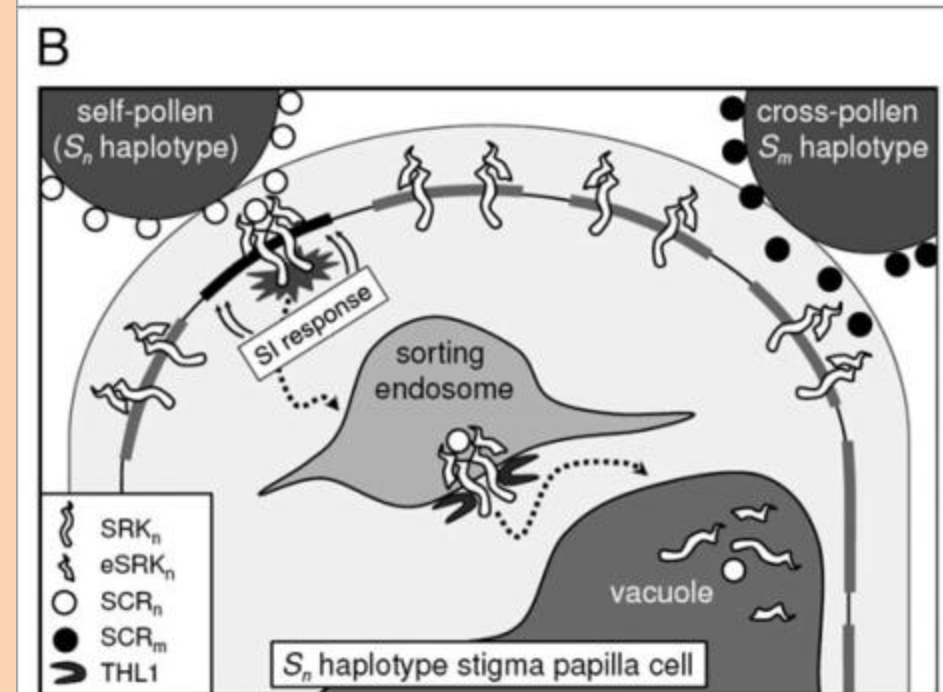
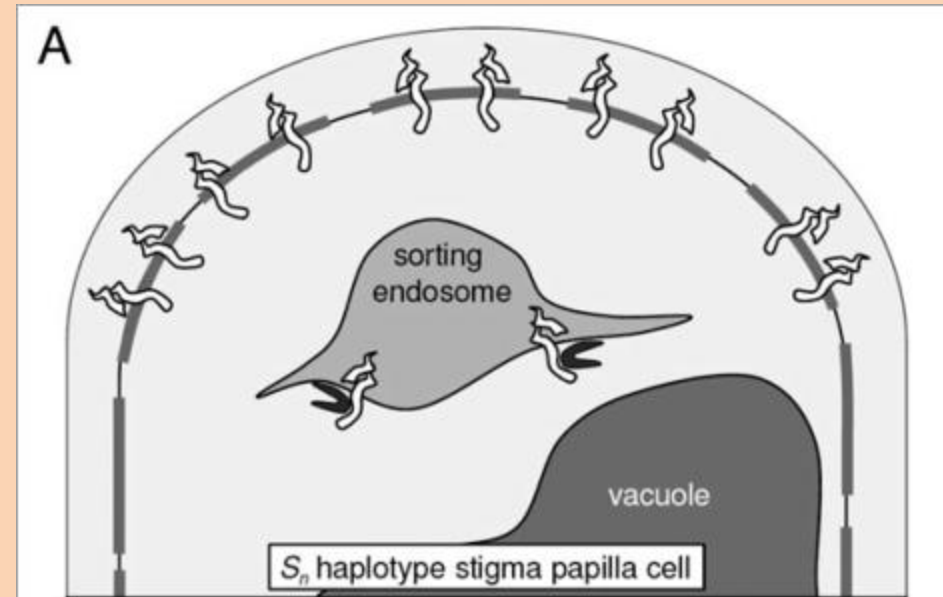
Интернализация SRK



- Как может быть, что одна сторона клетки отвергает «неудобную» пыльцу, а на другой может примоститься «фаворитка», если ответ осуществляется целой клеткой?
- Исследуя субклеточную локализацию до и в момент ответа, обнаружили, что
- В момент встречи с несовместимой пыльцой происходит быстрая интернализация SRK₃
- Используя антитела к SRK₃ в качестве лиганда, обнаружили, что после встречи с лигандом происходит интернализация

SRK И ЭНДОСОМЫ

- Клетка папиллы рыльца в ожидании пыльцы: SRK концентрируется в мембране, а в эндосоме находится в неактивном состоянии, ингибированная THL1
- При встрече с СН пыльцой происходит фосфорилирование SRK – такие комплексы интернализируются и деградируют
- Это локальная реакция! К той же клетке может с другой стороны прижаться совместимая пылинка



Резюме по капусте



- После интернелизации ARC1 взаимодействует с киназным доменом SRK и может провоцировать убиквитинирование белков рыльца
- Повышается внутриклеточный кальций
- Экзоцитоз блокируется
- Не выделяются и/или уничтожаются белки рыльца, которые должны поддерживать рост трубки
- Никто никого не поддерживает..



кормит и не

- СН и совместимые зерна могут лежать совсем рядом; разница между ними будет заметна уже через 10-20 минут