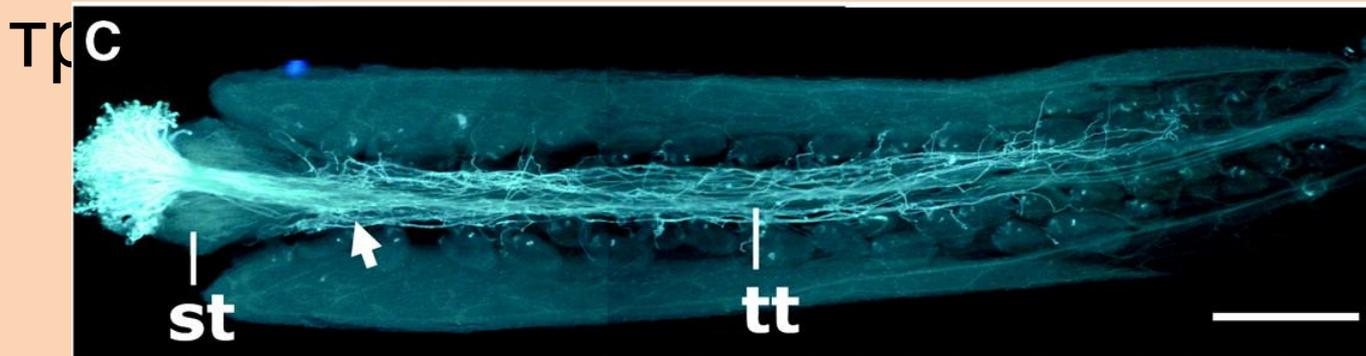


Сигналинг в овуляторной фазе

*Диалог гаметофитов от А до
Я*

Сигнальные механизмы в пестике

- Преовулярные механизмы направляют рост пыльцевой трубки к завязи.
- Овулярные механизмы контролируют ее движение к семяпочке, действуя прицельно и индивидуально – каждая семяпочка «ведет» одну пыльцевую

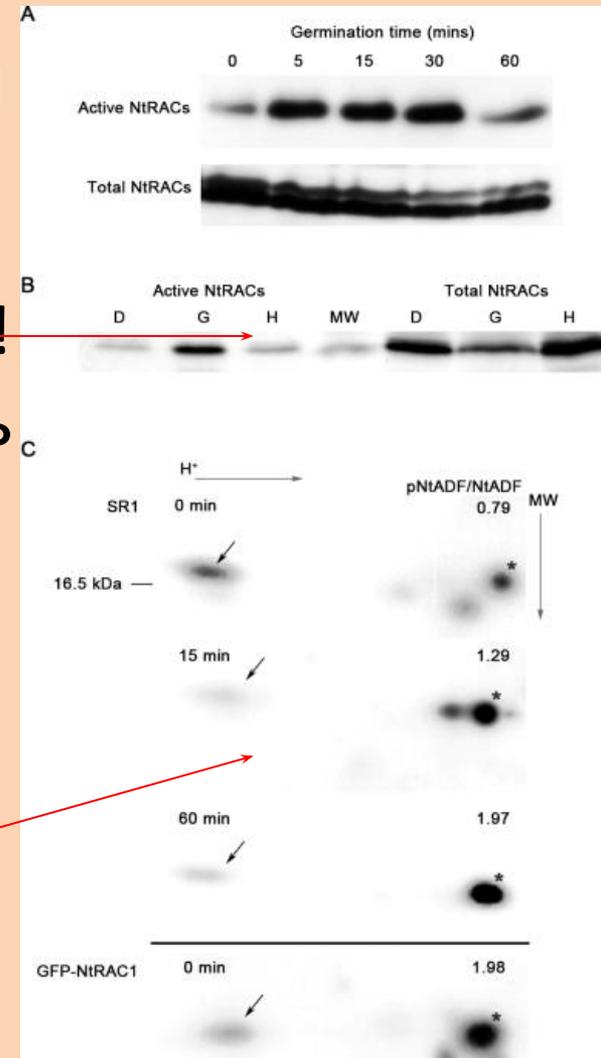


ROP ГТФазы и рецепторные киназы

- В клетках растений основную роль играют мономерные (малые) G белки (20-30 кДа).
- Эти ГТФазы циклически переходят из неактивной цитозольной формы (G-ГДФ) в активную форму (G-ГТФ), связанную с мембраной
- Малые ГТФазы, обозначаемые как **Rac/Rop** или **ROP** (Rho of plants) выполняют функции клеточных хабов – центральных переключателей и интеграторов сигналов.
- В качестве мишеней для активированных ГТФаз могут, в частности, служить белки, связанные с функционированием **цитоскелета** и **везикулярным транспортом**.

Начальные стадии прорастания

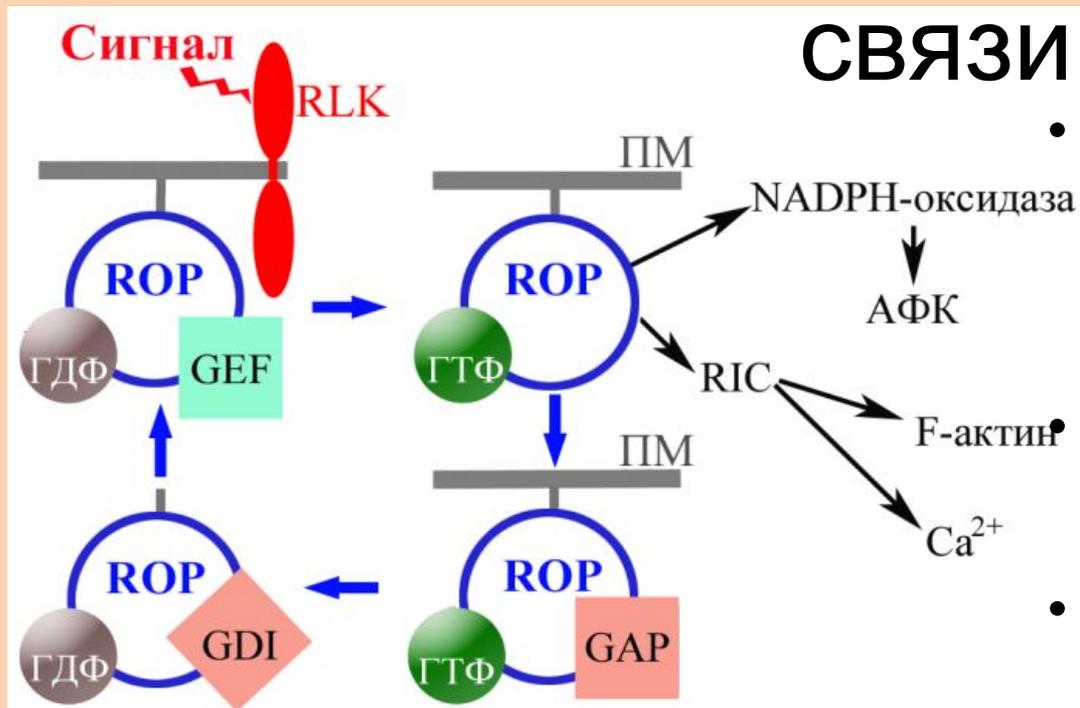
- Активация пыльцы как *in vitro*, так и *in vivo* сопровождается активацией ROP ГТФаз (NtRAC).
- В чистой воде этого не происходит!
- В условиях *in vitro* высокий уровень активированных ГТФаз поддерживается на протяжении 30 мин, после чего снижается примерно к 60 мин.
- Одной из мишеней этих белков в данном случае является актиндеполимеризующий фактор ADF.



ROP1

- В растущей пыльцевой трубке специфичная для пыльцы ГТФаза ROP1 локализована преимущественно в апикальной плазмалемме.
- Экспериментальный сдвиг баланса активации ROP1 в ту или другую сторону приводит к полной остановке роста (снижение) или вызывает расширение кончика (повышение)

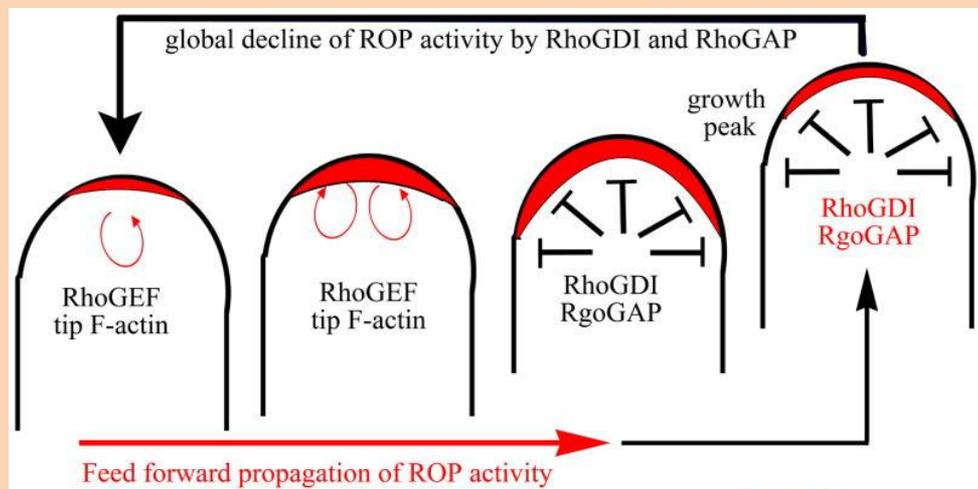
Регуляция по принципу обратной



- Рецепторная киназа RLK активирует фактор обмена нуклеотидов ROP GEF, ROP переводится в активное состояние.

Отрицательную обратную связь осуществляют две группы белков.

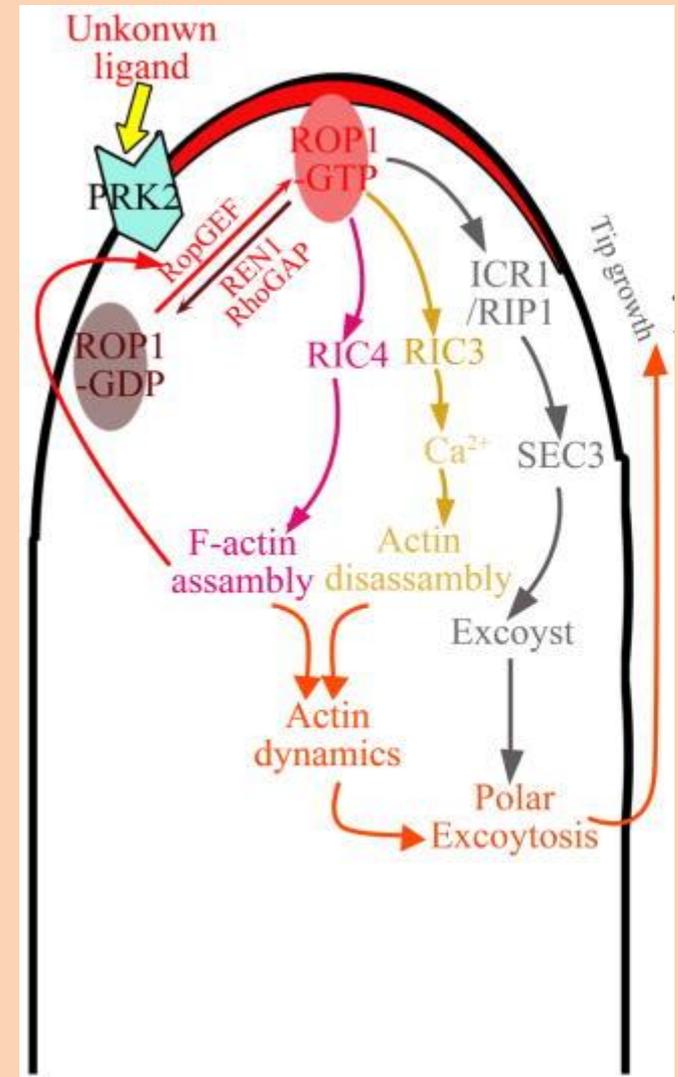
- GAP (GTPase-Activating Protein) – белки, стимулирующие ГТФазную активность, – переводят ROP в неактивное состояние.



- GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) удерживают неактивный белок ROP1 в цитозоле.

Эффекторные белки

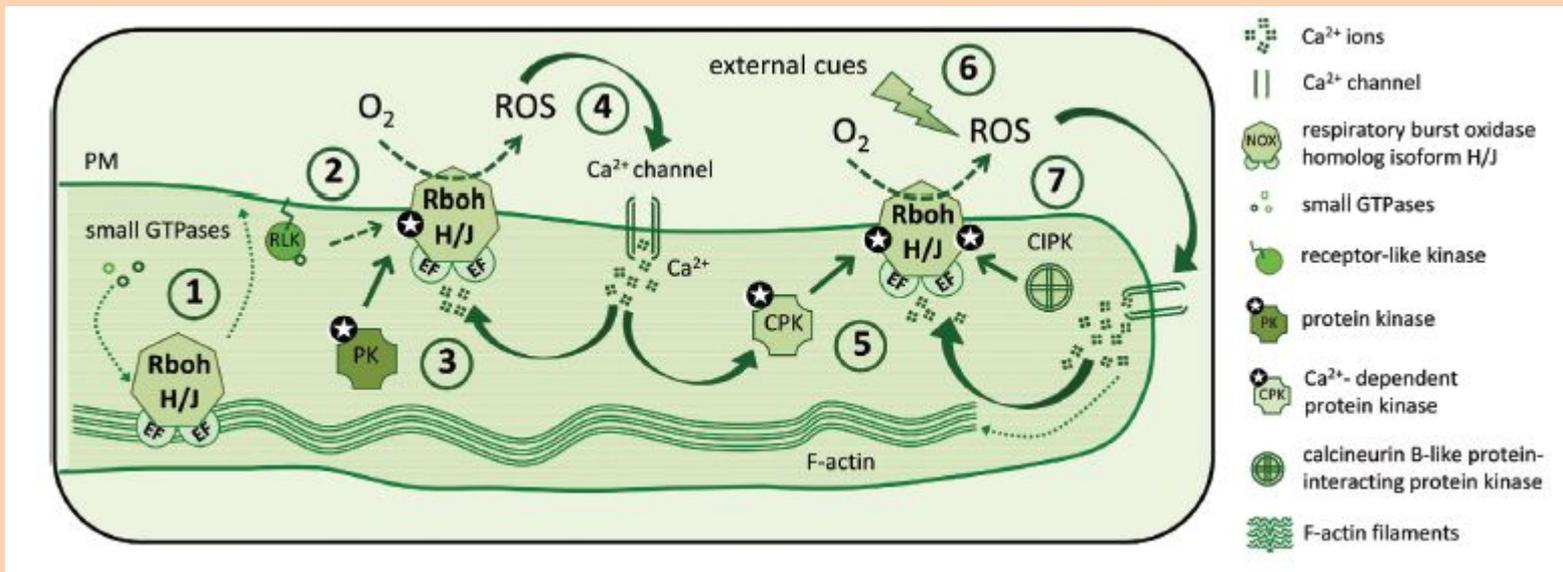
- Путь, идущий через RIC4, приводит к сборке актиновых микрофибрилл и контролирует накопление везикул, несущих материалы для апикального роста.
- Путь RIC3 активирует накопление кальция в кончике пыльцевой трубки, стимулирует деполимеризацию актина и слияние везикул с плазмалеммой.
- Эти два пути согласованно работают, регулируя динамику F-актина и экзоцитоз.



А что же АФК?

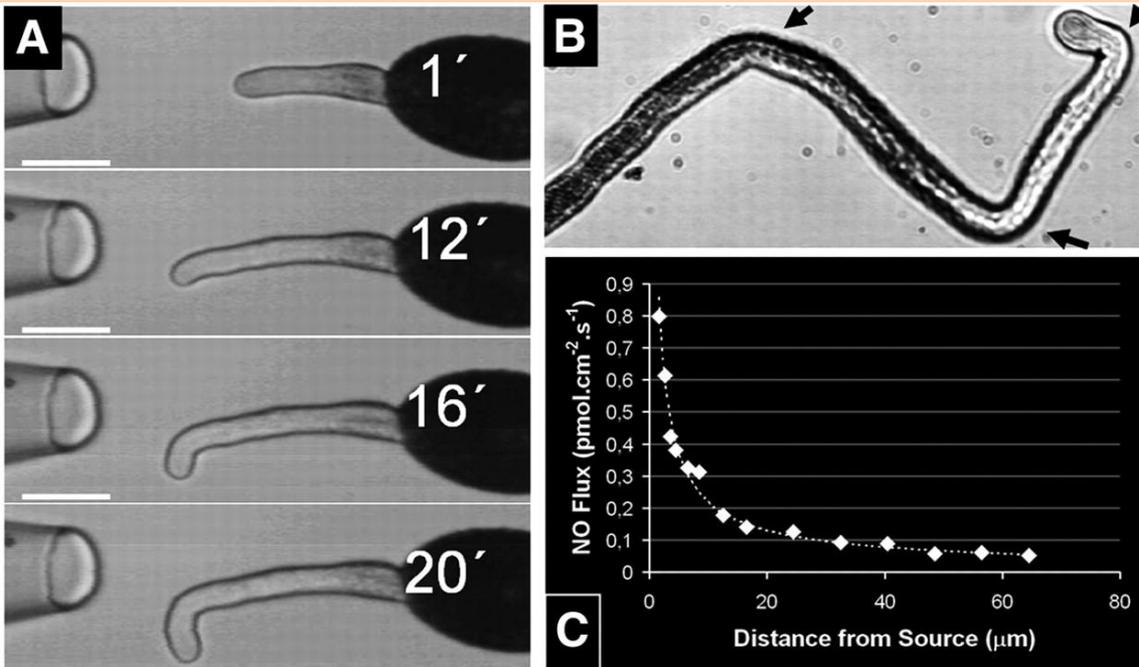
- Как мы помним, АФК контролируют 3 этапа прогамной фазы: собственно прорастание, рост трубки и... разрыв трубки
- Основными источниками АФК являются НАДФН-оксидаза плазмалеммы и ДЦ в митохондриях, но первая больше работает «на сигнал»
- Самая классическая схема «АФК-кальций» в репродукции была утверждена буквально «на днях»

Ещё немного о Ca^{2+} и АФК

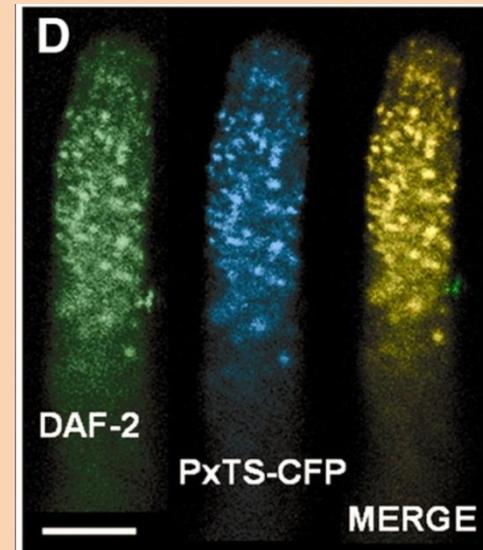
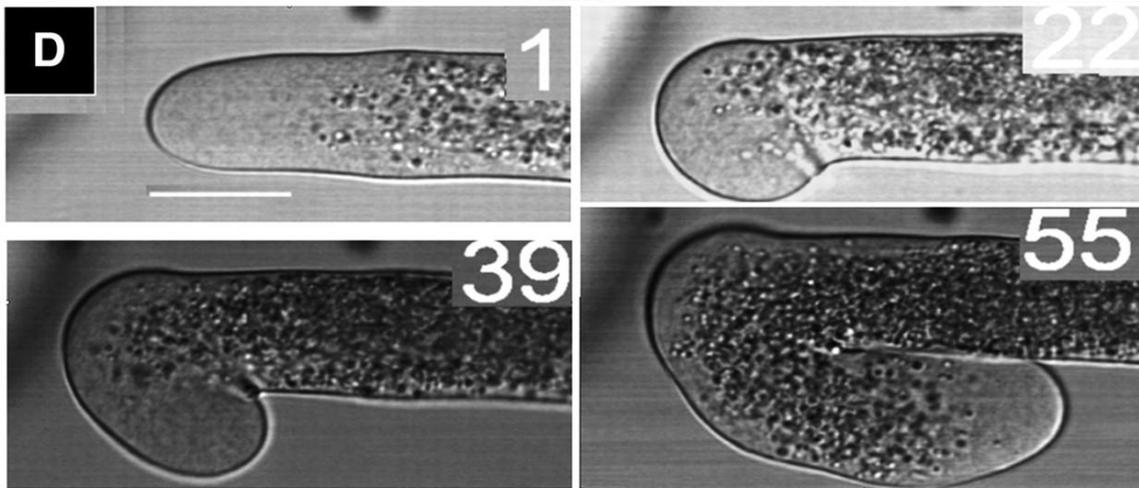


- Фосфорилирование НАДФН-оксидазы Rboh придает ей способность связывать Ca^{2+}
- Присоединение Ca^{2+} через EF-руки запускает процесс образования АФК.
- АФК активируют Ca^{2+} каналы, увеличивается концентрация Ca^{2+} в цитозоле.
- Это приводит к активации Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ и амплификации сигнала фосфорилирования.

Убегание от NO? YES

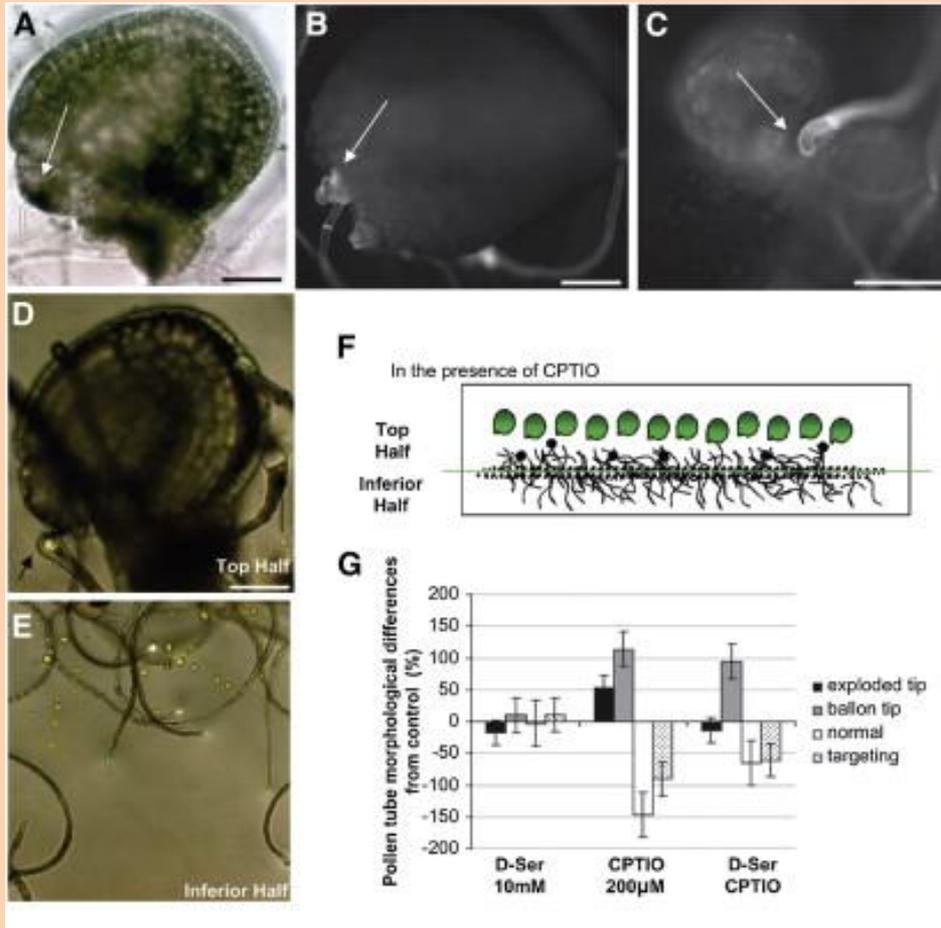


- Оксид азота содержится в пероксисомах ПТ и выделяется пыльцой, снижая концентрацию АФК в рыльце.
- Трубки «убегают» от NO *in vitro*



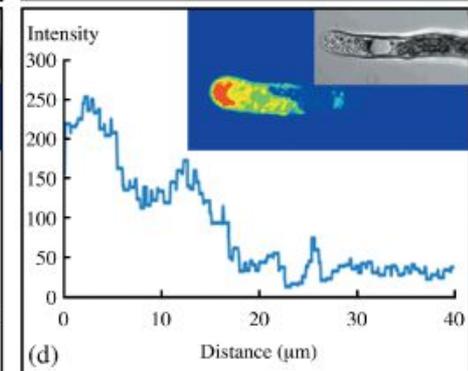
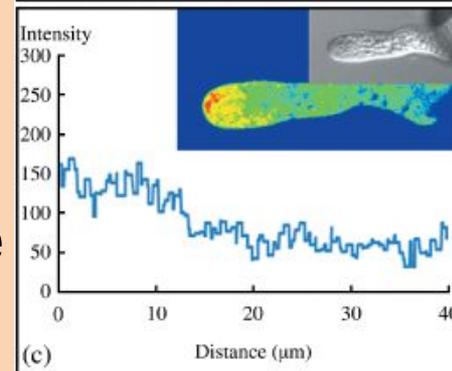
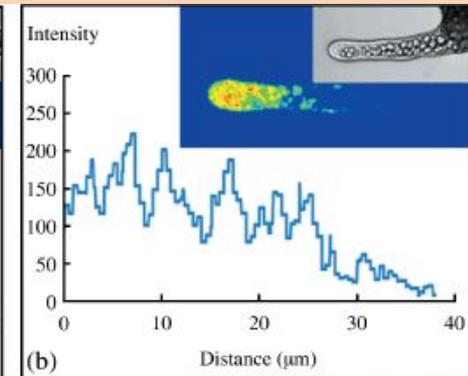
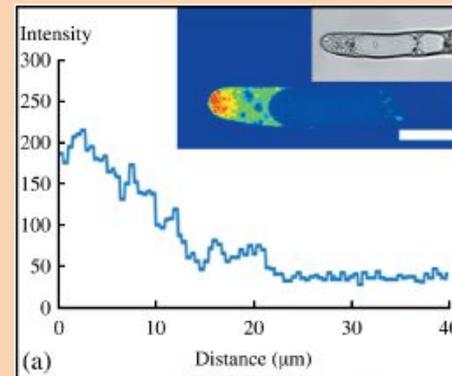
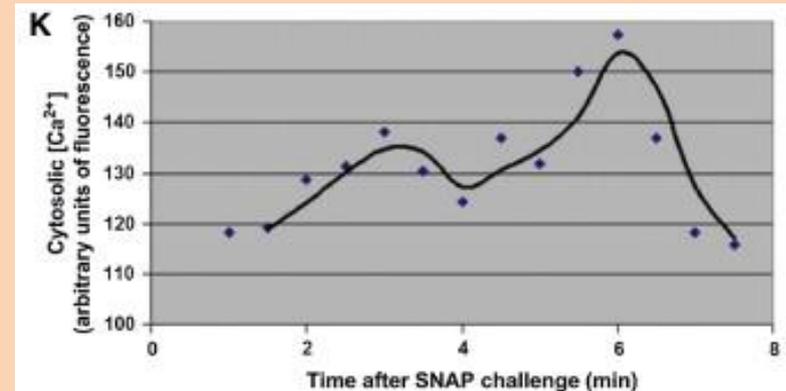
NO как сигнал от семязпочки

- Нацеливание трубки на микропиле происходит с помощью NO, который образуется в узкой зоне вокруг входа.
- В присутствии реагента, инактивирующего NO, нарушалось вращение ПТ в микропиле, трубки раздувались и

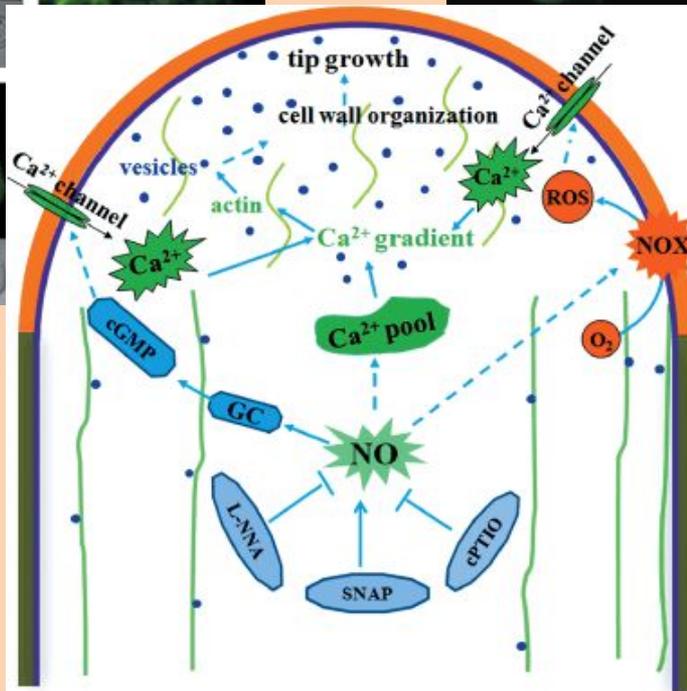
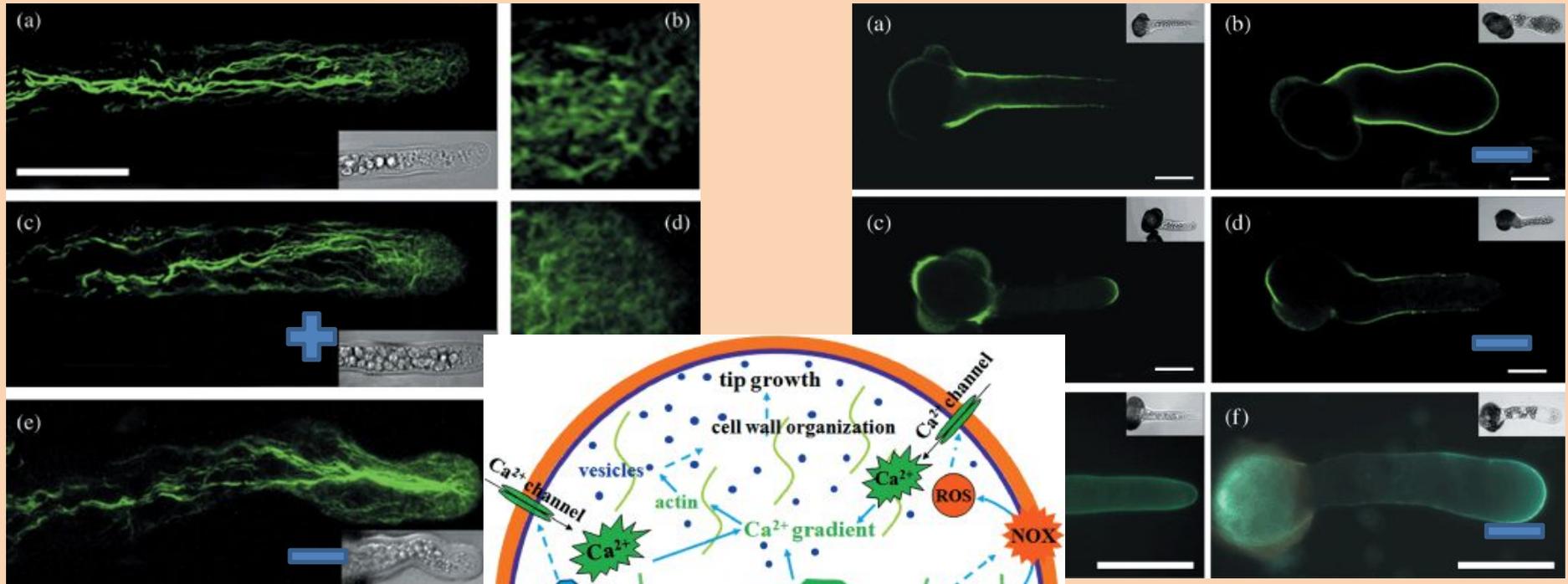


NO и кальций

- При «убегании» трубок лилии от источника NO сначала концентрация Ca^{2+} возрастала, при этом рост замедлялся и останавливался, потом был максимум, который накладывался на реориентацию и восстановление роста
- У ели подавление и активация эндогенного синтеза NO вызывали также изменение кальциевого тока, а также изменения кальциевого градиента.



NO, актин и пектины



Esterified Pectin
 De-esterified Pectin
 • Vesicle
 Plasma membrane
 } Fine Actin
 — Actin Bundle

Plant PI/PLC Signaling

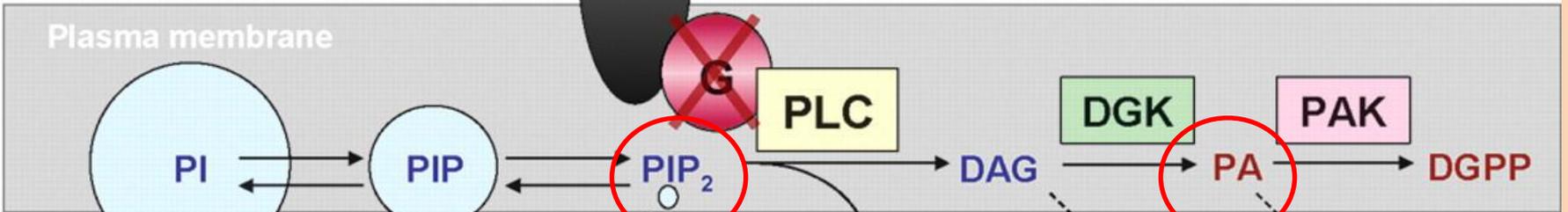
Animal (13):

- PLCβ
- PLCγ
- PLCδ
- PLCε
- PLCζ
- PLCη

Plant (9) / yeast (1)

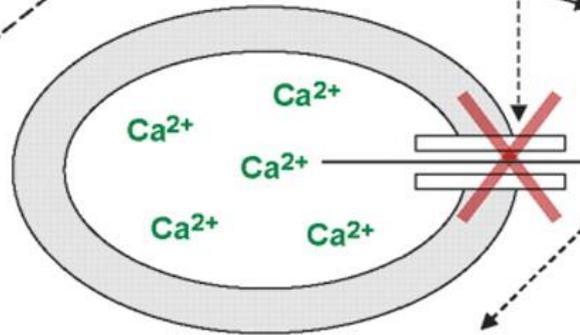
PLCζ / δ

out



in

Membrane trafficking
Ion channel regulation
Organization cytoskeleton



Protein kinase

Calmodulin

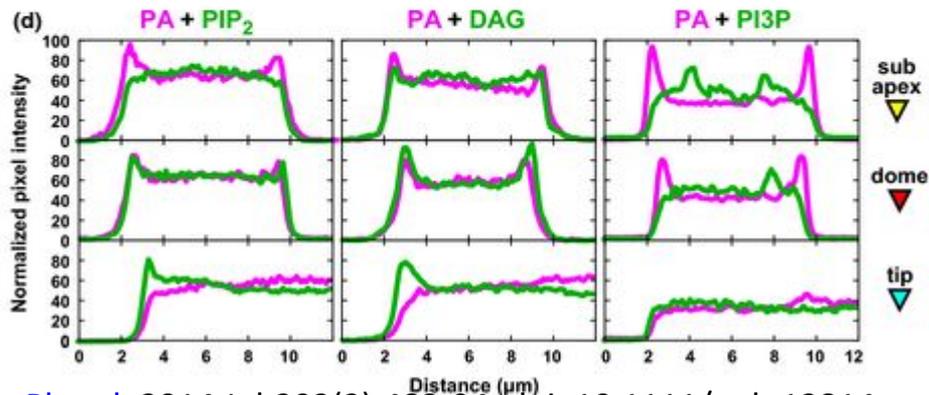
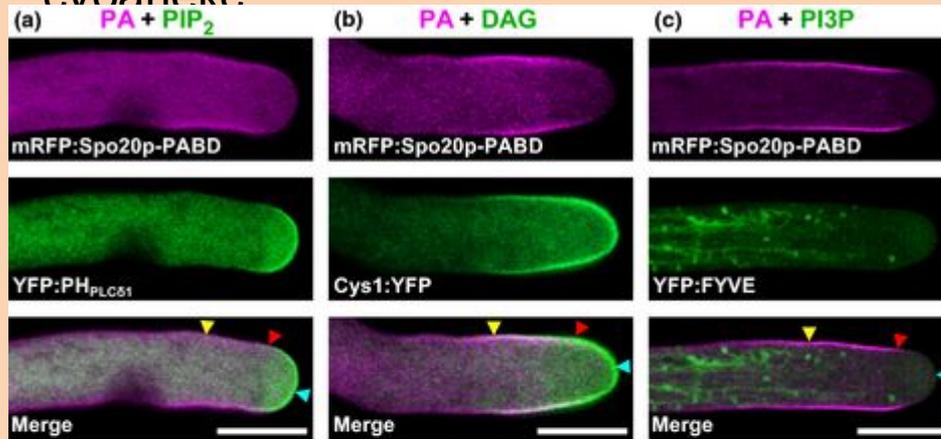
Enzymes/Targets

Intracellular responses

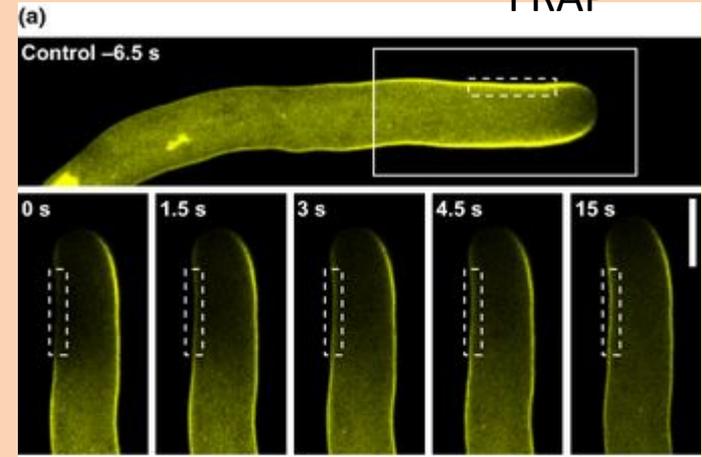
Распределение фосфолипидов



Фосфатидная к-та - субапекс

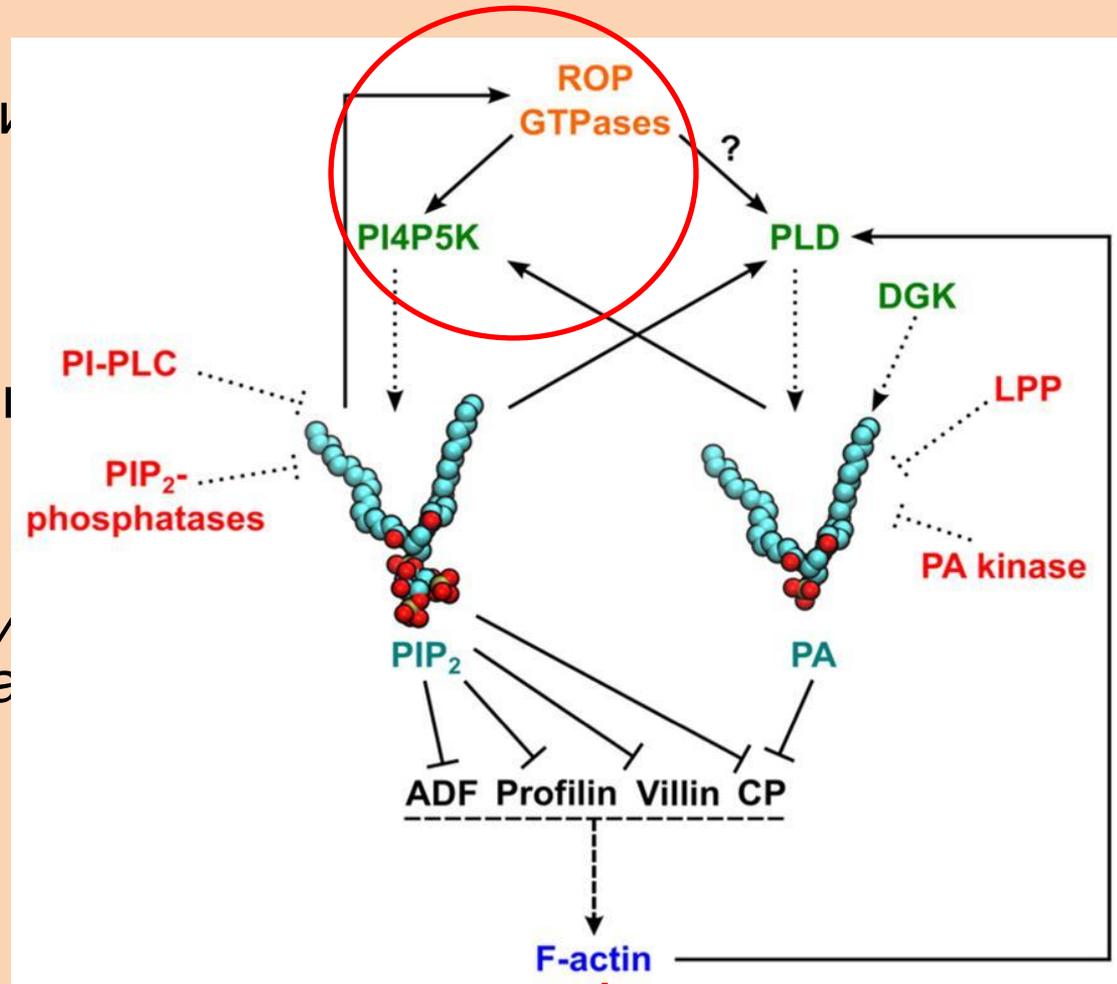


- Фосфатидная кислота сосредоточена в субапикальной плазмалемме, т.е. в зоне расположения актинового кольца.
- PI(4,5)P₂ локализован в плазмалемме



Фосфолипиды и актин

- PI(4,5)P₂ может различными способами влиять на динамику актина и его связь с мембраной: непосредственно взаимодействуя с актин-связывающими белками, или опосредованно, регулируя активность и локализацию ROP ГТФазы.
- Киназа, катализирующая образование PI(4,5)P₂, физически связана с ROP ГТФазой. Этот комплекс также локализован в кончике пальцевой трубки.

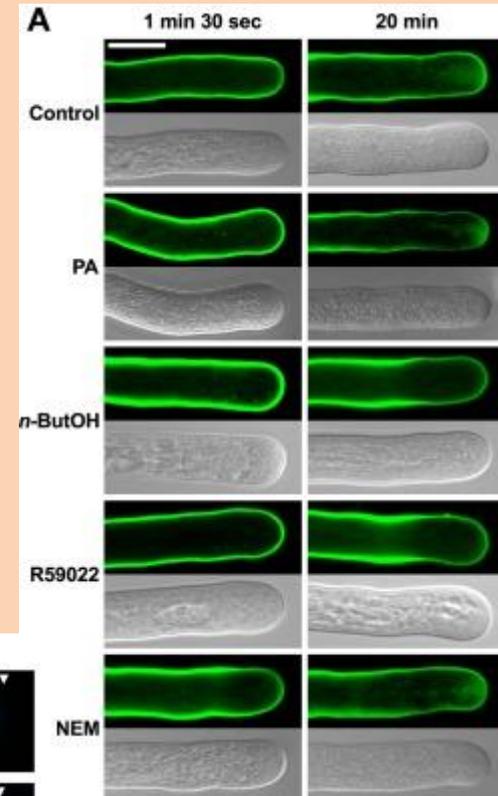
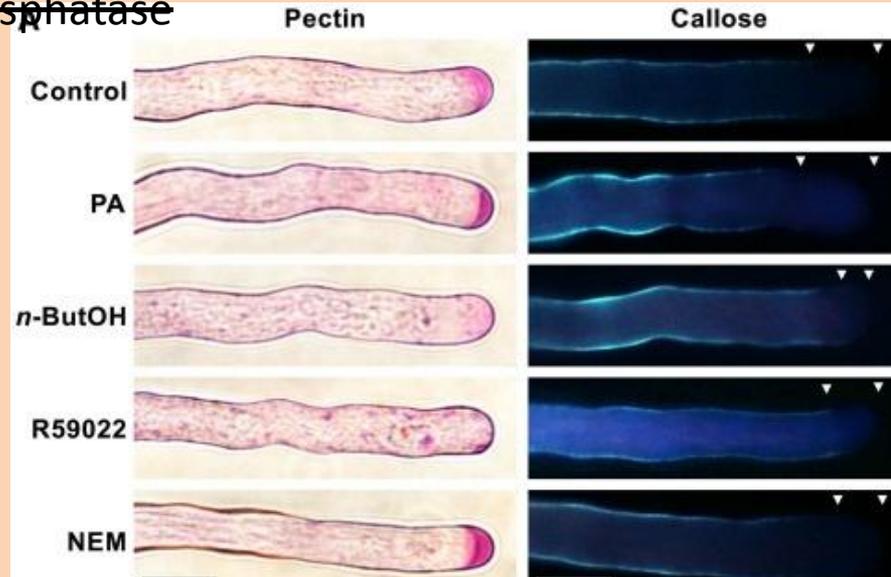
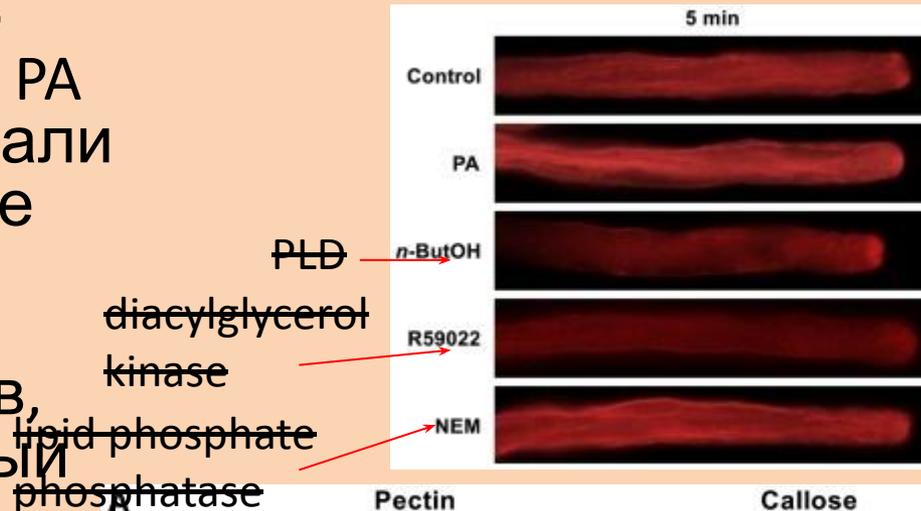


Везикулярный транспорт

Фосфолипиды и везикулярный транспорт

- Экзогенная PA и ингибитор деградации PA стимулировали образование пучков актиновых филаментов, везикулярный транспорт и отложение стенки.
- Подавление синтеза фосфатидной кислоты нарушало эти процессы.

транспорт

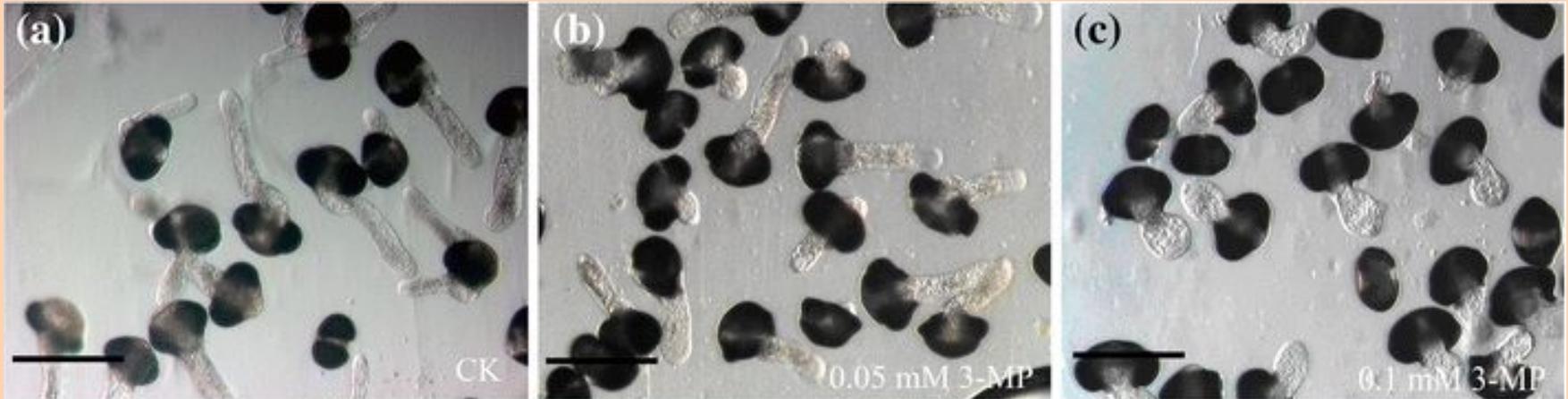


Итак, приближаемся к семяпочке

- Овулярный этап разделяют на две фазы регуляции роста пыльцевой трубки:
- фуникулярная и
- микропилярная.
- Фуникулярная регуляция включает сигналы, исходящие из семяпочки, которые заставляют трубку выйти из проводникового тракта и расти к семяпочке по поверхности фуникулуса.
- Микропилярная регуляция направляет трубку к микропиле и яйцевому аппарату.
- Фуникулярная регуляция у *Arabidopsis*, как полагают, осуществляется совместными усилиями спорофита и женского гаметофита.
- Микропилярную регуляцию осуществляет женский гаметофит.

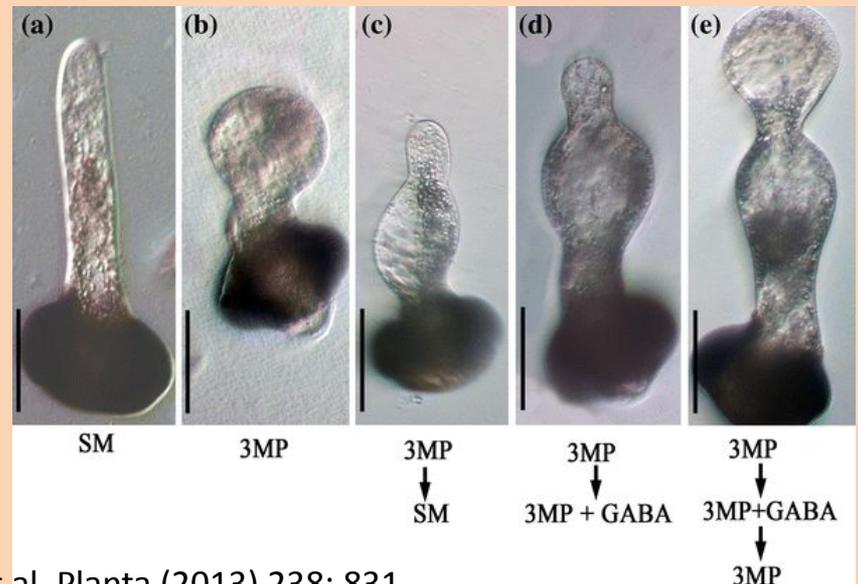
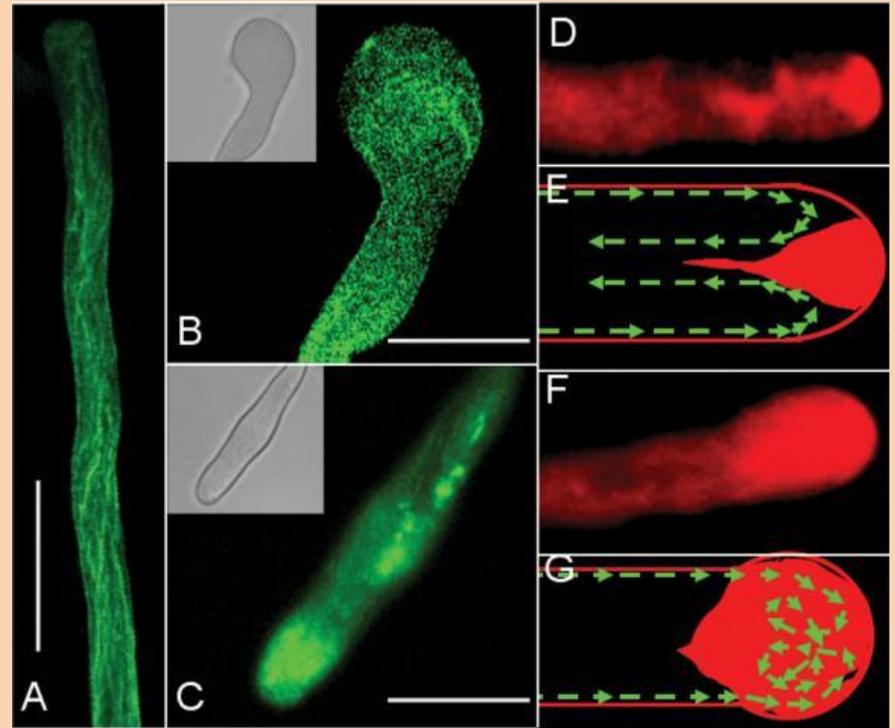
Фуникулярные сигналы

- Природа фуникулярных сигналов, исходящих из семязпочки, неясна. В числе кандидатов рассматривают NO и D-серин, о которых мы говорили ранее, а также γ -аминомасляную кислоту (GABA)

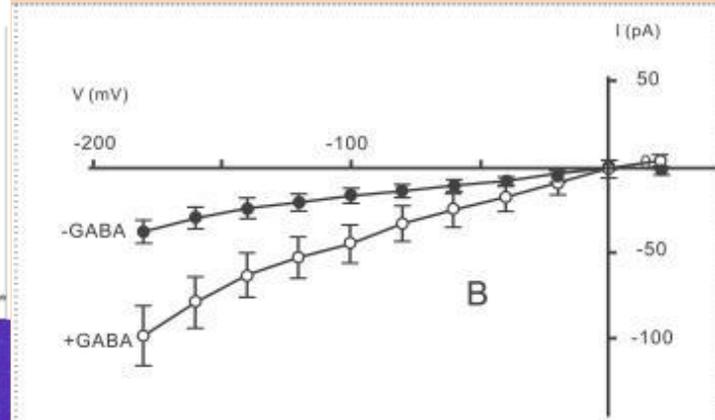
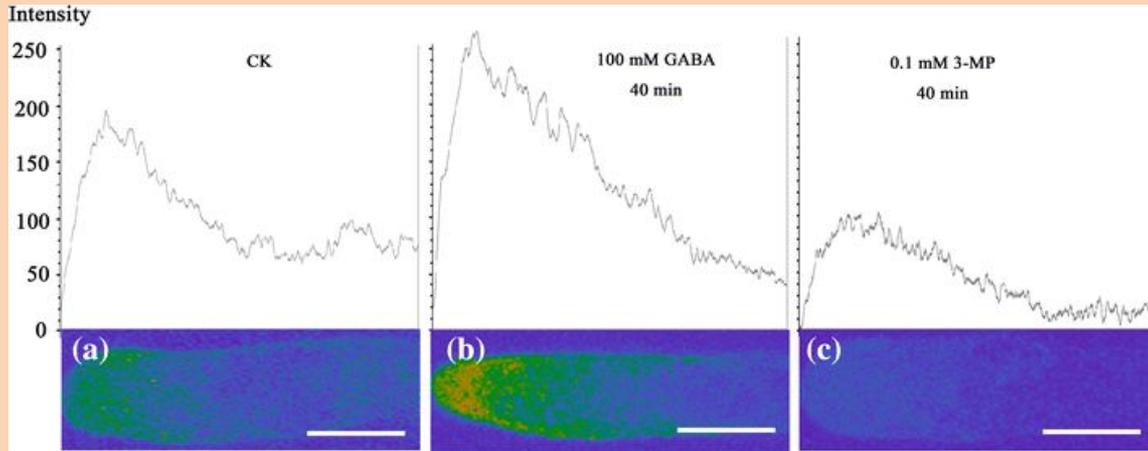


GABA

- Ингибирование глутаматдекарбоксилазы – фермента, лимитирующего скорость биосинтеза GABA, – вызывало в пыльцевой трубке дезорганизацию актинового цитоскелета, нарушения везикулярного транспорта и строительства клеточной стенки.
- Как следствие, происходило подавление прорастания пыльцы и роста трубки.
- Эффекты частично снимались при добавлении GABA.
- Экзогенная GABA, добавленная в оптимальной концентрации, стимулировала рост пыльцевых трубок ели и табака, высокие концентрации GABA ингибировали.

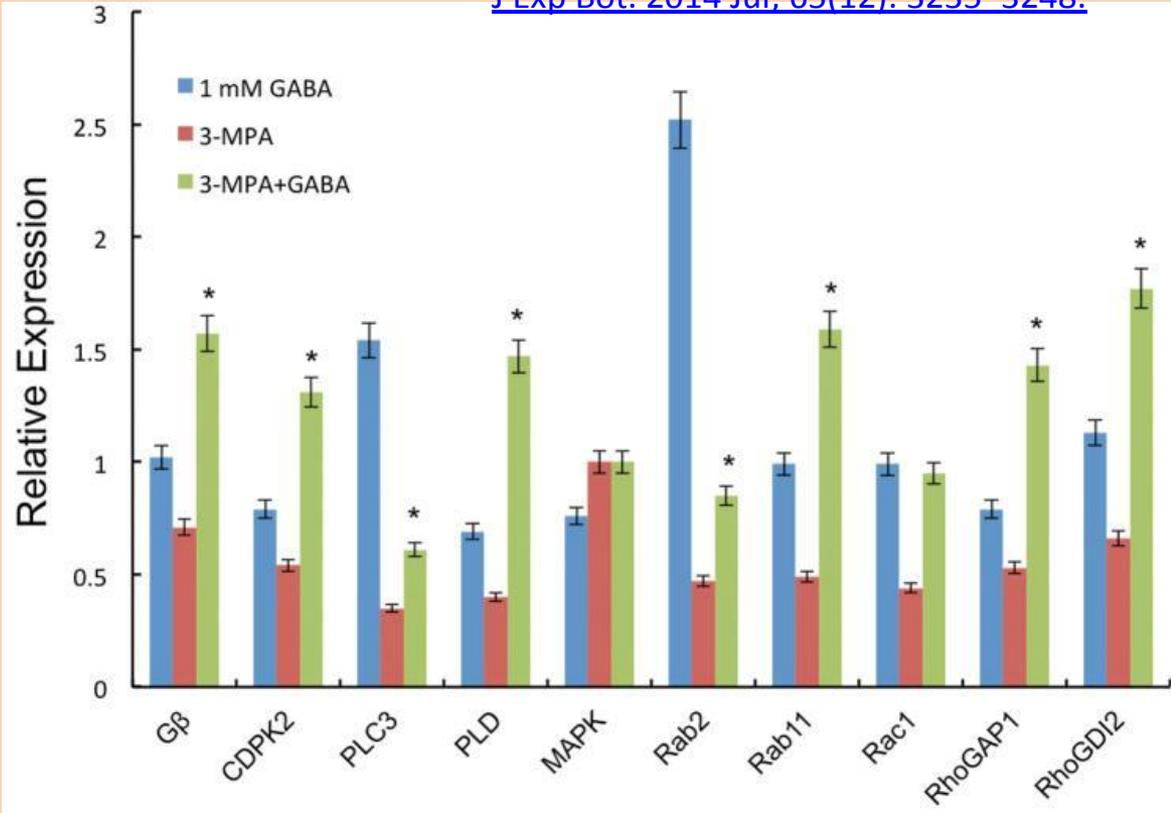


Как действует ГАБА?



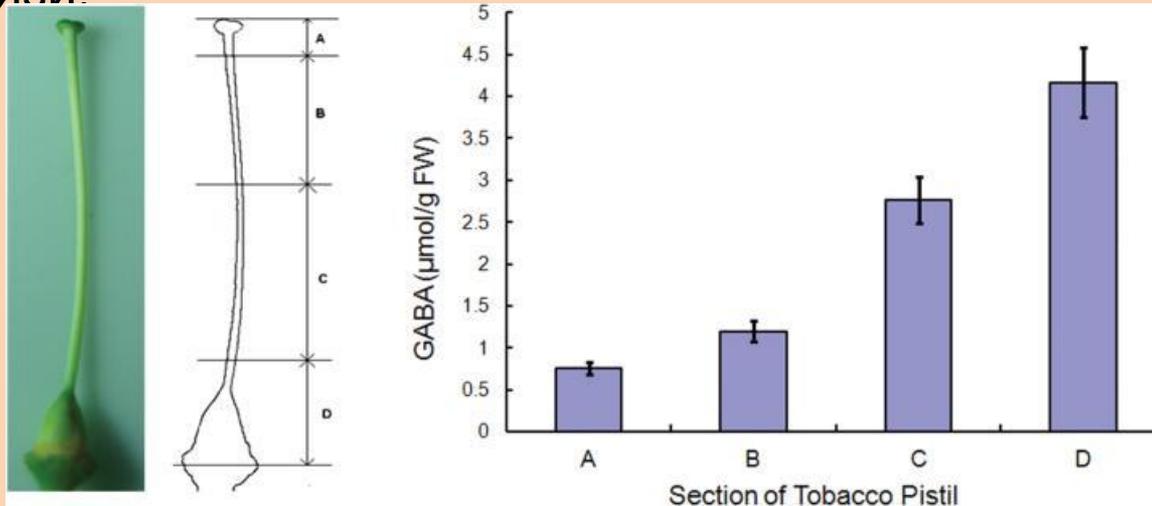
[J Exp Bot. 2014 Jul; 65\(12\): 3235–3248.](#)

- Активирует вход кальция
- Регулирует экспрессию ряда генов, включая ГТФазы и ферменты липидного сигналинга



GABA в пестике

- В пестике табака обнаружен градиент концентрации GABA.
- Предполагается, что секретируемая пестиком GABA активирует кальциевые каналы плазмалеммы трубки и индуцирует приток в нее Ca^{2+} .
- Глутаматдекарбоксилаза может связываться с кальмодулином и действовать как реостат, изменяя уровень внутриклеточной GABA, а через нее и активность кальциевых каналов.
- Когда пыльцевая трубка растет в зоне низких концентраций GABA, ее кальциевые каналы активируются.
- Когда трубка попадает в зону высоких концентраций, GABA ингибирует эти каналы.
- Глутаматдекарбоксилаза играет ключевую роль в этом процессе, обеспечивая регуляцию кальциевых каналов по типу отрицательной обратной связи.



Микропилярные сигналы

- Эти сигналы имеют короткий радиус действия (100-200 мкм от микропиле), значит, здесь могут работать достаточно крупные молекулы, например, небольшие белки.
- Любимый объект - *Torenia fournieri*, у которой «полуголый» зародышевый мешок выступает из семязпочки, так что синергиды, яйцеклетка и часть центральной клетки находятся в гнезде завязи
- Эксперименты с последовательной лазерной абляцией (удалением) клеток ЗМ показали, что для привлечения пыльцевой трубки к женскому гаметофиту необходимо и достаточно, чтобы сохранялась хотя бы одна синергида.
- Судя по всему, синергида - главный источник хемоаттракции пыльцевых трубок

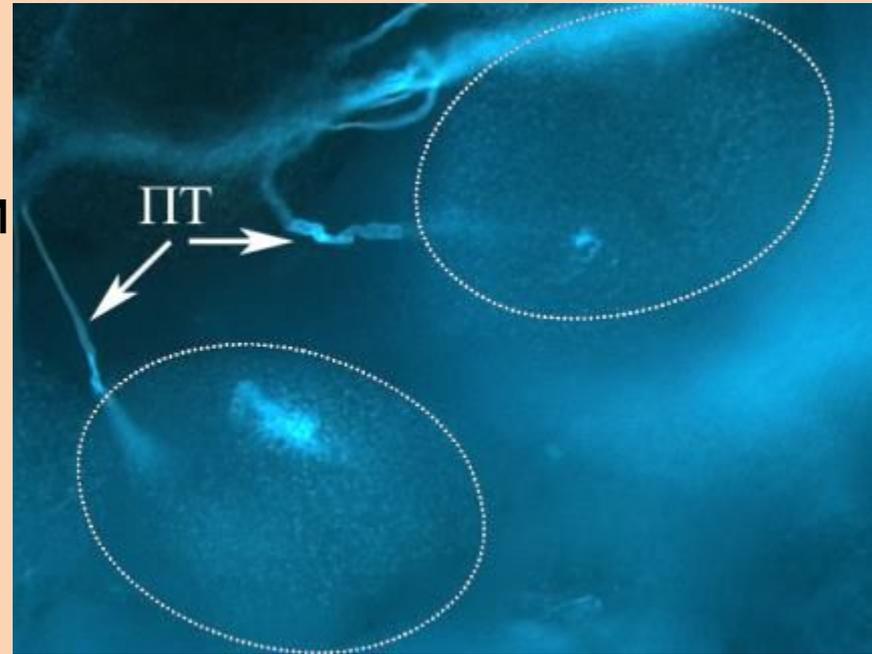
Механика вращаения

- В конце своего пути пыльцевая трубка замедляет рост и проникает в одну из синергид (рецептивную через нитчатый аппарат или рядом с ним).
- В синергиде рост пыльцевой трубки прекращается, она лопаается, и спермии высвобождаются.



Зона взаимодействия гамет

- Цитоплазмы ВК и С смешиваются
- Плазмалемма С разрушается, и спермии в составе MGU перемещаются в узкое пространство между плазмалеммами яйцеклетки и ЦК.
- Его обозначают как зону взаимодействия гамет.
- В этой зоне, где встречаются синергиды, яйцеклетка и центральная клетка, клеточные стенки полностью или частично отсутствуют, открывая плазмалеммы

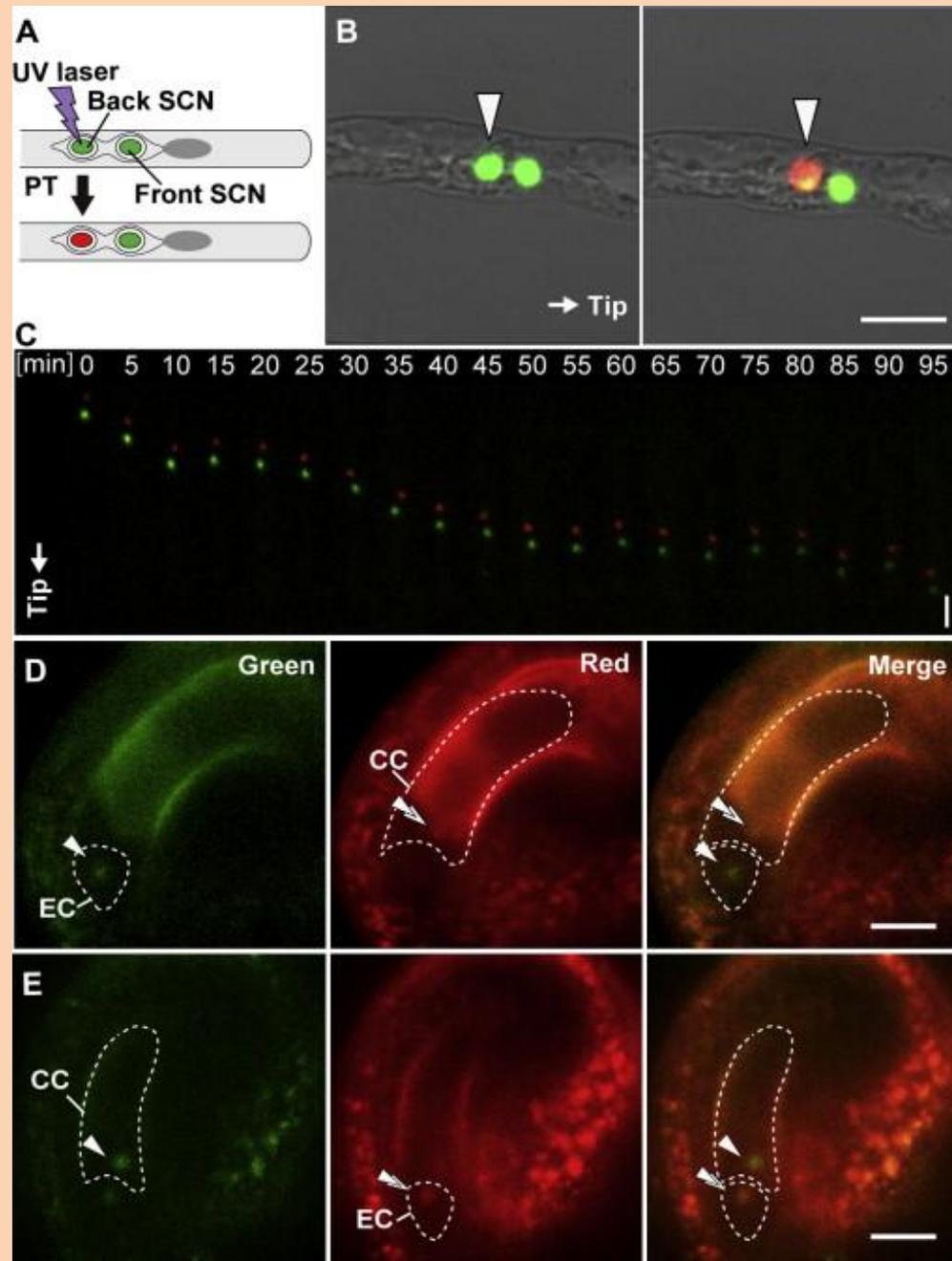


Оплодотворение

- После разрыва трубки, скорость движения спермиев возрастает примерно в 100 раз.
- Неизвестно, используется ли на этом этапе активный транспорт, или спермии перемещаются с потоком цитоплазмы, выходящей из лопнувшей пыльцевой трубки.
- После такого быстрого движения спермии останавливаются в зоне взаимодействия гамет. У *Arabidopsis* эта «остановка» длится около 7 мин.
- В этот период дегенерирует ядро вегетативной клетки, происходит активация спермиев, адгезия плазматических мембран и объединение цитоплазмы в обеих парах гамет (плазмогамия).
- После чего ядра спермиев перемещаются к ядрам женских гамет и сливаются с ними (кариогамия).

К вопросу о шансах

- Экспрессировали в спермиях флуоресцентный белок, способный к фотоконверсии: облучение УФ сдвигало спектр флуоресценции этого белка.
- Один и тот же спермий связан с вегетативным ядром на протяжении роста пыльцевой трубки.
- Анализ большого числа оплодотворений показал, что «передний» спермий (связанный с вегетативным ядром), как и «задний», с равной вероятностью оплодотворяли как

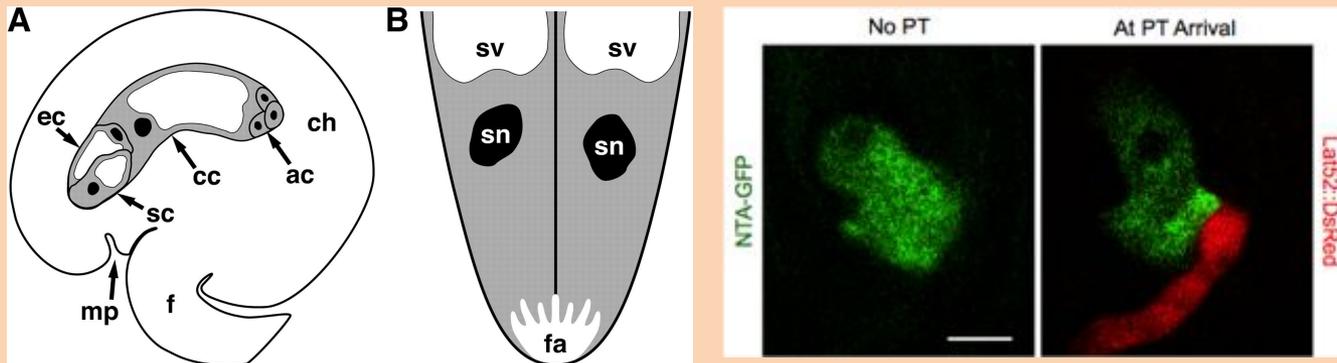


Одинаковые ли синергиды?

- Две синергиды в зрелом зародышевом мешке многих растений неразличимы, и выбор трубкой рецептивной синергиды, по-видимому, происходит случайным образом.
- Гибель рецептивной синергиды у *Arabidopsis*, например, запускается после непосредственного контакта с пыльцевой трубкой.
- А гибель второй синергиды происходит после оплодотворения.
- У других видов растений, таких как табак, рецептивная синергида определена до прибытия трубки и отличается по ультраструктуре; кроме того, в ней накапливаются значительные количества мембраносвязанного кальция

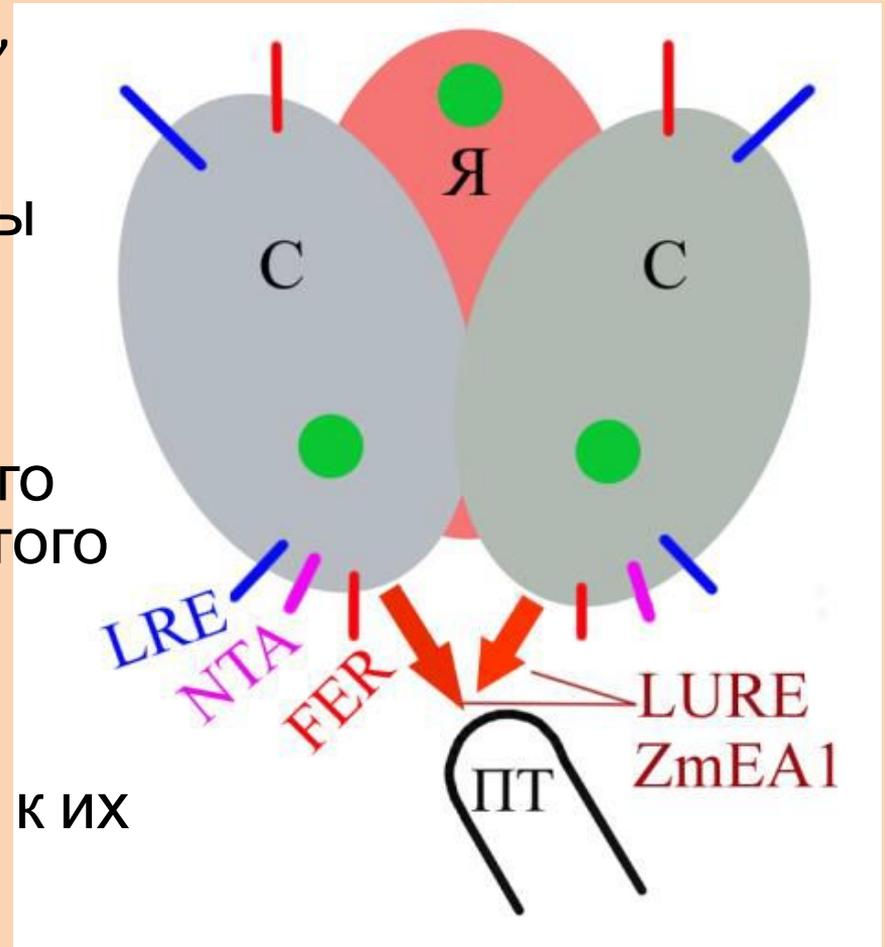
Нитчатый аппарат

- Нитчатый аппарат представляет собой систему извилистых и разветвленных впячиваний клеточной стенки в цитоплазму.
- Они существенно увеличивают поверхность плазмалеммы и суммарную толщину клеточной стенки.
- Вблизи нитчатого аппарата концентрируются митохондрии с хорошо выраженными кристами.



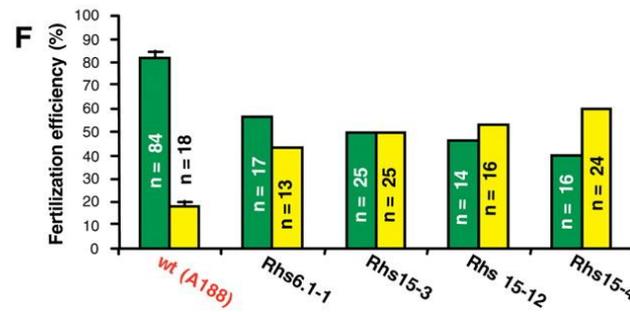
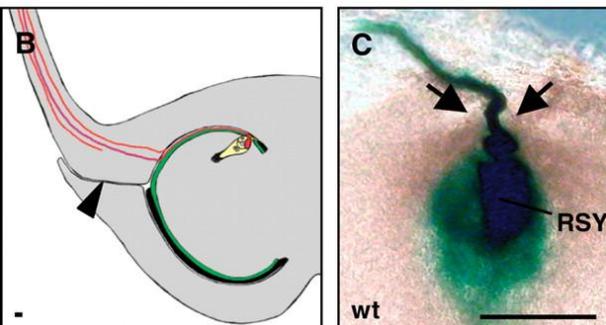
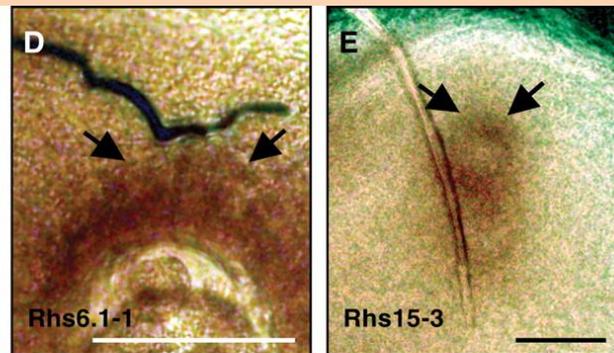
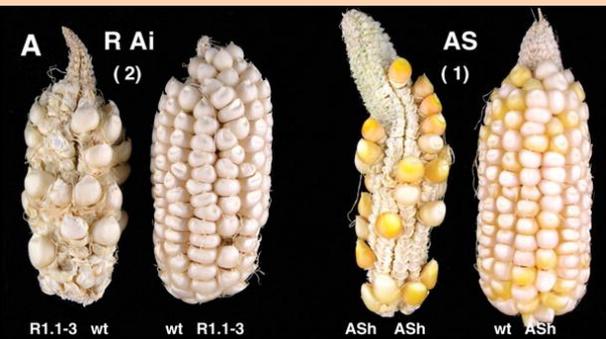
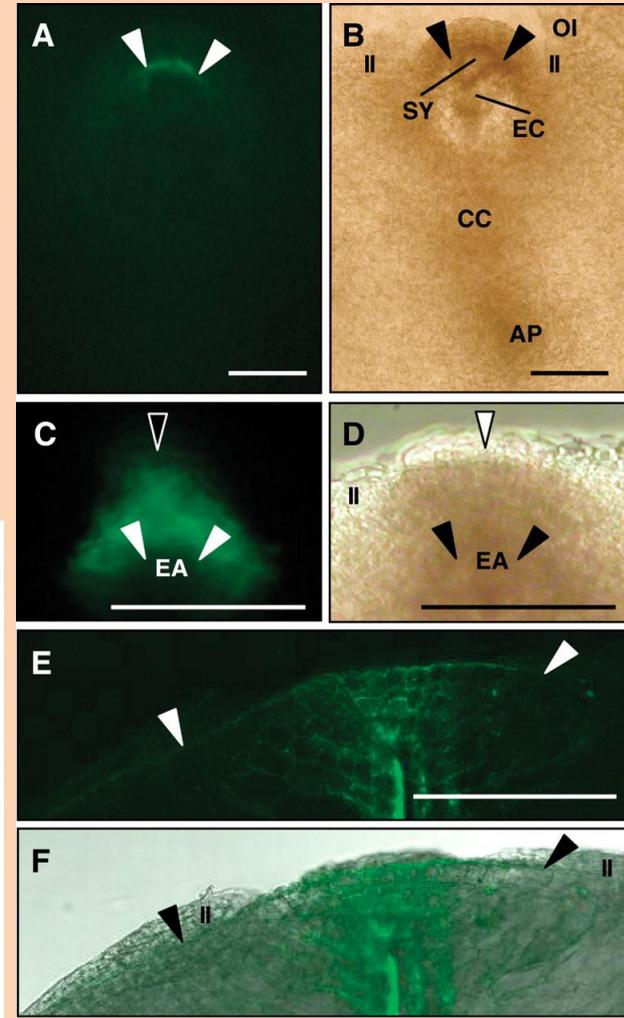
Сигнальные пептиды 2Д

- В числе первых аттрактантов, синтезируемых синергидами, были идентифицированы цистеин-богатые полипептиды LURE, обнаруженные у *Torenia fournieri*
- Они секретируются в микропиллярной части женского гаметофита (в области нитчатого аппарата).
- Пептиды видоспецифичны, причем пыльцевые трубки приобретают компетентность к их действию в процессе роста в столбике.
- Аналогичные пептиды найдены также у *Arabidopsis*

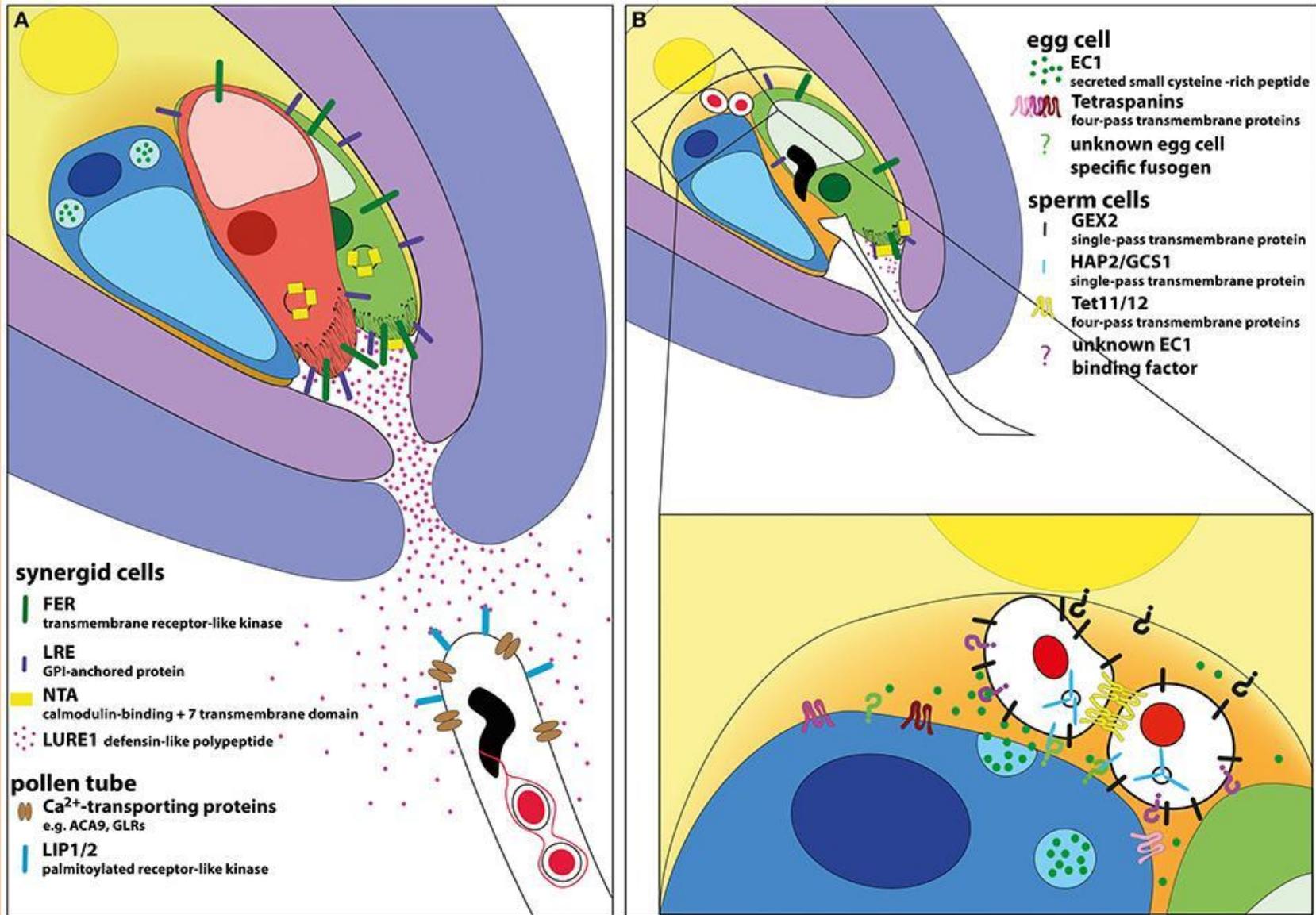


А у однодольных?

- У кукурузы *Z. Mays* EGG APPARATUS 1 (*ZmEA1*).
- Радиус его аттрагирующего действия составляет 100-150 мкм.
- Транскрипты *ZmEA1* накапливались перед оплодотворением, но после оплодотворения их уровень резко снижался.
- Подавление синтеза этого пептида с помощью антисмысловой РНК блокировало процесс вхождения трубки в семяпочку.
- Флуоресцентно меченый белок EA1-GFP накапливался в

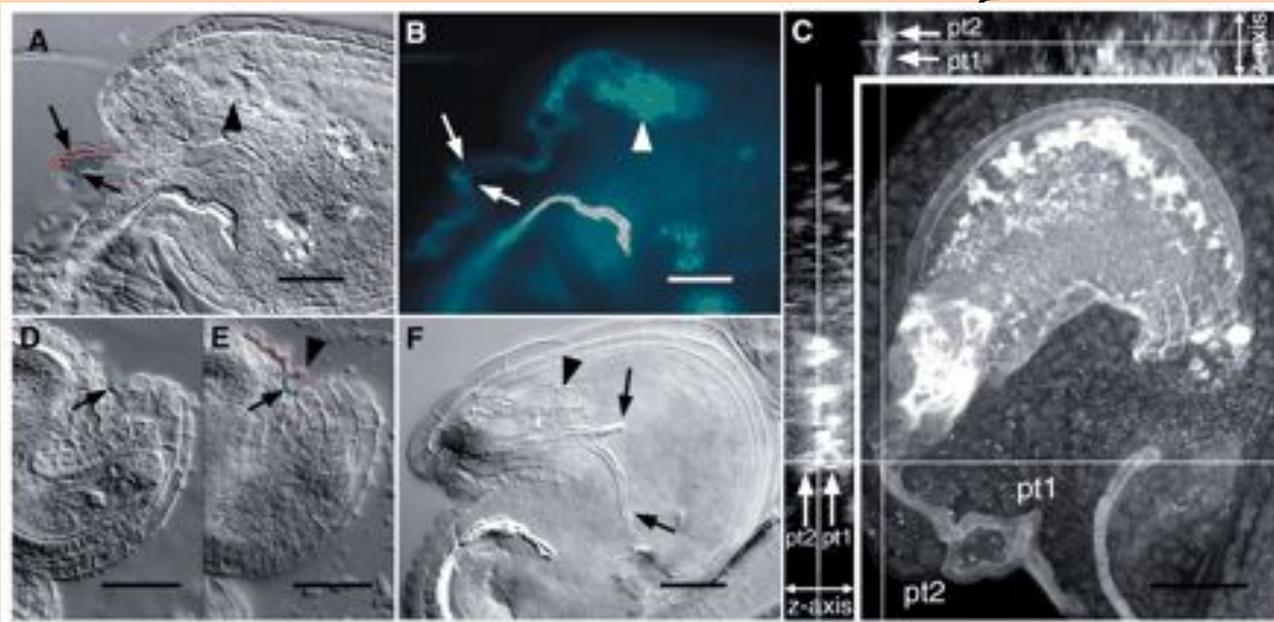


О том же, но красиво



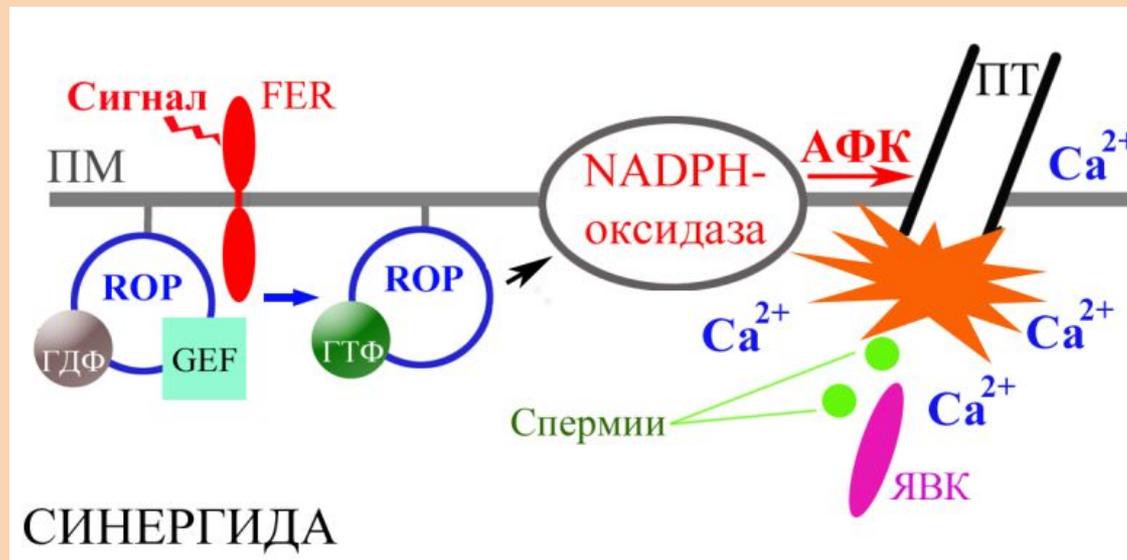
Богиня плодородия

- Ключевую роль в разрыве трубки играют рецепторные киназы.
- Первая РК синергиды, названа в честь богини плодородия этрусков, FERONIA. Она локализована в плазмалемме в области нитчатого аппарата.
- У мутантных растений *fer* не происходит оплодотворения. Пыльцевые трубки не могут остановить свой рост.
- Семяпочка не снижает свою аттрагирующую активность и

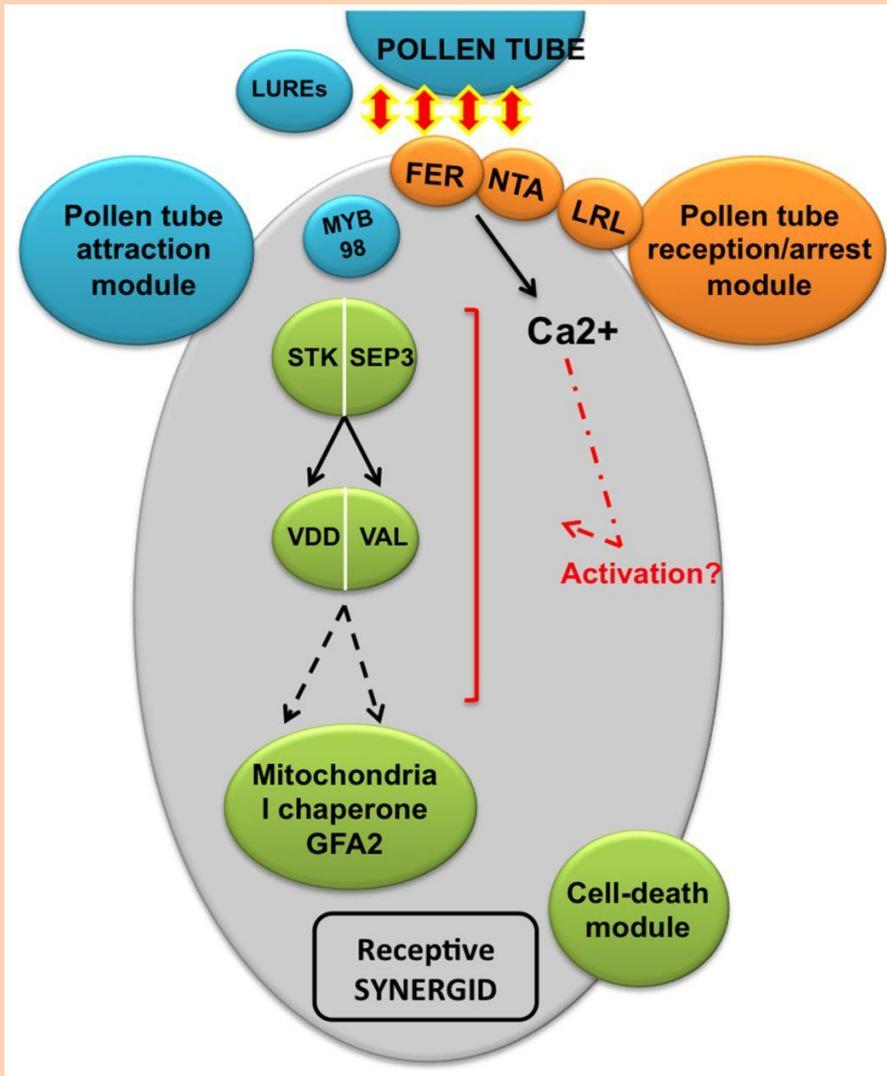


Причем тут АФК?

- Итак, FERONIA должна вызвать разрыв пыльцевой трубки, она же должна прекратить аттракцию новых пыльцевых трубок
- АФК, продуцируемые NADPH-оксидазой, локализованы там же, где и FER – в нитчатом аппарате.
- Развитие семяпочки дикого типа сопровождалось накоплением FER и АФК в нитчатом аппарате, достигая максимума в период готовности семяпочки принять пыльцевую трубку.
- В процессе развития семяпочек мутанта *Arabidopsis fer-4* уровень АФК не повышался.
- DPI (ингибитор NADPH-оксидазы) и скевенджеры эндо генных H₂O₂ и гидроксилрадикала эффективно снижали содержание АФК в семяпочке и блокировали разрыв пыльцевых трубок, они продолжали расти.



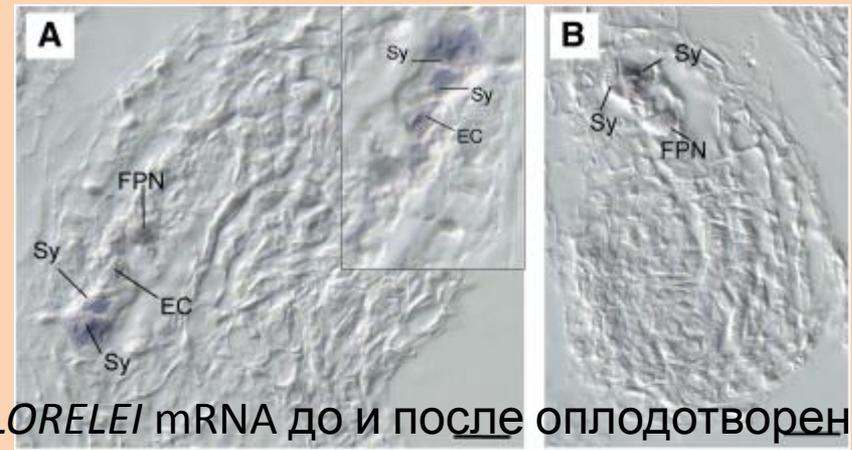
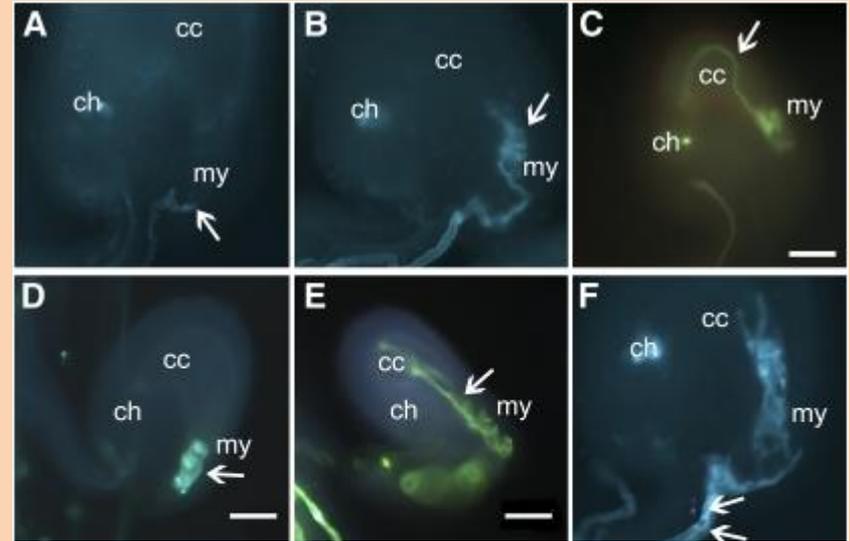
Другие участники



- Два других белка синергиды, контролирующих поведение трубки в зародышевом мешке, – это NORTIA (NTA) и LORELEI (LRE).
- У мутантов *nta* и *lre* так же, как *fer*, пыльцевые трубки своевременно не прекращают свой рост и не высвобождают спермии

Красивые имена NORTIA и LORELEI

- Для NTA, как и для FER, характерна полярная локализация – в нитчатом аппарате.
- NTA перемещается в плазмалемму из цитоплазмы лишь с появлением в зародышевом мешке пыльцевой трубки.
- Процесс перемещения NTA происходит под контролем FER.
- Небольшой белок LRE, как полагают, транспортируется в плазмалемму синергиды посредством секреторной системы и заякоривается снаружи с помощью гликозилфосфатидилинозитола – якорного домена на С-конце (Bleckman et al., 2014).



LORELEI mRNA до и после оплодотворения

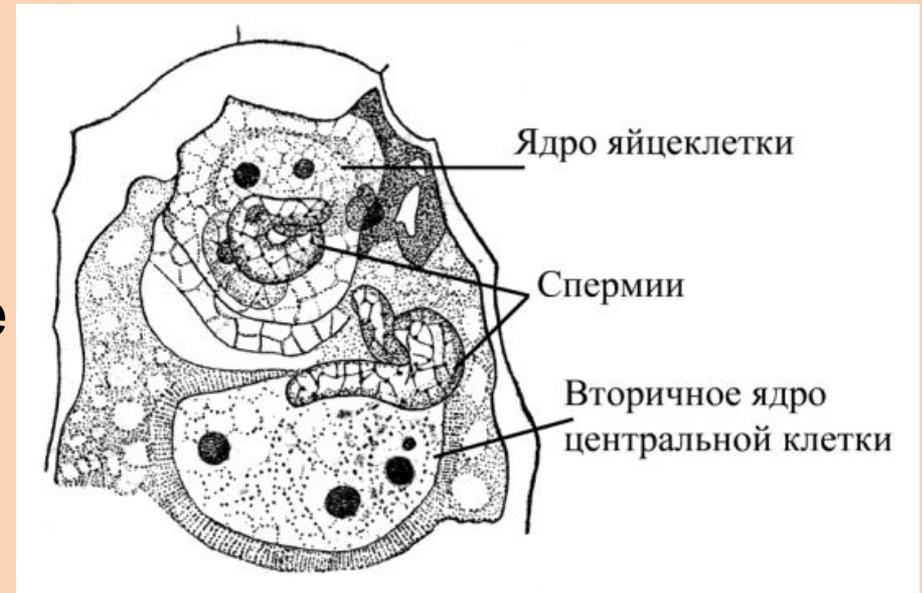
[Plant Cell](#). 2008 Nov; 20(11): 3038–3049

- LRE, как и FER, индуцирует образование АФК в нитчатом аппарате
- Популярная версия: LRE, наряду с FER, входит в сигнальный модуль, который включает ROP ГТФазу и обеспечивает высокий уровень АФК на входе в женский гаметофит

Взаимодействие гамет.

Оплодотворение

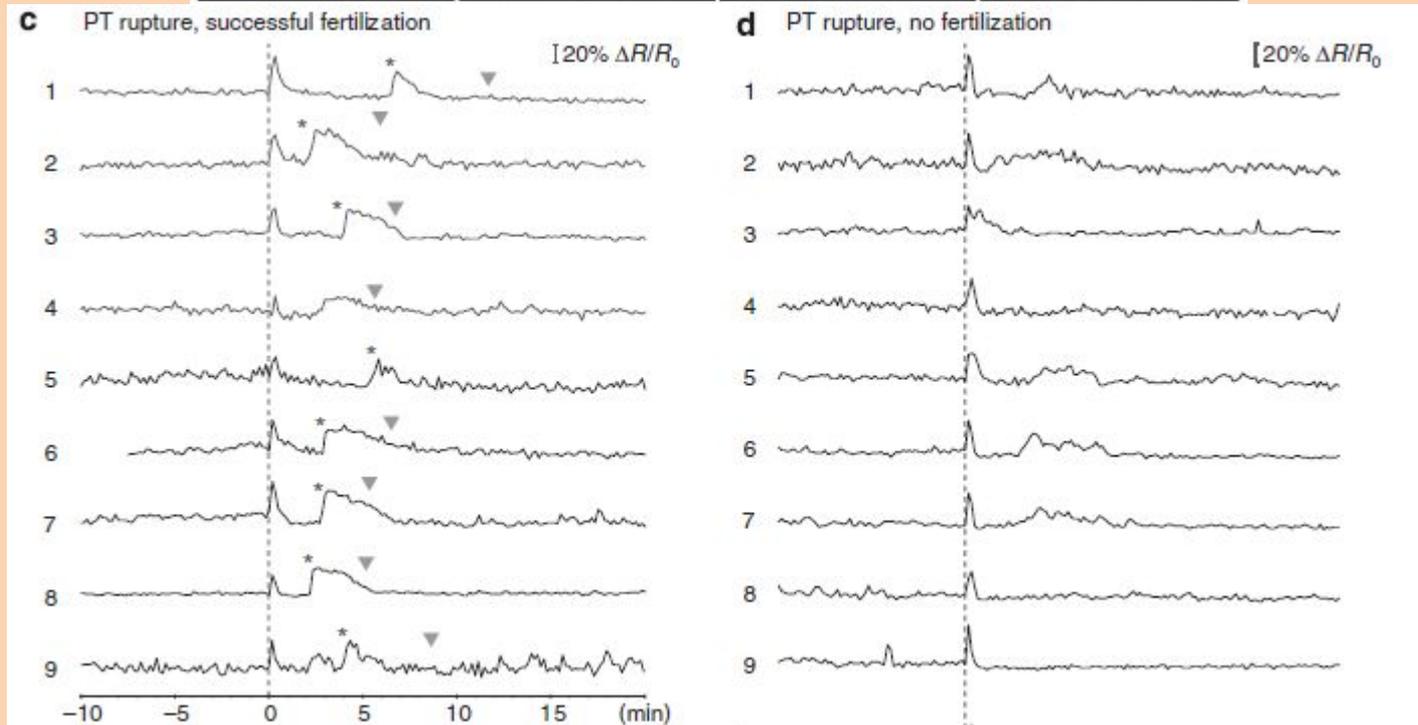
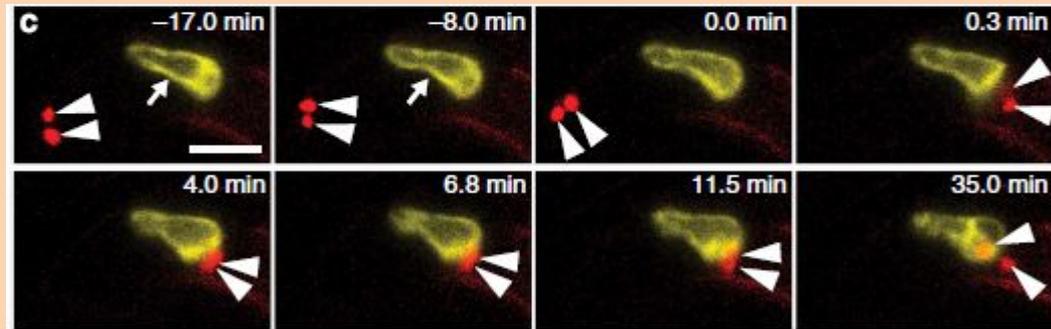
- Двойное оплодотворение у покрытосеменных растений было открыто С.Г. Навиным в конце XIX в.
- Первые успешные эксперименты по оплодотворению *in vitro* были поставлены в начале 1990х. Kranz с коллегами индуцировали слияние спермия и яйцеклетки кукурузы с помощью электрических импульсов.
- Далее научились использовать для слияния Ca^{2+} или ПЭГ.



Гаметы и Ca^{2+} (*in vitro*)

- При слиянии спермия и яйцеклетки кукурузы *in vitro* наблюдали временное увеличение цитозольной концентрации кальция.
- Кальций поступал в яйцеклетку извне. Этот процесс начинался сразу после слияния гамет в месте входа спермия.
- Затем он распространялся в виде волны по поверхности яйцеклетки со скоростью около 1 мкм/с, и в итоге охватывал всю клетку

Кальциевая подпись *in vivo*

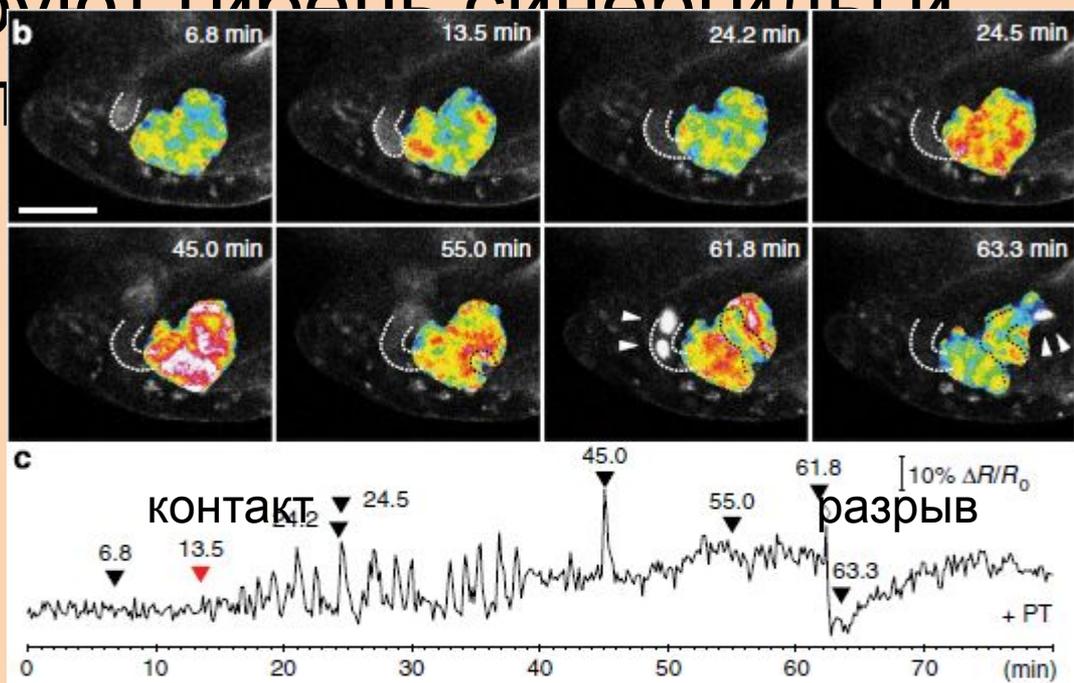


In vivo 2 пика

- Более сложная картина: 2 пика!
- Первый пик соответствует высвобождению спермиев.
- Значение этого спайка не выяснено. Он предшествует секреции белка ЕС1, активирующего спермии. Возможно, этот спайк связан с активацией яйцеклетки.
- Второе транзиторное увеличение кальция в яйцеклетке соответствует плазмогамии.

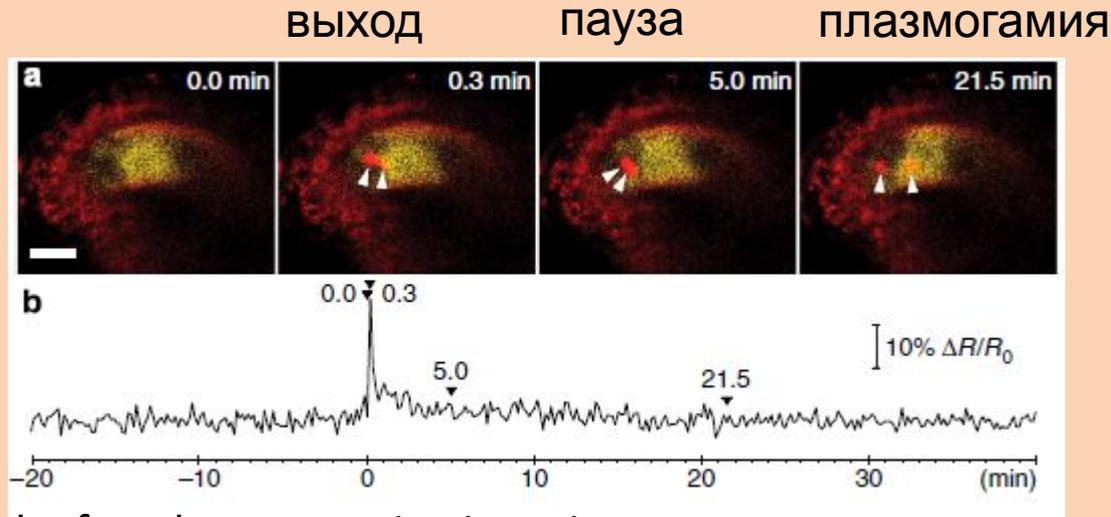
А что в синергидах?

- В синергиде при непосредственном контакте с ней апекса пыльцевой трубки возникали кальциевые осцилляции.
- Возможно, именно эти осцилляции индуцируют гибель синергиды и разрыв т...



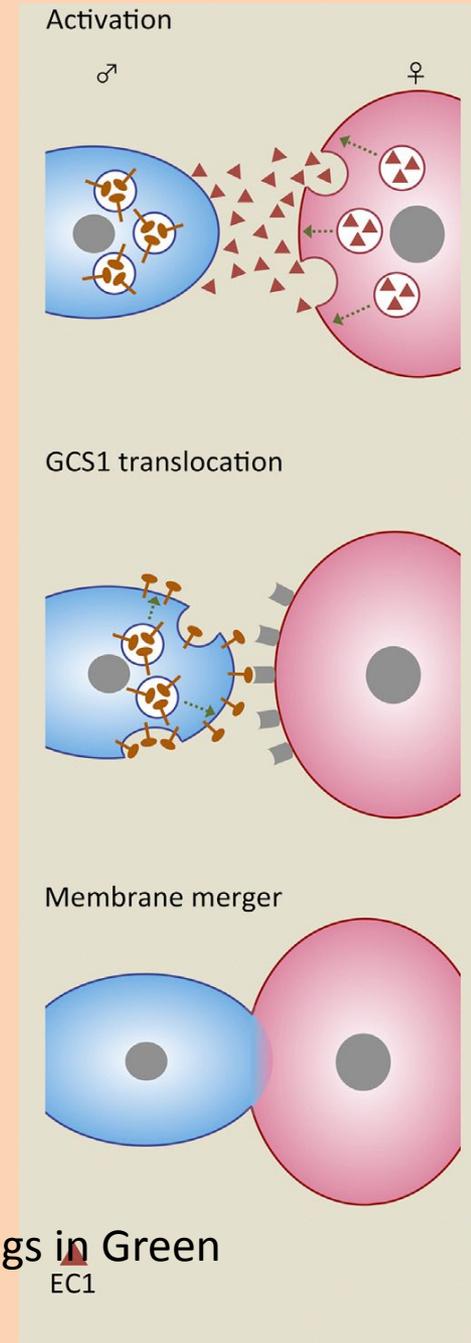
Центральная клетка

- В ЦК наблюдается один короткий пик, соответствующий выходу спермиев из трубки.



Диалог гамет во время «паузы»

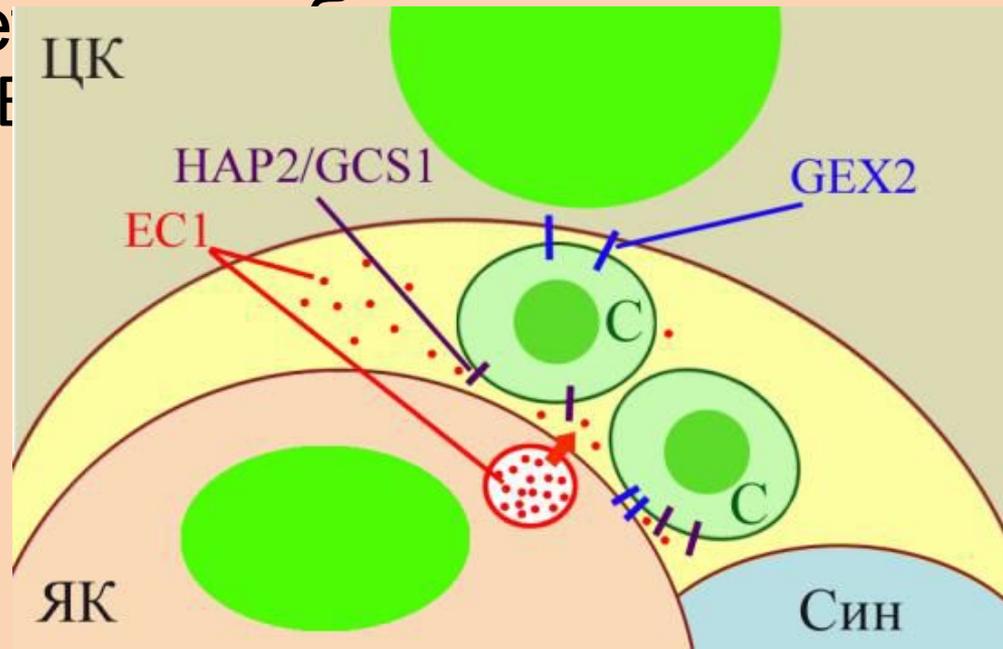
- *GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 (GCS1)* у *Lilium longiflorum* и его ортолог у *Arabidopsis HAPLESS2 (HAP2)* экспрессируется только в генеративной клетке и спермиях.
- GCS1 – это трансмембранный белок, локализованный в плазмалемме.
- GCS1 играет ключевую роль в слиянии спермиев с женскими



Адгезия и слияние

- Оказалось, что адгезия мембран и их слияние – разные процессы.
- Гаметы мутантных растений *hap2/gcs1* успешно проходили стадию адгезии мембран, но они были не способны к слиянию
- *GAMETE EXPRESSED 2 (GEX2)* зато экспрессировался только в спермиях.
- У мутантов *gex2* было нарушено прикрепление спермиев к одной из женских гамет или к обеим, что не характерно для мутантов *gcs1*.
- По-видимому, *GEX2* контролирует этап адгезии гамет, а не их слияния.
- Остается открытым вопрос о белках-партнерах на поверхности яйцеклетки и центральной клетки, с которыми взаимодействует *GEX2*.

- На протяжении роста пыльцевой трубки *Arabidopsis* белок HAP2/GCS1 локализован в эндомембранной системе спермиев.
- Он выходит на поверхность в процессе активации спермиев, которую инициирует яйцеклетка.
- Когда пыльцевая трубка лопаается, высвобождая спермии, яйцеклетка секретирует белки ЕС1 (ECS1)



амет

Активация гамет

- При этом из эндоплазматической системы на поверхность спермия выходят белки HAR2/GCS1.
- Это происходит одновременно с распадом MGU и разделением спермиев и предшествует плазмогамии.
- Таким образом, гаметы растений, как и других эукариот, приобретают компетентность и способность к слиянию, лишь пройдя этап предварительной активации

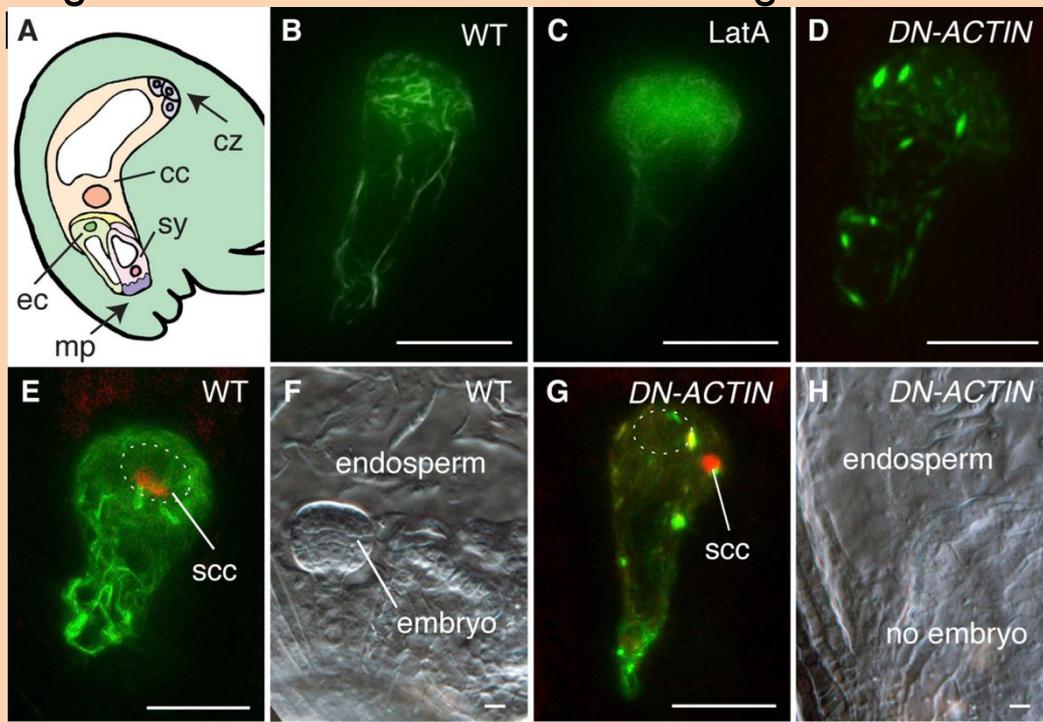
Яйцеклетка: скромная или активная?

- В целом, слияние гамет у растений происходит почти так же, как у животных, однако при другом распределении ролей.
- У животных яйцеклетка остается в состоянии покоя до тех пор, пока не сливается со спермием.
- У *Arabidopsis* перед слиянием активируются обе гаметы, причем ведущую роль играет яйцеклетка.



Итак, слияние

- Каким образом ядро спермия транспортируется к ядру женской гаметы? В яйцеклетках животных эту функцию осуществляют микротрубочки и centrosомы, но у покрытосеменных растений нет centrosом.
- Перемещение ядер спермиев у них осуществляет актинов

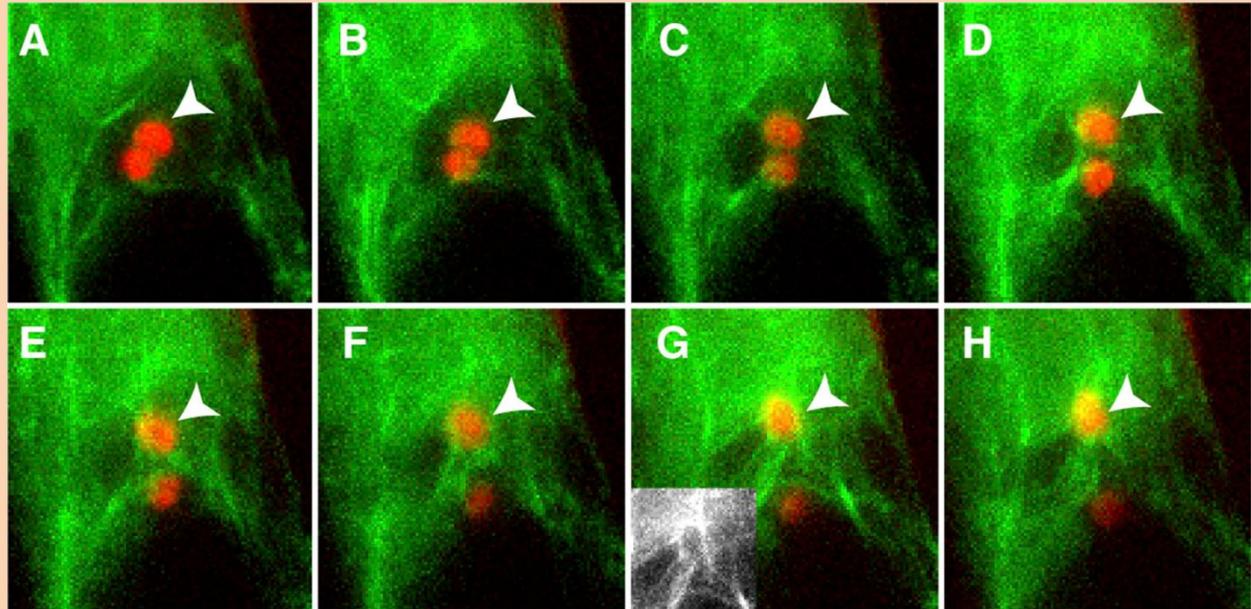
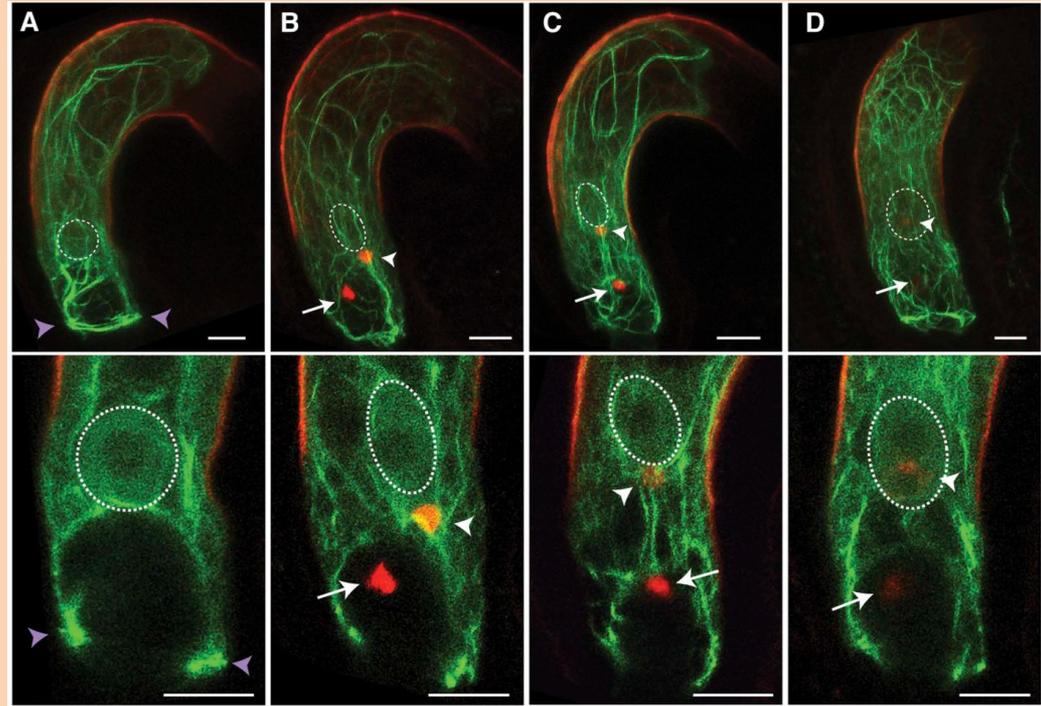


Успешная кариогамия в ДТ

Нет кариогамии баз актина

АКТИН В ЦК

- Актин – основной участник движения ядер спермиев как в ЯК, так и в ЦК
- Его разрушение блокирует

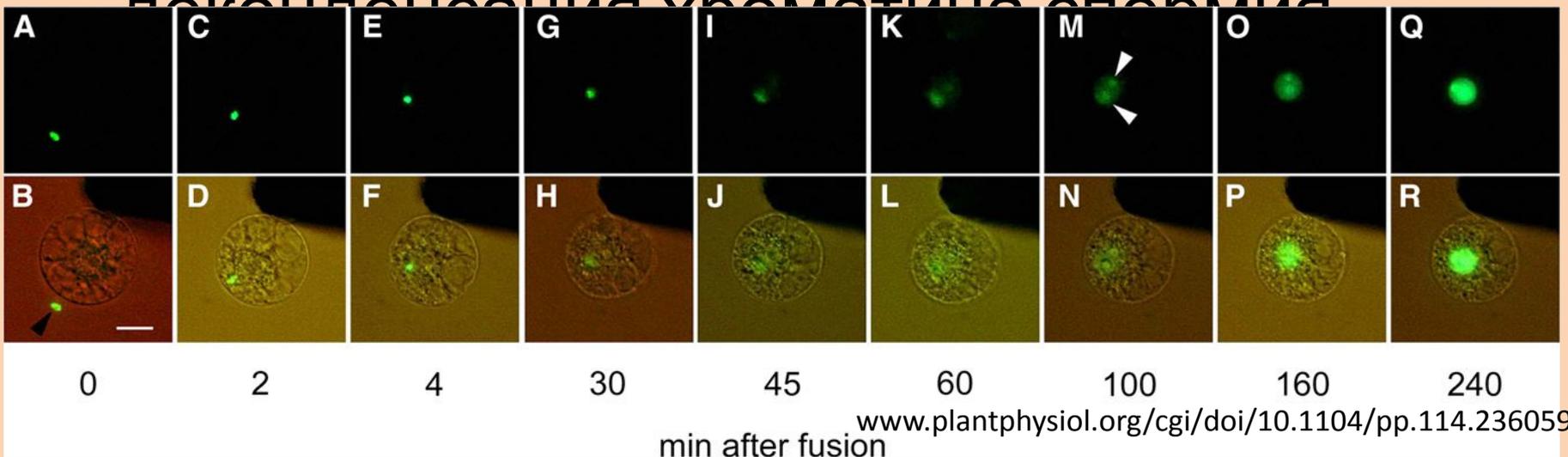


Детали

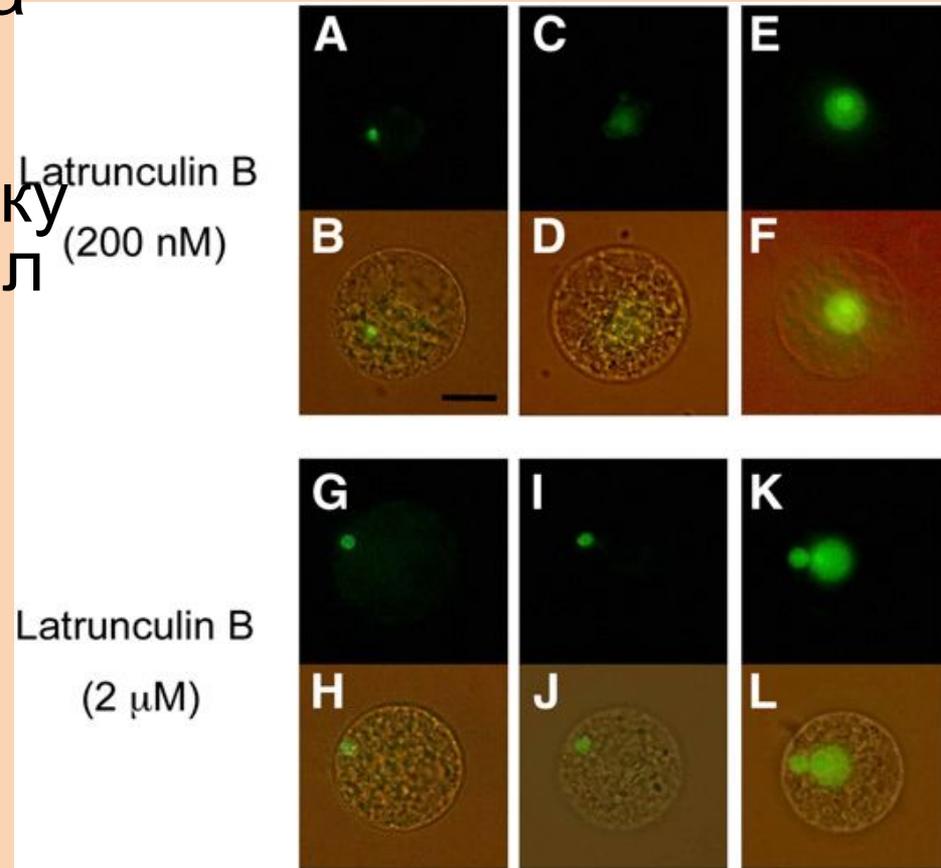
- Ядро спермия, войдя в цитоплазму ЦК, окружалось волокнами F-актина с образованием звездообразной структуры.
- Вся эта структура вместе с ядром спермия мигрировала по направлению к ядру ЦК.
- Актиновая сеть в центральной клетке постоянно движется внутрь – от периферии клетки к ее ядру.
- Этот процесс, по-видимому, играет важную роль в перемещении ядра спермия.

Кариогамия

- 1) наружные ядерные мембраны гамет соприкасаются и затем сливаются,
- 2) внутренние ядерные мембраны сливаются, и формируются мостики между ядрами,
- 3) мостики увеличиваются, и начинается



- В системе *in vitro* у риса путь ядра спермия до ядра яйцеклетки занимал 5-10 мин, причем, как и у *Arabidopsis*, транспортировку ядра спермия осуществлял актиновый цитоскелет.
- Затем начинался процесс кариогамии, и хроматин яйцеклетки переходил в ядро спермия, увеличивая его объем.
- В интервале 30-70 мин после плазмогамии хроматин спермия деконденсировался, и кариогамия завершалась.



Когда «родной» вовсе значит «желанный»

САМОНЕСОВМЕСТИМОСТЬ

Два типа СН

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

Гаметофитная СН. S-RNase

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

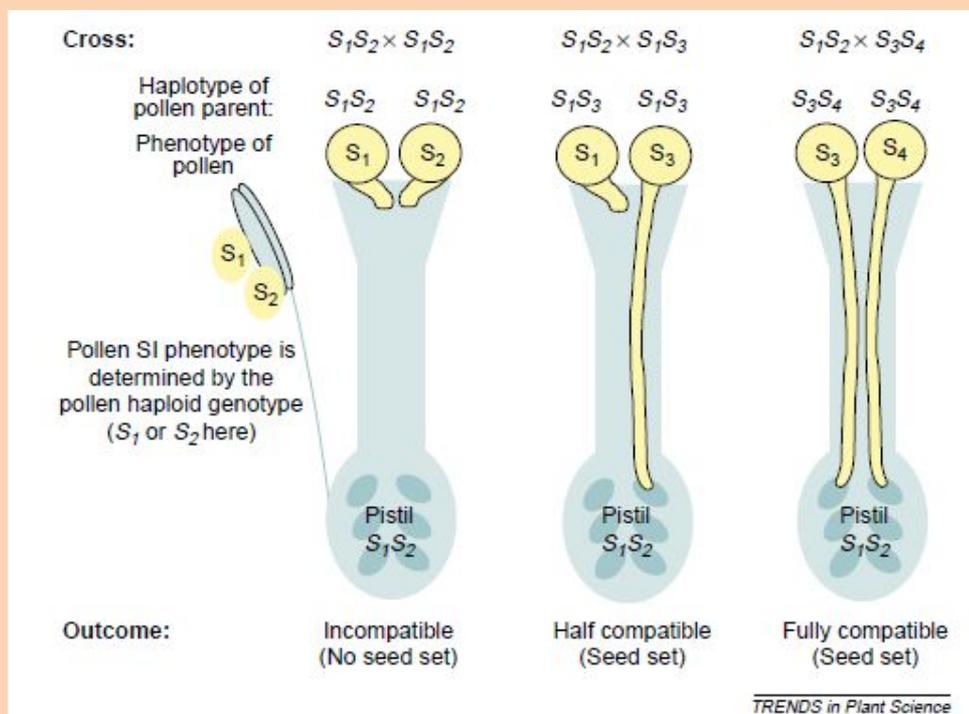
А на рыльце казалось, что всё у нас получится...

- Что же такое S-ген пестика
- Он кодирует рибонуклеазу



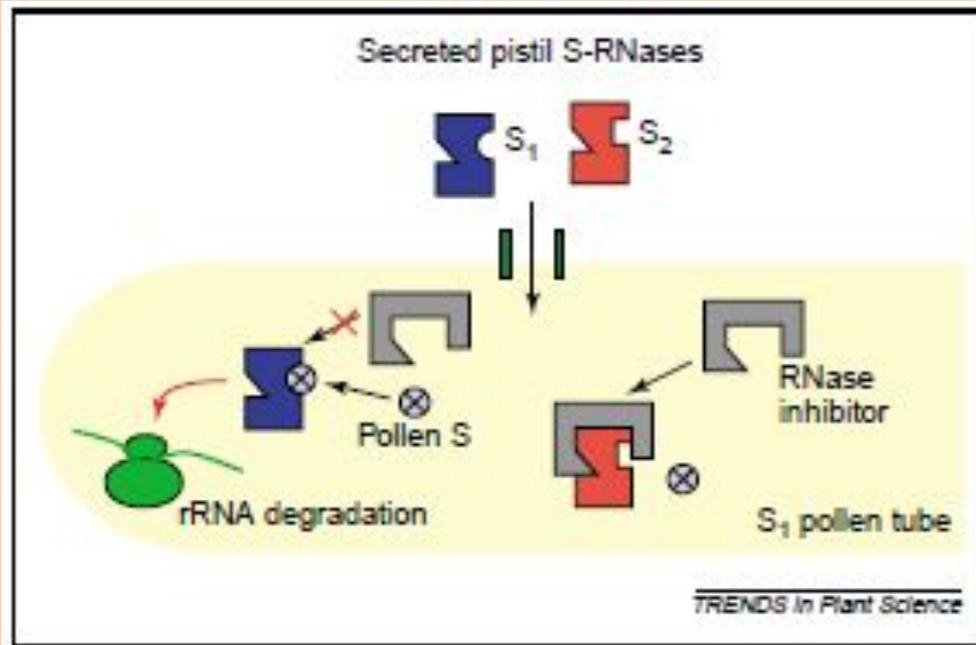
S-РНКаза

- Этот фермент деградирует рРНК в самонесовместимой пыльце
- При потере РНКазной активности СН не работает
- Гены S-РНКаз высоко полиморфны, имеют 2 участка гипервариабельности



Две модели

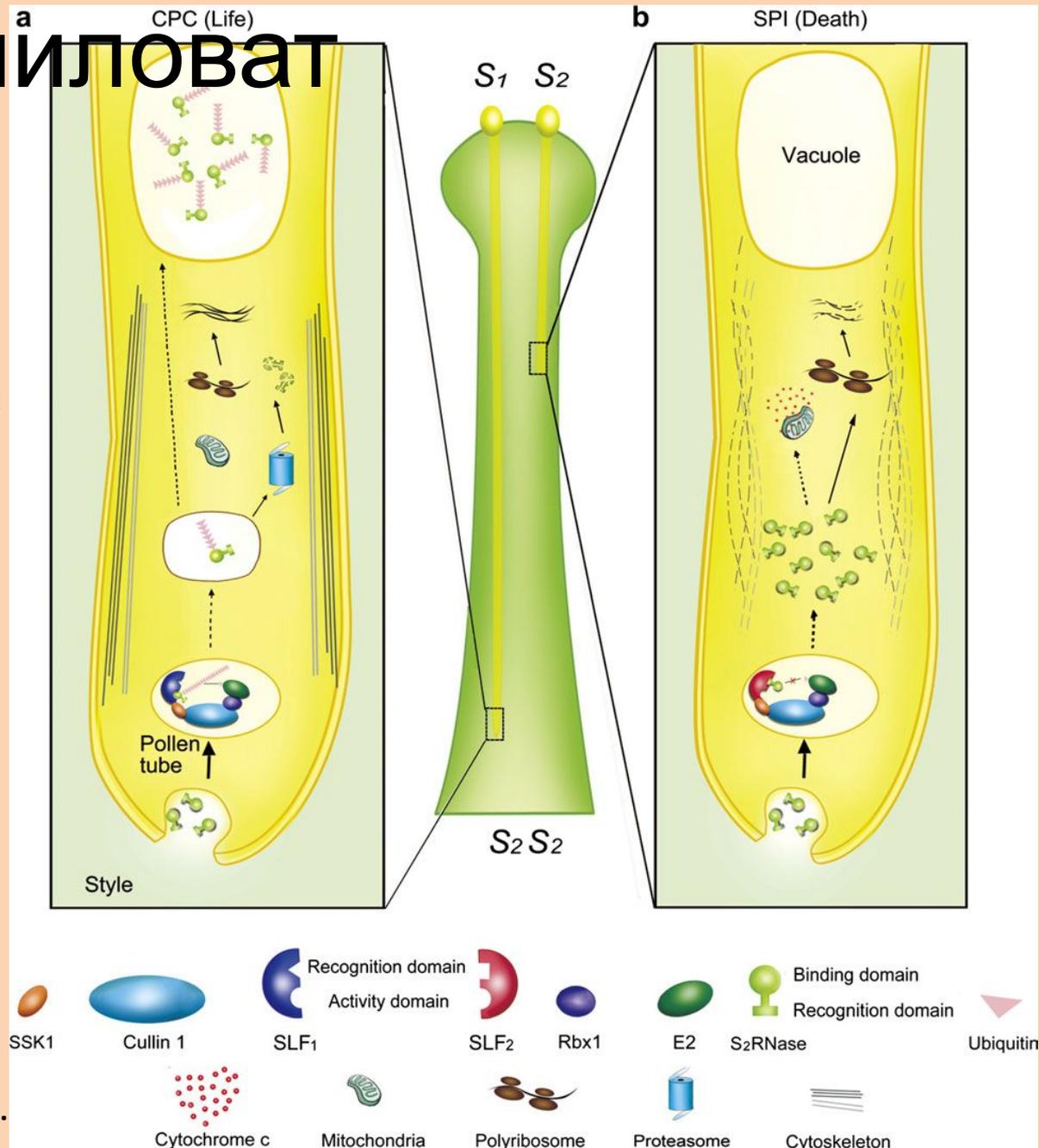
- Думали, что транспорт S-РНКаз в трубку специфичный, и «несвой» просто не заходят
- Но оказалось, что заходят любые, и «решение» принимается внутри



Казнить/помиловать

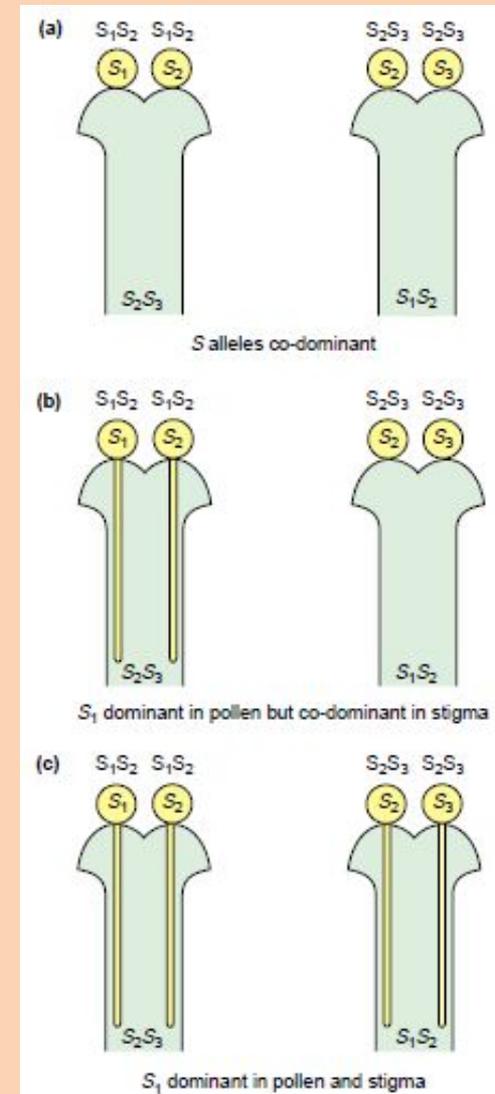
ь

- 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

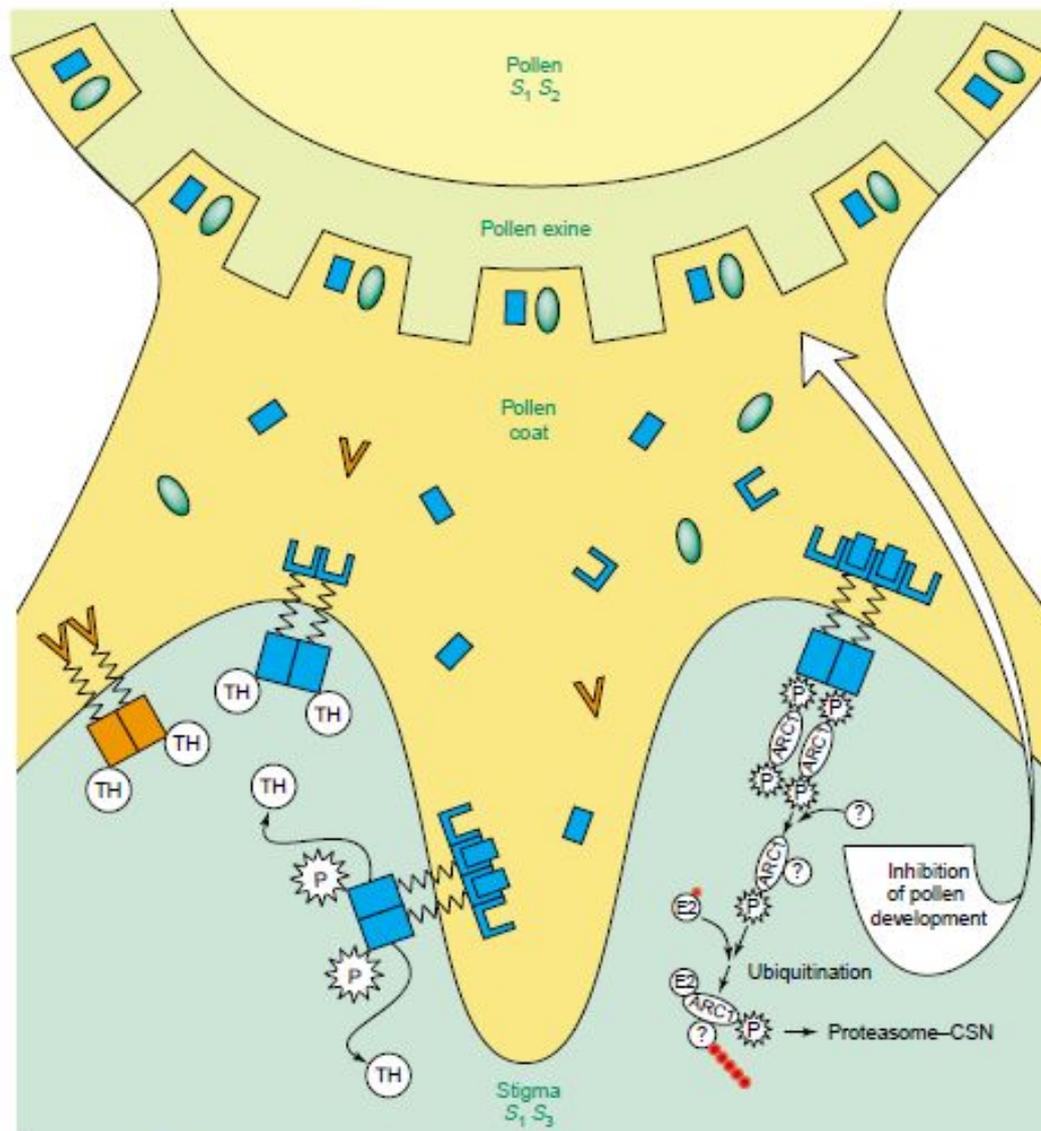


Спорофитная СН у капусты

- 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



- ARC1 взаимодействует с киназным доменом SRK и может провоцировать убиквитинирование белков рыльца
- Очевидно, при СН ответе уничтожаются белки рыльца, которые должны провоцировать/поддерживать рост трубки
- СН и совместимые зерна могут лежать совсем рядом
- Разница между ними будет заметна уже через 10-20 минут