

Rola nitroksylu w dialogu sygnałowym pomiędzy śmiercią a życiem komórek liści ziemniaka podczas reakcji nadwrażliwości na *Phytophthora infestans*

W interakcji roślina–patogen, rozpoznanie przez receptory roślinne (R) czynników awirulencji patogenu (Avr), wyzwała odpowiedzi obronne gospodarza poprzez aktywację śmierci komórek, w postaci reakcji nadwrażliwości (HR), co przyczynia się do hamowania rozprzestrzeniania się patogenu. Proces HR jest związany z kaskadą zdarzeń, m.in. szybkim generowaniem reaktywnych form tlenu i azotu (RFA), akumulacją kwasu salicylowego (SA), zmianą potencjału redoks, aktywacją enzymów proteolitycznych prowadzących do degradacji składników komórkowych, a w końcu śmierci komórki. Jednakże mechanizm, który kontroluje zasięg obumierania komórek podczas HR i przenosi wygenerowane sygnały na sensory zależne od potencjału redoks, wyzwalające dystalne odpowiedzi obronne, pozostaje nadal nie w pełni poznany w układzie odpornościowym roślin. Po rozpoznaniu patogenu, szybkie generowanie tlenku azotu (*NO) staje się krytycznym przełącznikiem w sieci sygnałowej odporności, co uruchamia lokalne i systemiczne odpowiedzi obronne. Opublikowane wyniki naszych badań udokumentowały, m.in., iż inokulacja roślin ziemniaka Avr *Phytophthora infestans* prowadzi do dwufazowego wybuchu *NO. W dialogu *NO z indukowanym przez SA stanem podwyższonego potencjału redoks, obserwuje się tworzenie innych biologicznie aktywnych RFA w zaatakowanej komórce gospodarza (np. Arasimowicz-Jelonek i Floryszak-wieczorek 2015). Nasze niedawne pionierskie odkrycie, związane z detekcją i wizualizacją endogennego nitroksylu (HNO) w komórkach liści *Arabidopsis*, poddanych stresom abiotycznym (indukowane ciemnością starzenie lub niedotlenienie) (Arasimowicz-Jelonek i in. 2023), skłoniło nas do podjęcia dalszych badań nad rolą HNO w odporności ziemniaka na stres biotyczny. Chociaż nitroksyl jest blisko spokrewniony z *NO, przez jego jednoelektronową redukcję i protonację, to jednak bioaktywność HNO może się różnić od *NO. Nitroksyl może zatem funkcjonować jako cząsteczka alternatywna lub konkurencyjna w stosunku do *NO, która może być zaangażowana w sieć sygnałową regulującą procesy biologiczne w szerokim zakresie jej oddziaływań. Co najistotniejsze, opublikowane dane dotyczące chemizmu HNO potwierdzają, że tiole i białka zawierające tiole są potencjalnymi celami działania nitroksylu, co skutkuje formowaniem nieusieciowanych sulfinamidów i wiązań dwusiarczkowych, za pomocą których HNO wywołuje efekty biologiczne. **Proponowane badania dotyczą poznania bioaktywności nitroksylu w odporności typu HR, u genotypu ziemniaka R3a względem Avr3a *P. infestans*, grzybopodobnego łęgniowca wywołującego chorobę zwaną zarazą ziemniaka. Projekt zakłada identyfikację bezpośrednich celów molekularnych HNO, co udokumentuje nieznane dotąd powiązania funkcjonalne generowania sygnału HNO we wczesnej sekwencji zdarzeń HR. Pierwszy etap projektu będą stanowiły: monitorowanie produkcji HNO i *NO *in vivo*, badanie poziomu SA i zależnej od HNO akumulacji jonów Ca^{2+} oraz cGMP, w liściach ziemniaka inokulowanych Avr *P. infestans*. Dalsze zaplanowane przez nas eksperymenty pozwolą odpowiedzieć na kluczowe pytanie postawione w projekcie, tj., czy i w jaki sposób HNO reguluje lub blokuje śmierć komórek podczas HR. Zakładamy, że HNO bierze udział w precyzyjnej regulacji sieci proteolitycznych powiązań podczas fazy egzekucji i ograniczania zasięgu HR. Dlatego nasze badania skupimy na katepsynie B (CathB) -proteazie cysteinowej, na poziomie analizy transkryptu, białka i aktywności enzymatycznej. CathB, odpowiedzialna za degradację białek endogennych i regulację aktywnej śmierci komórek, stanowi jeden z najlepiej poznanych celów biologicznych hamowanych przez HNO w organizmach ssaków. Inne krytyczne enzymy proteolityczne zawierające cysteinę, takie jak: SAG12 - proteaza związana ze starzeniem, StSBTc-3 - proteaza podobna do subtilizyny i ATG8 - białko podobne do ubikwityny, mogą być również podatnymi celami działania HNO, zatem analizie zostanie poddana również ekspresja genów kodujących wymienione białka. W ostatnim etapie realizacji projektu, eksperymenty dotyczą wdrożenia szeregu zaawansowanych patofizjologicznych technik oraz wysoce innowacyjnych technologii, które pomogą zidentyfikować przestrzenne cele HNO, w strefie śmierci/życia komórek, mające związek z dystalnymi sygnałami oporności. Jak dotąd, w świecie zwierząt istnieją ograniczone badania nad identyfikacją molekularnych sensorów HNO i zależnym od HNO przeprogramowaniem transkrypcyjnym, które może promować lub osłabiać odporność organizmu. Dotąd nie podjęto podobnych badań u roślin.**