

# Rola tlenu azotu w regulacji stanu acetylacji białek histonowych u *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

Yufeng Guan

Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że duża plastyczność fenotypowa jednego z najbardziej niszczycielskich fitopatogenów na świecie, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, jest efektem mechanizmów epigenetycznych, które umożliwiają mu szybką adaptację do zmiennych sygnałów wewnętrznych i stresorów środowiskowych, w tym również rośliny-gospodarza. Co istotne, 5-metylocytozyna w DNA nie została wykryta u *Phytophthora*, stąd odwracalne modyfikacje białek histonowych, w szczególności acetylacja i deacetylacja, mogą odgrywać kluczową rolę w epigenetycznej kontroli ekspresji genów. U *P. infestans* procesy te są kontrolowane przez 33 acetylotransferazy histonowe (HATs) i 11 deacetylaz histonowych (HDACs). Zarówno u roślin, jak i u zwierząt, cząsteczka sygnałowa - tlenek azotu (NO) może również funkcjonować jako epigenetyczny modulator ekspresji genów. Chociaż rola NO w epigenetyce mikroorganizmów pozostaje niezbadana, cząsteczka ta może być formowana w strukturach patogenów podczas krytycznych przemian rozwojowych i ekspozycji na stresy.

Wobec powyższego, nadrzędnym celem badań było wyjaśnienie, czy i w jakim stopniu, NO oraz następujący stres nitrozacyjny, na który patogen jest narażony podczas swojego cyklu życiowego, wpływa na wzorce (de)acetylacji histonów i zmiany ekspresji genów, prowadzące do efektywnej adaptacji i/lub patogeniczności *P. infestans*. Badania oparto na analizie porównawczej pomiędzy izolatem awirulentnym (Avr) MP946 i wirulentnym (vr) MP977 *P. infestans* względem odmiany ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) Sarpo Mira z genem odporności *R3a*, co pozwoliło na śledzenie zmian, potencjalnie związanych z wirulencją patogenu. Eksperymenty obejmowały fazę saprofityczną (*in vitro*) i pasożytniczą mikroorganizmu (*in planta*). W celu stworzenia warunków stresu nitrozacyjnego patogen był ekspozowany na specyficzne modulatory reaktywnych form azotu (RNS).

W pierwszym etapie badań wykazano, że wzmożone formowanie NO i jego pochodnej, nadtlenoazotynu, towarzyszyło fazie sporulacji oraz wzrostowi patogenu *in planta*. Zarówno w

warunkach *in planta*, jak i *in vitro*, stres nitrozacyjny prowadził do istotnych zmian w globalnej acetylacji histonów H3 i H4. Zaobserwowana hiperacetylacja lizyny 56 histonu H3 (H3K56ac) i lizyny 16 histonu H4 (H4K16ac) korelowała z indukcją ekspresji genów *HATs*, tj., *PifHAM1* i *PifHAC3*, które odpowiedzialne są za formowanie H4K16ac i H3K56ac. Zależne od RNS zmiany w architekturze histonów, w postaci wzbogaconej akumulacji znaczników H3K56ac i H4K16ac, w regionach promotorowych molekularnych markerów fazy biotroficznej patogenu (*Avr3a* i *Hmp1*) oraz innych krytycznych genów związanych z patogenicznością (*CesA1*, *CesA2*, *CesA3*, *sPLD-like1*), wpływały na wzrost ekspresji tych genów.

W kontynuacji badań, przeprowadzona charakterystyka *in silico* i identyfikacja jądrowych HDACs wrażliwych na RNS wykazały, że PifHDAC3 potencjalnie katalizuje deacetylację H3K56ac i reprezentuje najwyższy poziom akumulacji transkryptu w odpowiedzi na NO u *Avr/vr P. infestans*. Ponadto immunoanaliza wykazała, że w środowisku nitrozacyjnym *in vitro* oraz *in planta*, białko PifHDAC3 występuje powszechnie. Nie stwierdzono jednak aby RNS wywołały S-nitrozację i inhibicję PifHDAC3.

Z uwagi na stwierdzony związek PifHDAC3 z kolonizacją ziemniaka przez *P. infestans*, ostatni etap badań wyjaśniał, czy NO i zależne od niego komórkowe zmiany redoks mogą wpływać na rekrutację PifHDAC3 do chromatyny. Analiza immunoprecypitacji chromatyny (ChIP-seq) umożliwiła identyfikację kluczowych procesów bezpośrednio regulowanych przez PifHDAC3 u *P. infestans* w warunkach środowiska nitrozacyjnego. Wykazano, że *loci* genów docelowych dla PifHDAC3 obejmują, m.in., geny zaangażowane w strategię ofensywną *P. infestans*. Stwierdzony efekt był zależny od genotypu patogenu. Dowiedziono, że dostępność NO prowadzi do przemieszczenia PifHDAC3 z promotora *Avr3a*, a zniesienie represyjnej struktury chromatyny umożliwia aktywację transkrypcyjną *Avr3a*.

W podsumowaniu należy podkreślić kluczową rolę NO jako ważnego sygnału epigenetycznego w biologii *P. infestans* oraz dynamiczną interakcję między RNS a HATs/HDACs w regulacji ekspresji genów. Wykazano, że NO/RNS, poprzez zmianę statusu (de)acetylacji histonów, stymulują proces przeprogramowania transkrypcyjnego genów związanych ze strategiami metabolicznymi, rozwojowymi i ofensywnymi patogenu i jego szybką adaptację do nowych środowisk. Wykazano, że sygnalizacja zależna od NO oraz związany z tą cząsteczką stres nitrozacyjny, odgrywają strategiczną rolę u *P. infestans* egzystującego w warunkach presji środowiska.

**Słowa kluczowe:** tlenek azotu, reaktywne formy azotu, stres nitrozacyjny, modyfikacje epigenetyczne, (de)acetylacja histonów, *Phytophthora infestans*, zaraza ziemniaka.