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…

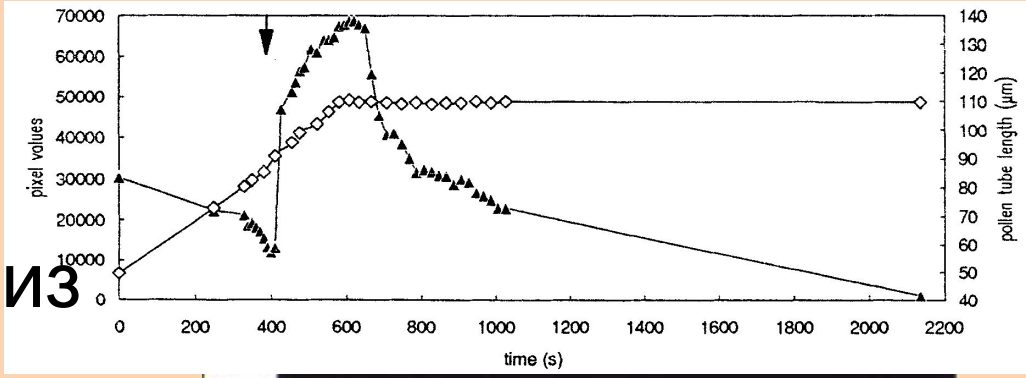
Гаметофитная SI у мака

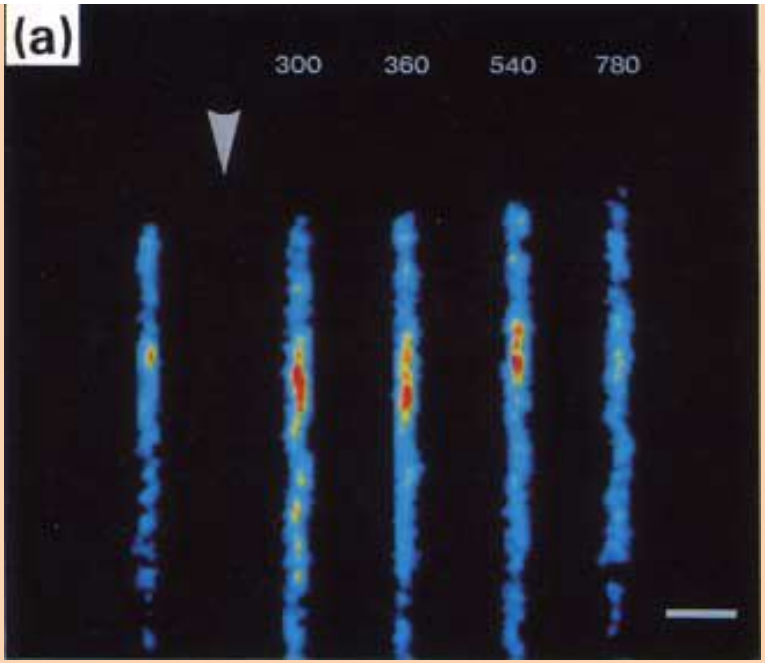
Две *S*-детерминанты *S*-локуса мака уже достаточно хорошо изучены:

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

Вход кальция

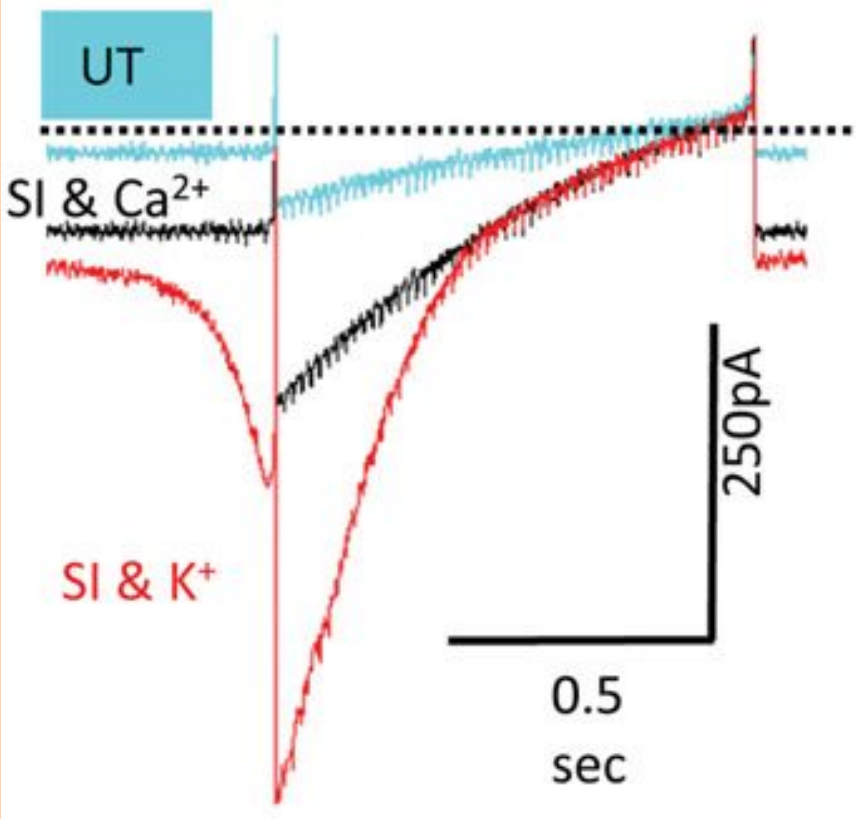
- **При СН ответе активируются катионные каналы**
- Это наиболее ранний из зарегистрированных ответов СН трубок
- $[Ca^{2+}]_{цит}$, повышается почти мгновенно, однако максимум не в кончике, а в области ядра!
- Пик кальция совпадает по времени с остановкой роста



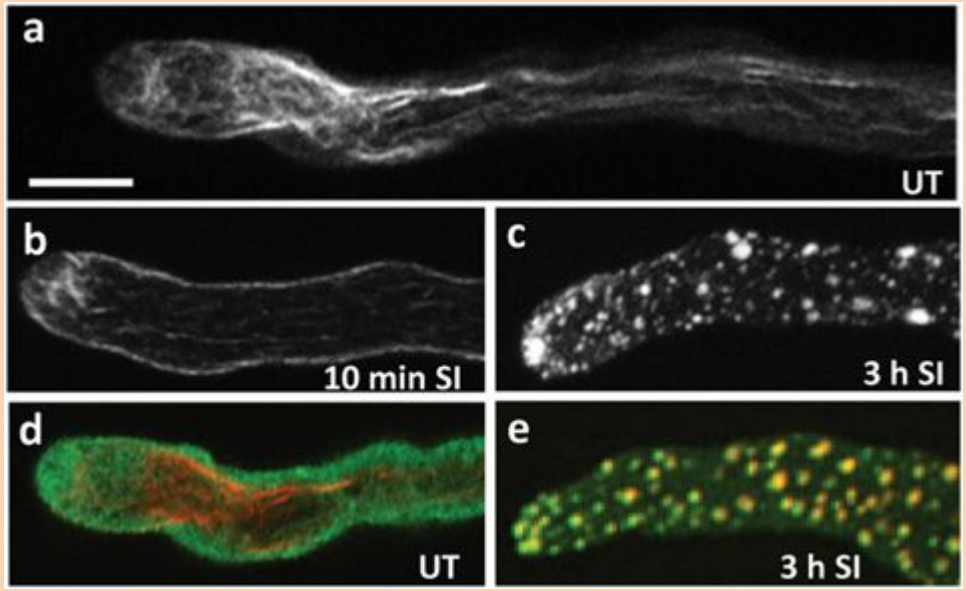


Вход калия

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



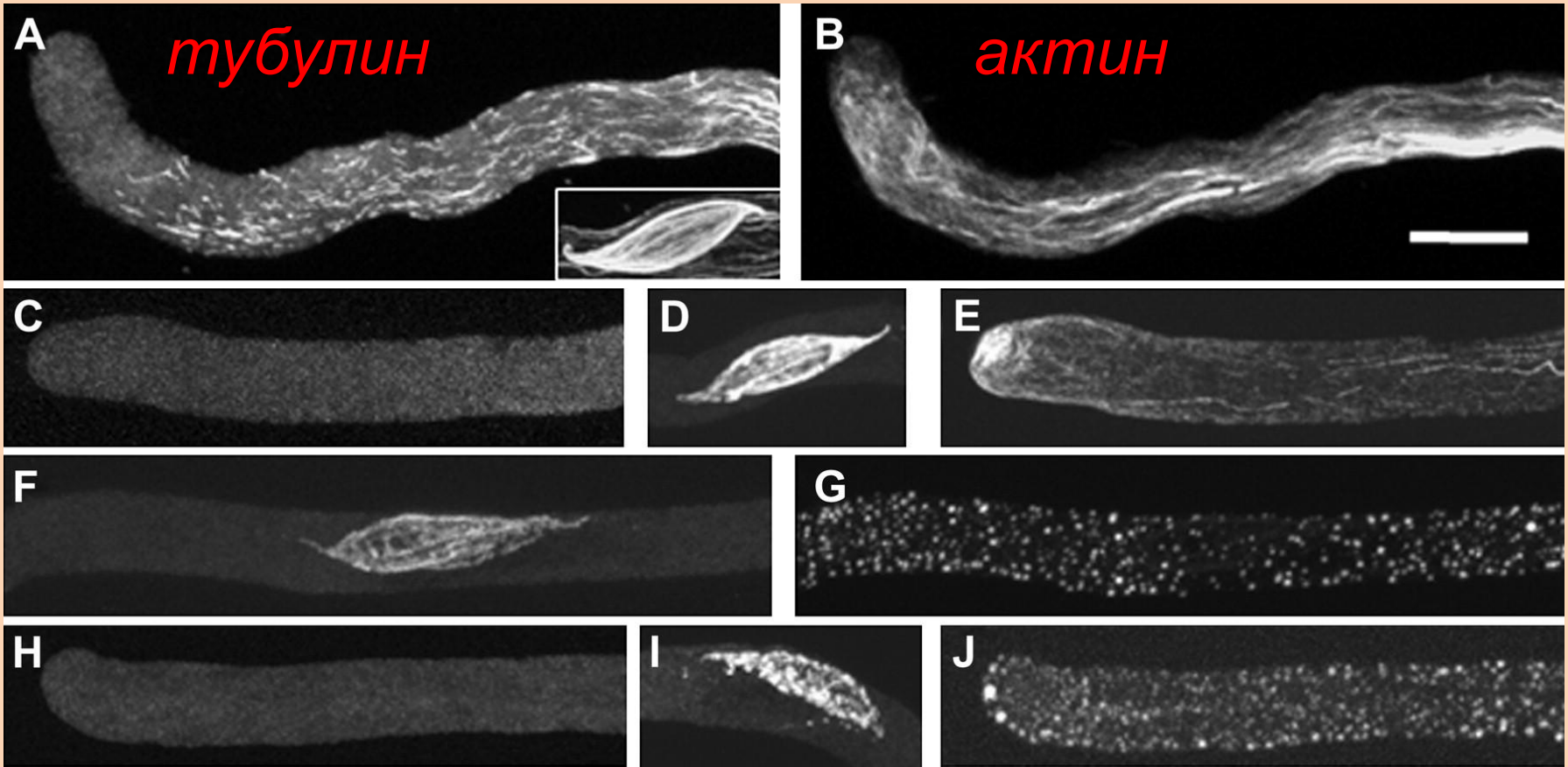
Нарушение микрофиламентов



- Уже через 10 минут нормальный актиновые филаменты разрушаются, а через 3 часа образуются «шарики» актина, которые растут со временем
- Актин-связывающий белок PrABP80 (*Papaver rhoeas 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-depolymerizing factor) и CAP (cyclase-associated protein)

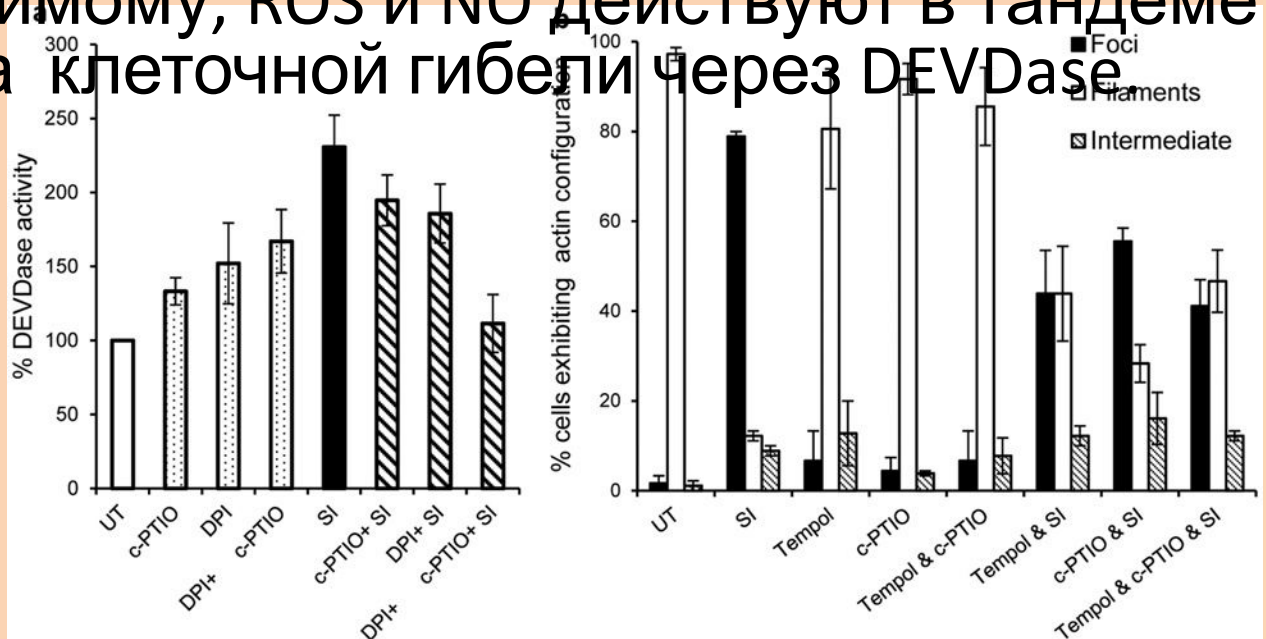
Нарушение микротрубочек

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



АФК – ангелы смерти

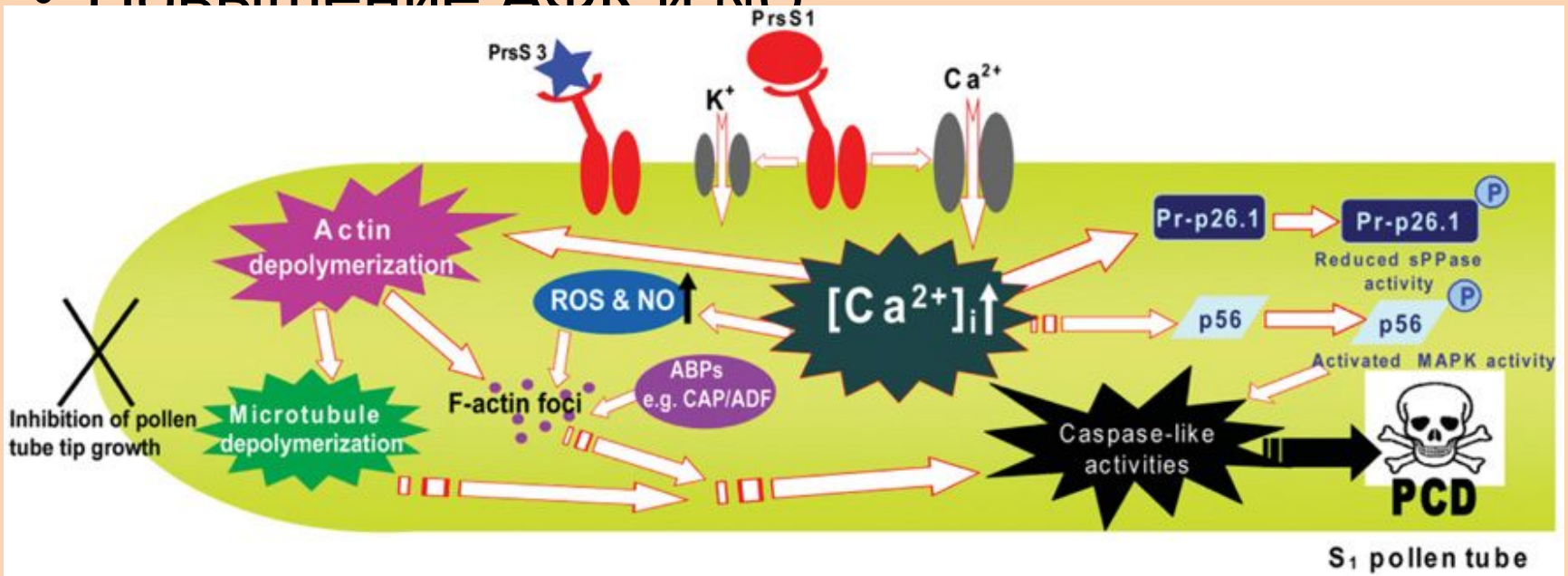
- Через 5 минут после индукции СН происходит быстрое транзиентное повышение цитозольных АФК
- После этого происходит повышение NO
- Предварительная обработка ингибитором NADPH-оксидазы DPI и тушителем NO cPTIOсущественно снижало активность каспазоподобного белка DEVDase. По отдельности тушители не могли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



Ca^{2+}
NO
ROS

Резюме по маку

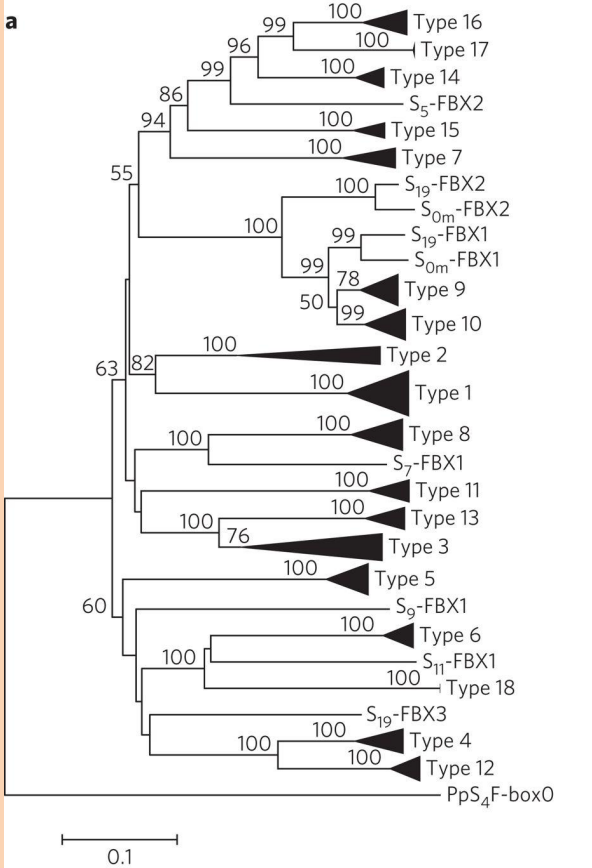
- **PrsS and PrpS узнают друг друга →**
- Вход Ca^{2+} и сопутствующее повышение $[Ca^{2+}]_{цит}$
- Ca^{2+} -зависимое фосфорилирование sPPases (soluble inorganic pyrophosphatases)
- Повышение АФК и NO

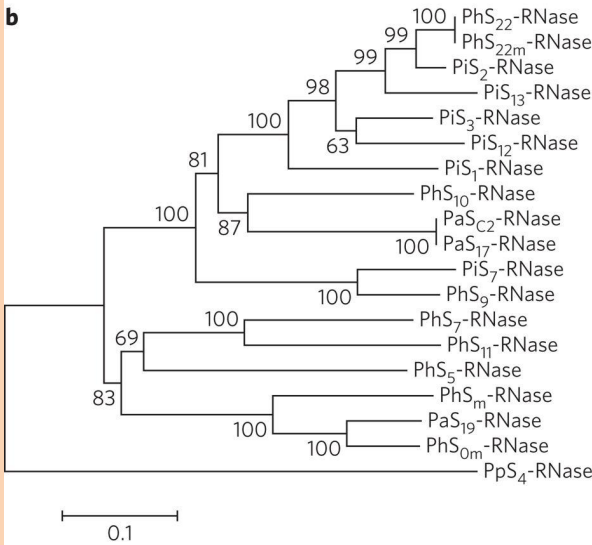


- Модификация цитоскелета: деполимеризация актиновых филаментов и образование «шариков»
- Активация MAPK (mitogen-activated protein kinase) p56
- Закисление цитозоля
- Кислый pH – оптимальный для активности каспаз
- Запуск PCD: утечка из митохондрий цитохрома *c*, активность каспаз и фрагментация ДНК

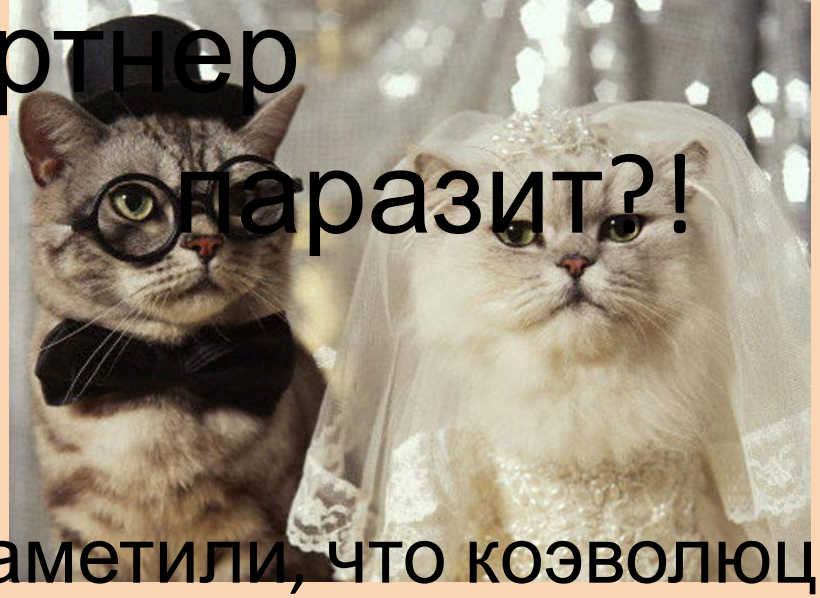
S-РНКазная СН

- 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 паразит?!



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

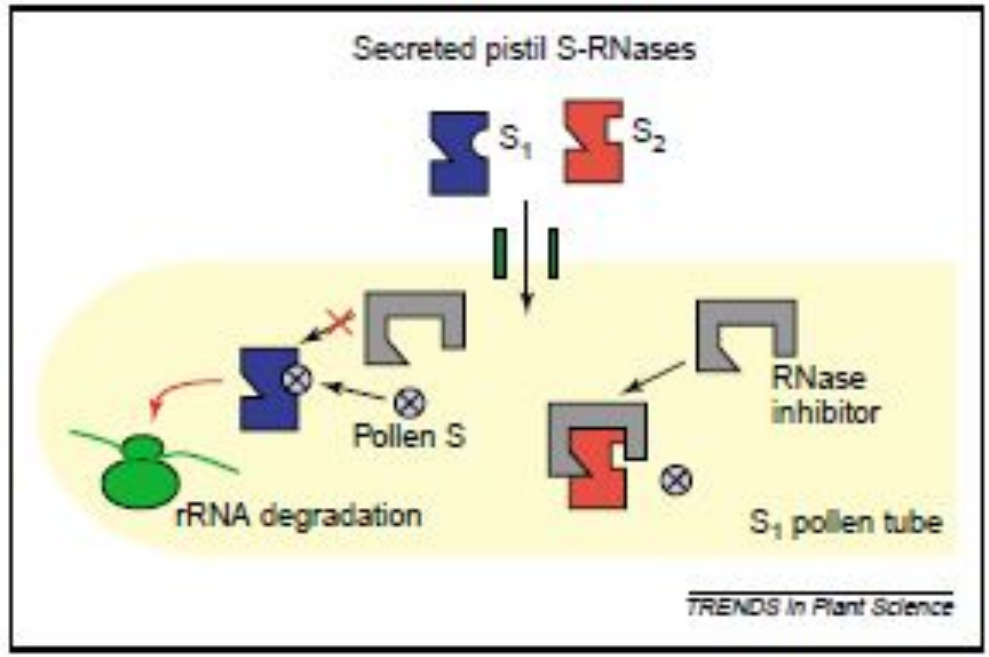
Каков же паттерн?

- 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.

Kubo et al., 2015. Nature plants 1

Так думали раньше…

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

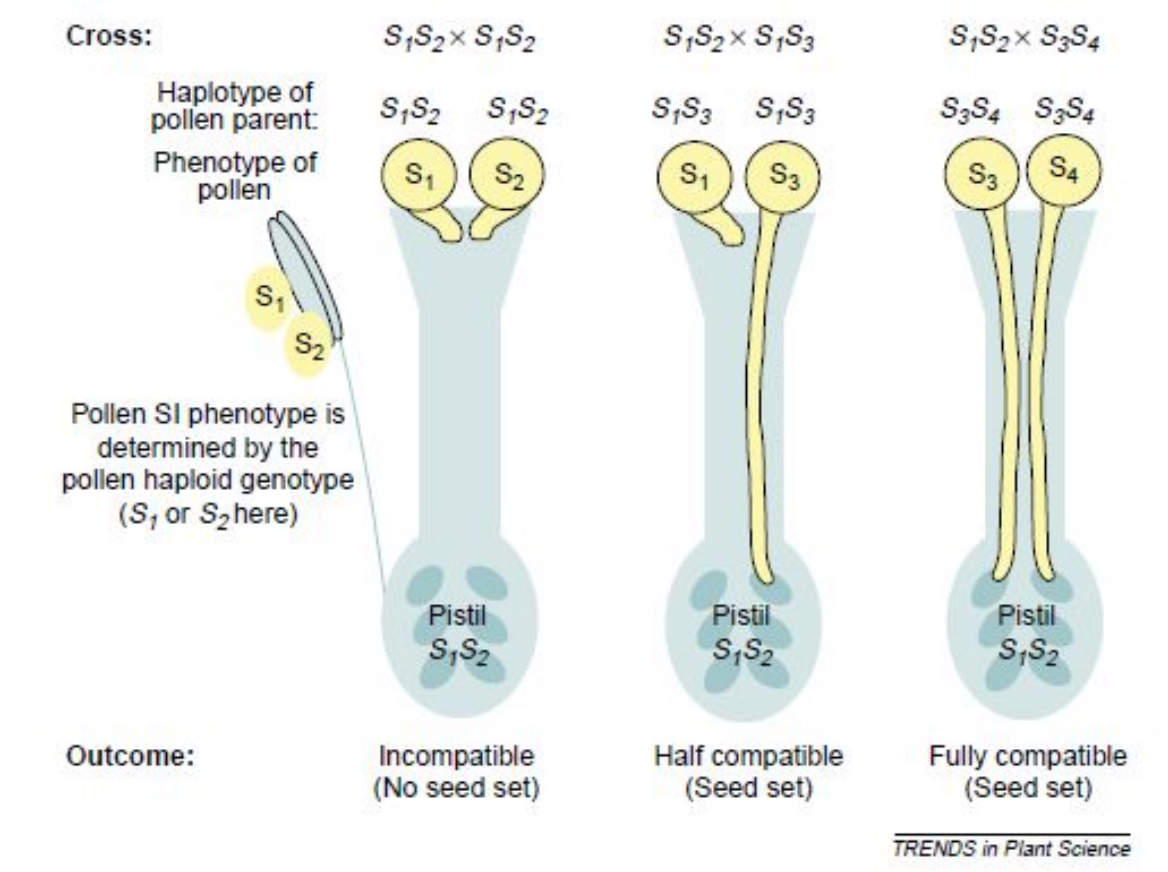


S-РНКаза

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

S-РНКаза (продолжение)

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

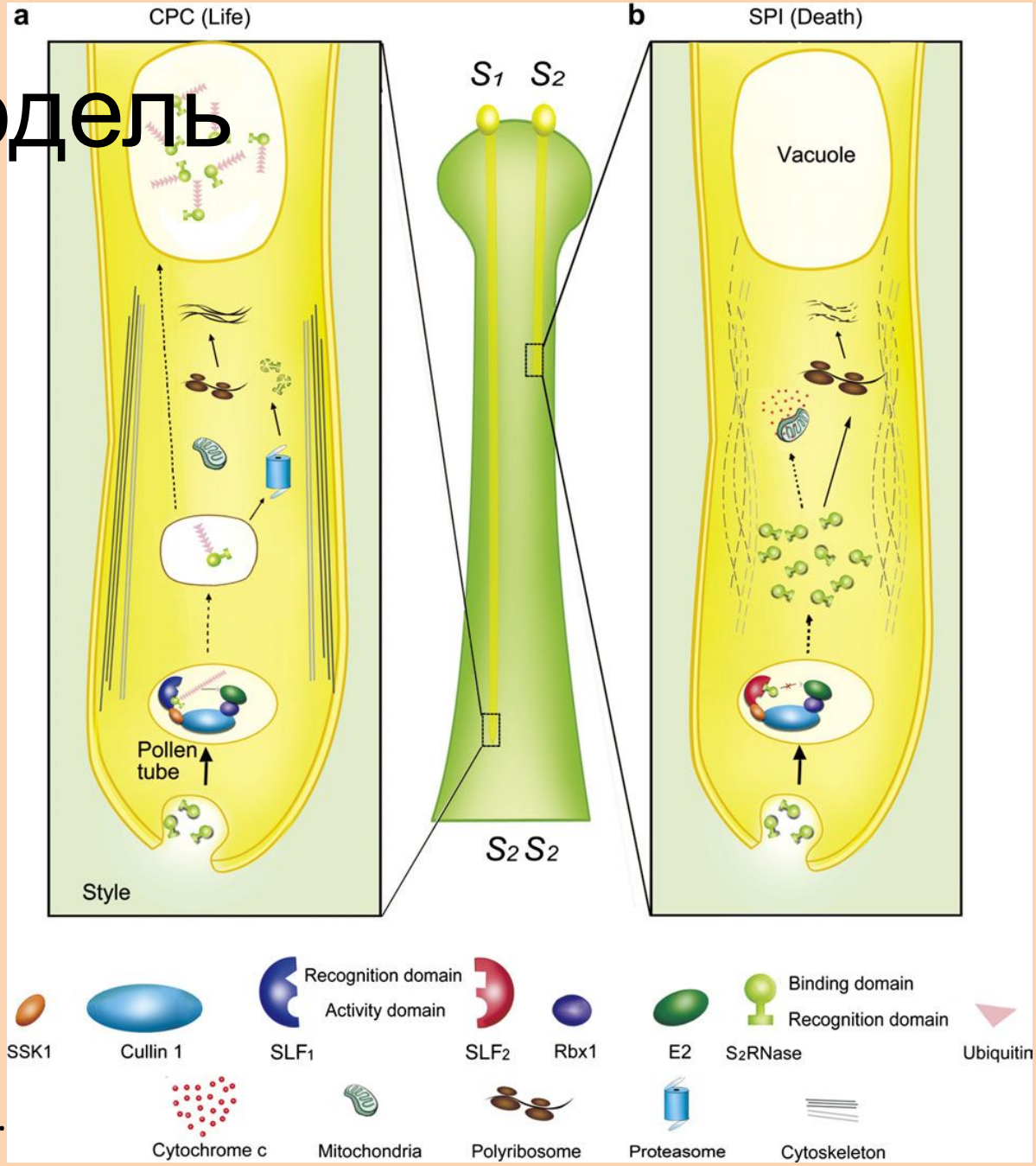


Более ранние модели

- Предполагали, что узнается своя РНКаза 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 SPHКазы «не узнаются» и отправляются на деградацию в протеасому
- Своя SPHКаза узнаётся рецептором SLF (S-locus F-box) в цитоплазме трубки и начинает работать

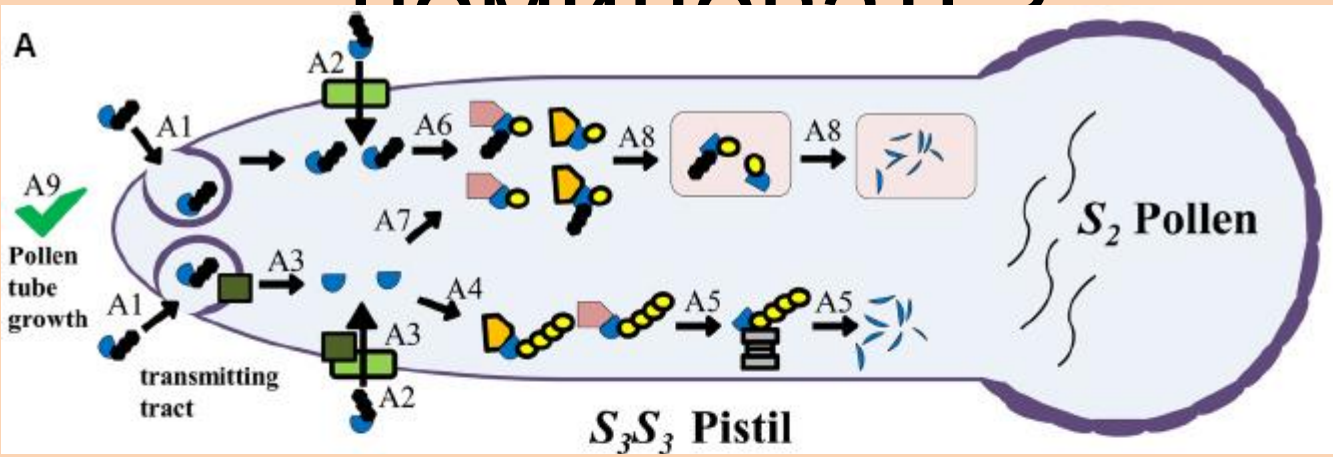


Journal of Experimental Botany, Vol. 61, No. 7, pp. 2027–2037, 2010

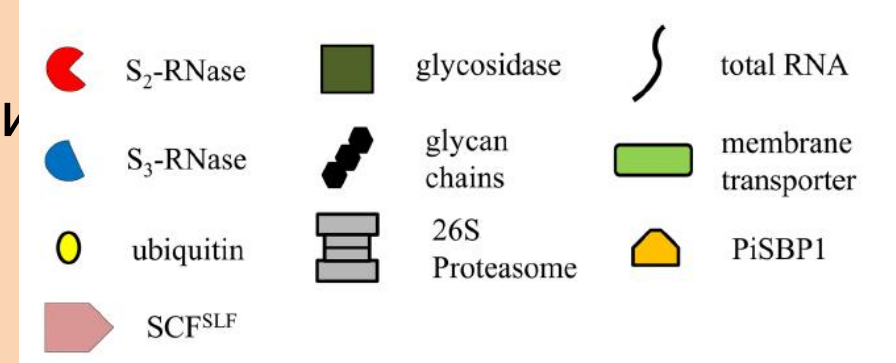
Новая модель: *коллективное узнавание*

- 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»

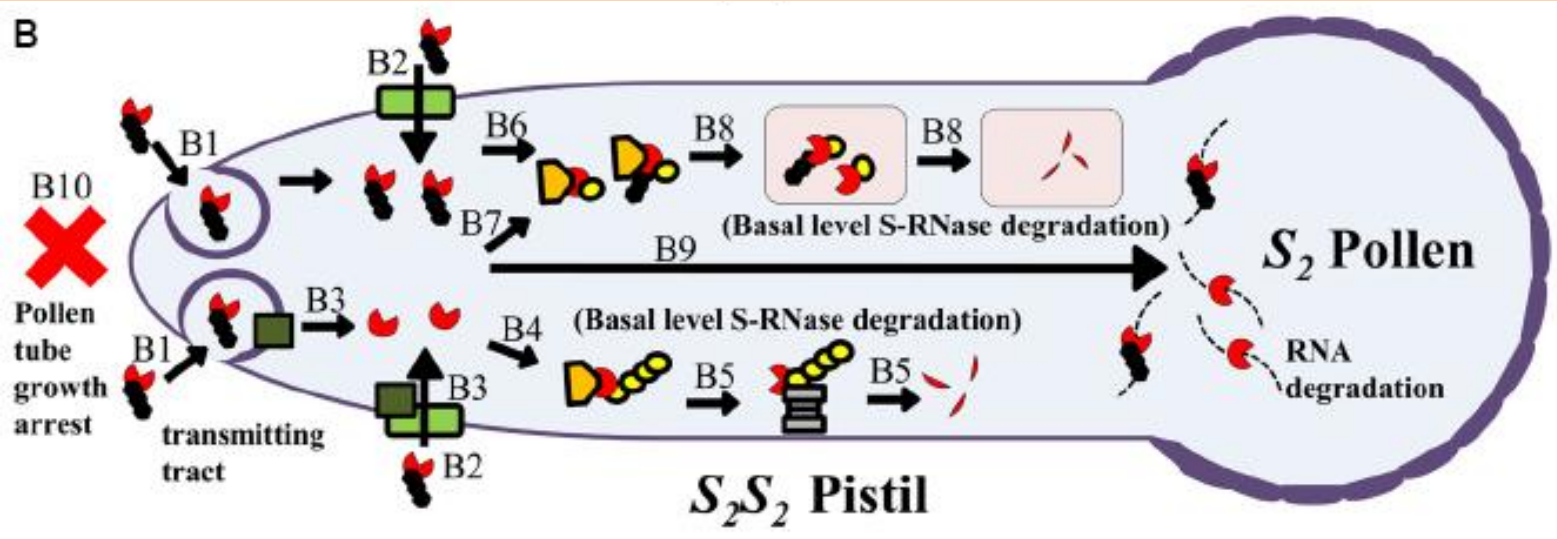
Резюме по петунии: помиловать ?



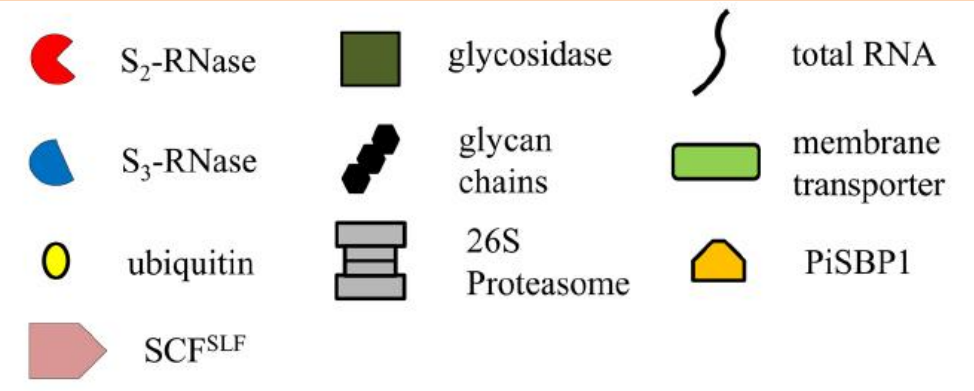
- Представлены два возможных механизма узнавания и деградации «чужих» РНКаз
- В любом случае первый процесс: вход (эндоцитозом или через мембрану)
- Параллельный процесс – дегликозилирование (необязательно)
- Далее узнавание и деградаци



Резюме по петунии: казнить?

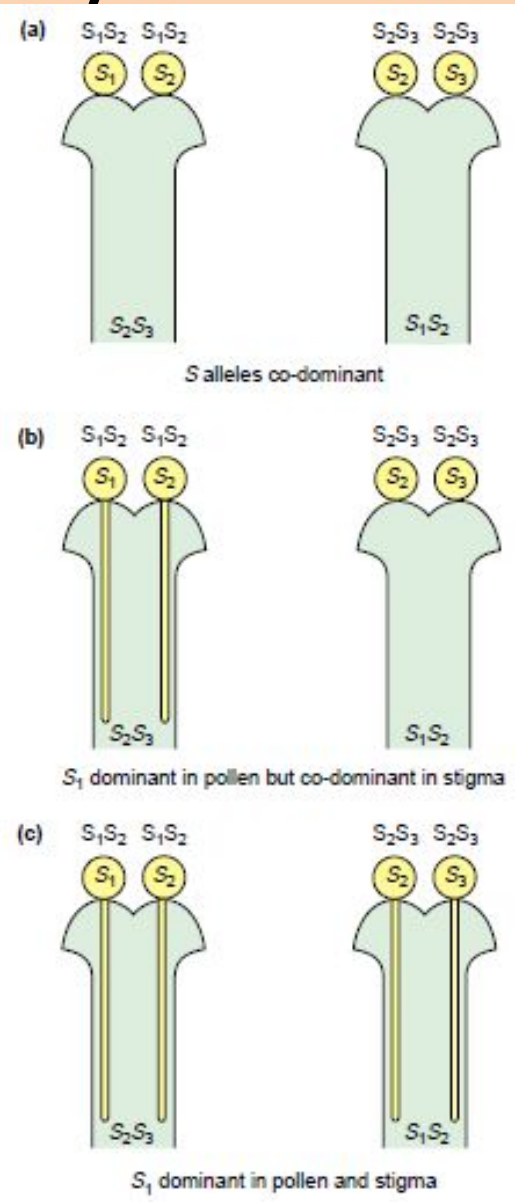


- Своя РНКаза также входит в трубку двумя возможными путями и дегликозилируется
- тоже немножко деградирует, но в отсутствии узнавания белка остается еще достаточно, чтобы всё порушить



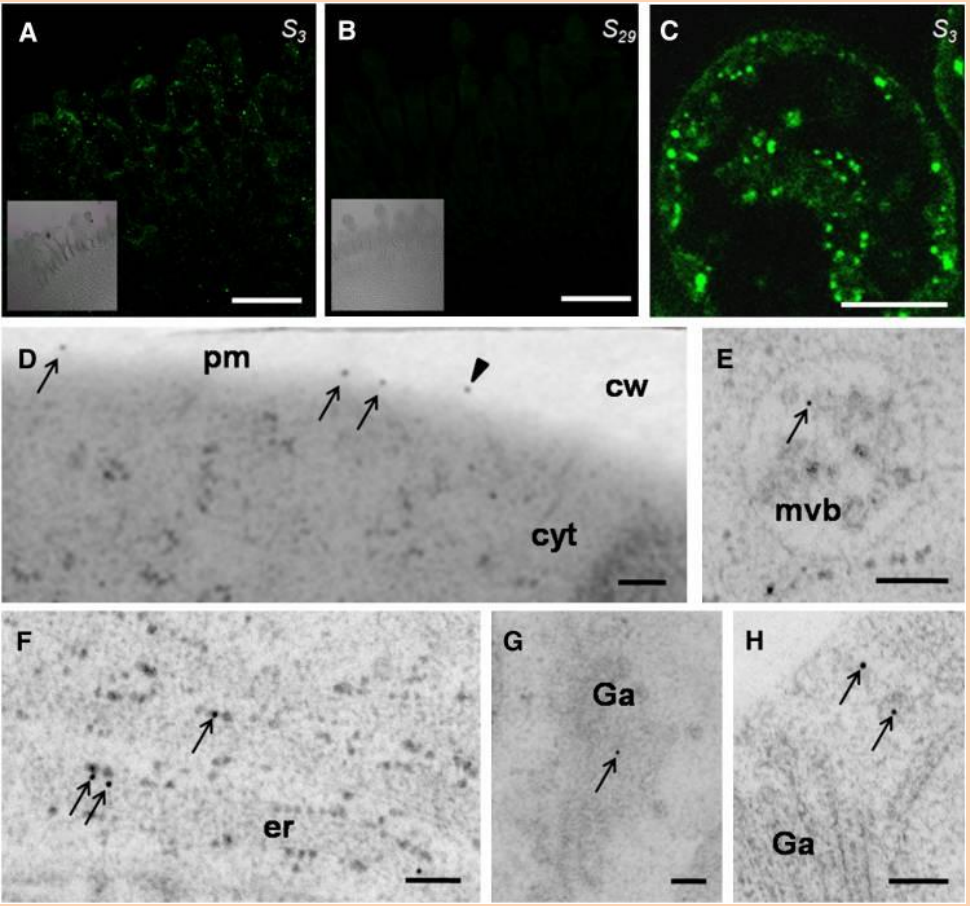
Спорофитная СН (крестоцветные)

- Меняемся ролями: мужской пепитид – 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



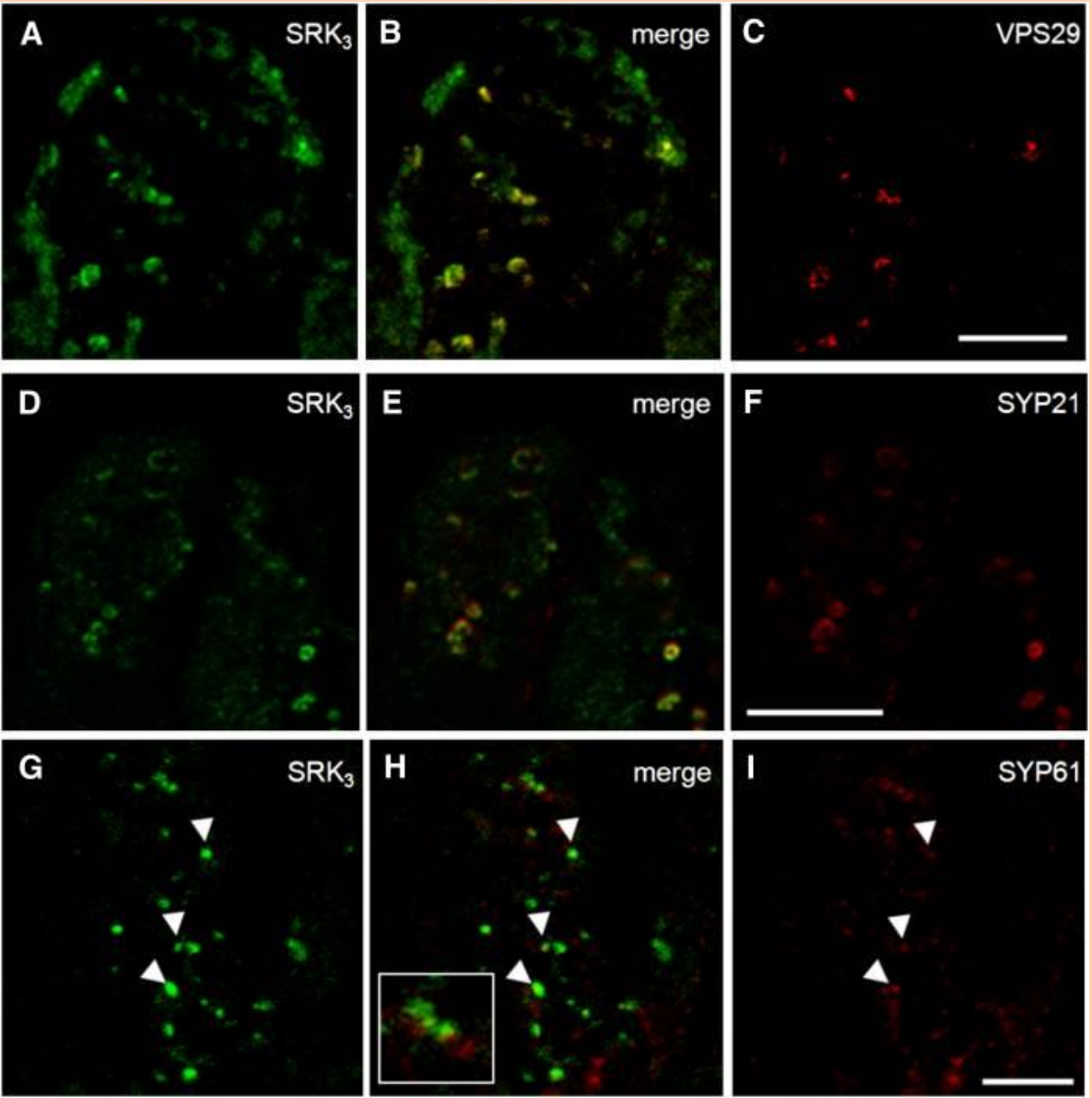
- Мужская детерминанта – SCR/SPP (S-locus cystein-rich protein, S-locus pollen protein)
- Полиморфизм мужской детерминанты выше
- Она экспрессируется в тапетуме и встраивается в трифину (pollen coat)
- Также в S-локусе присутствует SLG (S-locus glycoprotein) – секретируемый гликопротеин рыльца.
- Он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

Субклеточная локализация SRK



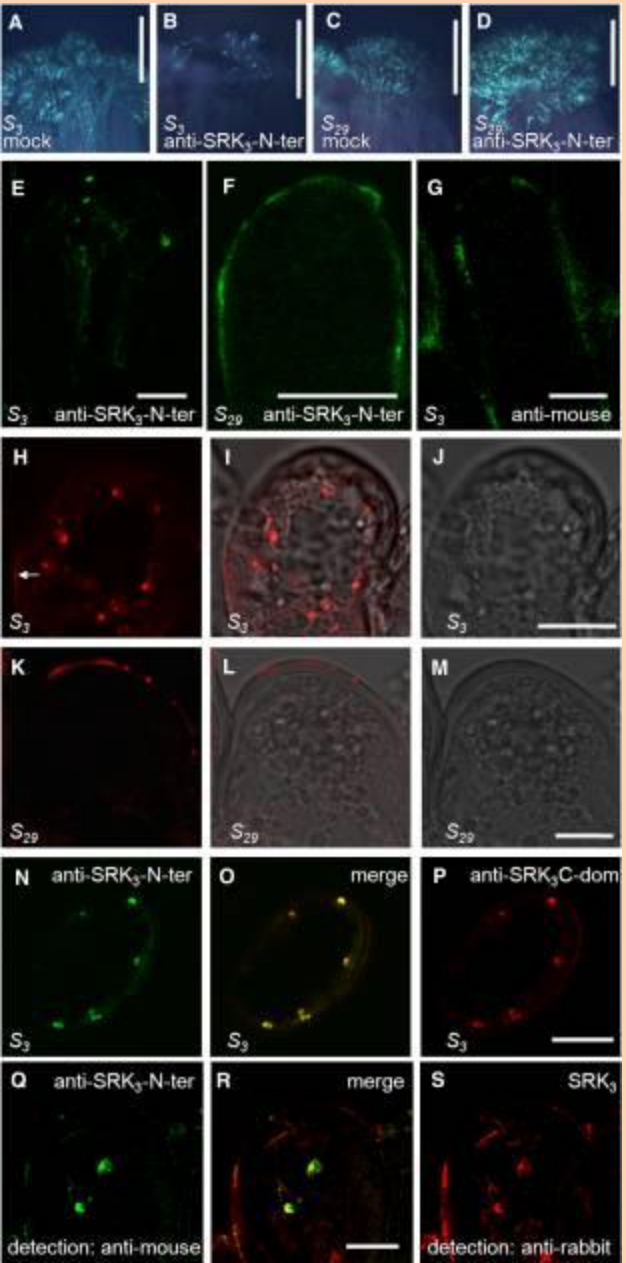
- SRK обнаружены в плазмалемме и эндосомах у капусты
- Присутствует на ПМ
- В цитоплазме локализуется как в МВТ, так и в ЭПР, Гольджи и везикулах около АГ

Колокализация с эндосомой



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

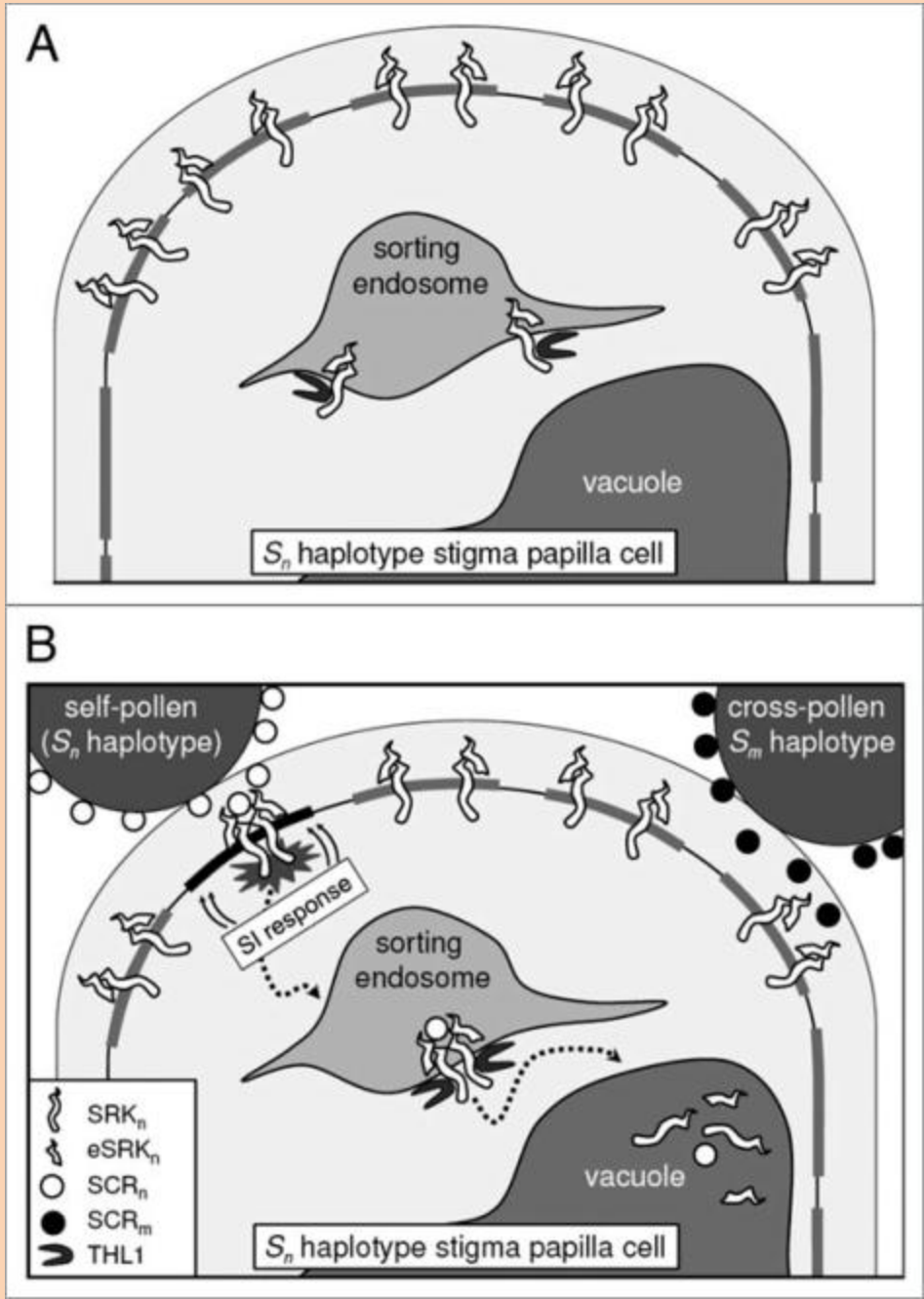
Интернализация SRK



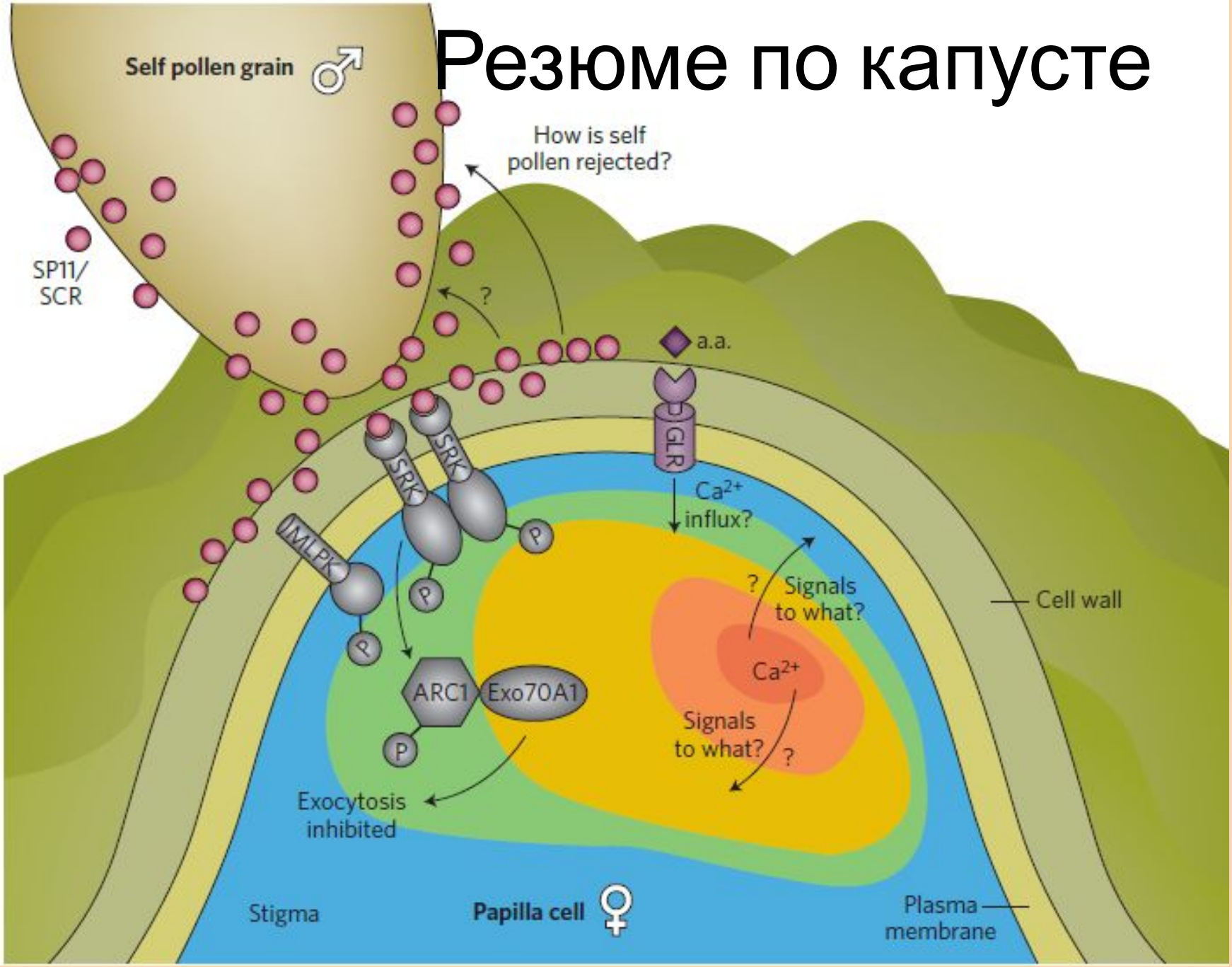
- Как может быть, что одна сторона клетки отвергает «неугодную» пыльцу, а на другой может примоститься «фаворитка», если ответ осуществляется целой клеткой?
- Исследуя субклеточную локализацию до и в момент ответа, обнаружили, что
- В момент встречи с несовместимой пыльцой происходит быстрая интернализация SRK_3
- Используя антитела к SRK_3 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 интернелизуются 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 кормит и не поддерживает…

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