



Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

---

ROZPRAWA DOKTORSKA

---

*mgr Ada Połowska*

Identyfikacja acylotransferaz lizofosfolipidów  
okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* oraz  
charakterystyka tych zidentyfikowanych ze  
szczególnym uwzględnieniem acylotransfereazy  
acylo-CoA:lizofosfatylocholina

Identification of lysophospholipid acyltransferases in the diatom  
*Phaeodactylum tricornutum* and characterization of the identified  
ones, with particular emphasis on the lysophosphatidylcholine  
acyltransferase

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie naukowej biotechnologia

Promotor: prof. dr hab. Antoni Banaś  
Promotor pomocniczy: dr Katarzyna Jasieniecka-Gazarkiewicz  
Zakład Biochemii Roślin MWB

GDAŃSK 2024

Badania zostały przeprowadzone w ramach projektu SHENG 1 o tytule:  
„Specyficzność substratowa LPCATów z fotosyntetyzujących glonów  
jednokomórkowych akumulujących oleje, w reakcjach do przodu i do tyłu  
oraz charakterystyka ich funkcji w edycji grup acylowych  
fosfatydylocholiny”.

Numer projektu: UMO-2018/30/Q/NZ3/00497.



N A R O D O W E   C E N T R U M   N A U K I

Część badań prezentowanych w niniejszej pracy została już opublikowana w dwóch czasopismach naukowych:

1. Połośńska A., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., You L., Hao X., Klińska S., Gong Y., Banaś A. (2021) Diatoms and plants acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferases (LPCATs) exhibit diverse substrate specificity and biochemical properties. *International Journal of Molecular Sciences* 22(16): 9056.
2. You L., Połośńska A., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Richard F., Jouhet J., Maréchal E., Banaś A., Hu H., Pan Y., Hao X., Jin H., Allen A. E., Amato A., Gong Y. (2024) Two plastidial lysophosphatidic acid acyltransferases differentially mediate the biosynthesis of membrane lipids and triacylglycerols in *Phaeodactylum tricorutum*. *New Phytologist* 241(4): 1543-1558.

Chciałabym serdecznie podziękować **prof. dr hab. Antoniemu Banasiowi** za poświęcony mi czas, przekazaną wiedzę i pomoc podczas pisania niniejszej pracy.

Dziękuję **dr Katarzynie Jasienieckiej-Gazarkiewicz** za pomoc w realizacji eksperymentów.

Dziękuję **dr Sylwii Klińskiej-Bąchor** oraz **dr Kamilowi Demskiemu** za wprowadzenie mnie do laboratorium – naukę metod, poświęcony czas i pomoc.

Z całego serca dziękuję mojemu **Bartkowi** za cierpliwość, zrozumienie, motywację i wsparcie w trudnych momentach.

Dziękuję również moim **Rodzicom** i **Siostrze**, którzy zawsze we mnie wierzyli.

## SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów.....	9
Streszczenie.....	11
Abstract.....	15
Wprowadzenie i cele pracy.....	18
<b>1. PRZEGLĄD LITERATURY.....</b>	<b>21</b>
1.1. Okrzemki – fotosyntetyczne mikroalgi produkujące oleje.....	21
1.2. Rzodkiewnik pospolity ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) – modelowa roślina oleista wykorzystywana w badaniach .....	22
1.3. Charakterystyka i biosynteza kwasów tłuszczowych.....	23
1.3.1. Struktura kwasów tłuszczowych.....	23
1.3.2. Biosynteza kwasów tłuszczowych.....	26
1.3.3. Wykorzystanie <i>de novo</i> zsyntetyzowanych kwasów tłuszczowych przez komórkę (szlak prokariotyczny i eukariotyczny).....	29
1.4. Charakterystyka i biosynteza fosfolipidów.....	30
1.4.1. Budowa, funkcja i znaczenie fosfolipidów.....	30
1.4.2. Szlaki biosyntezy fosfolipidów.....	34
1.5. Charakterystyka i biosynteza triacylogliceroli.....	38
1.5.1. Budowa, funkcja i znaczenie triacylogliceroli.....	38
1.5.2. Szlaki biosyntezy triacylogliceroli.....	38
1.6. Enzymy typu LPLAT (acyloransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid).....	40
1.7. Remodelowanie fosfolipidów.....	41
1.8. Charakterystyka i biosynteza VLC-PUFA (bardzo długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych).....	43
1.8.1. Rola VLC-PUFA w diecie człowieka.....	43
1.8.2. Szlaki biosyntezy VLC-PUFA.....	46
1.9. Wykorzystanie inżynierii genetycznej do produkcji VLC-PUFA w roślinach wyższych.....	51
<b>2. MATERIAŁY.....</b>	<b>57</b>
2.1. Sklonowane geny z okrzemka <i>Phaeodactylum tricornutum</i> potencjalnie kodujące acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLATy).....	57
2.2. Szczepy drożdży.....	57
2.3. Szczepy bakterii.....	58

2.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> (rzodkiewnik pospolity).....	59
2.5. Podłoża hodowlane.....	59
2.6. Startery.....	60
2.7. Wektory.....	62
2.8. Odczynniki do reakcji PCR.....	64
2.9. Odczynniki do mutagenyzy i składania kaset ekspresyjnych tworzonych systemem klonowania Golden Gate.....	65
2.10. Antybiotyki.....	65
2.11. Odczynniki do izolacji DNA genomowego.....	65
2.12. Odczynniki do elektroforezy w żelu agarozowym.....	66
2.13. Bufor do transformacji <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	66
2.14. Odczynniki do transformacji bakterii.....	66
2.15. Odczynniki do transformacji drożdży.....	67
2.16. Odczynniki do ekstrakcji lipidów, chromatografii cienkwarstwowej i chromatografii gazowej.....	67
2.17. Odczynniki do reakcji cięcia fosfolipazą A <sub>2</sub> .....	67
2.18. Odczynniki do izolacji frakcji mikrosomalnych z drożdży.....	68
2.19. Odczynniki do syntezy [ <sup>14</sup> C]acylo-CoA oraz acylo-CoA.....	68
2.20. Odczynniki do reakcji enzymatycznych <i>in vitro</i> .....	68
2.21. Gotowe zestawy.....	69
2.22. Aparatura.....	69
2.23. Programy komputerowe.....	70
<b>3. METODY.....</b>	<b>71</b>
3.1. Hodowla <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	71
3.2. Transformacja <i>Arabidopsis thaliana</i> metodą „floral dip”.....	71
3.3. Selekcja nasion po transformacji <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	72
3.4. Izolacja DNA genomowego z <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	72
3.5. Transformacja komórek kompetentnych <i>Escherichia coli</i> .....	73
3.6. Transformacja <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	73
3.7. Ekstrakcja lipidów z komórek roślinnych.....	74
3.8. Chromatografia cienkwarstwowa.....	74
3.9. Chromatografia gazowa.....	75
3.10. Izolacja frakcji mikrosomalnej z <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	77

3.11. Synteza acylo-CoA oraz [ <sup>14</sup> C]acylo-CoA na potrzeby przeprowadzenia reakcji enzymatycznych.....	78
3.12. Przygotowanie [ <sup>14</sup> C]18:1-LPC na potrzeby przeprowadzenia reakcji enzymatycznych.....	80
3.13. Procedura reakcji enzymatycznych typu <i>forward</i> katalizowanych przez enzymy LPLAT <i>in vitro</i> .....	81
3.14. Optymalizacja parametrów reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzymy PtLPCAT1 obecne we frakcjach mikrosomalnych z drożdży Y02431 ( <i>ΔALE1</i> ) transformowanych genem <i>Phatr3_J20460</i> .....	82
3.15. Aktywność PtLPCAT1 w stosunku do pozycji <i>sn-1</i> i <i>sn-2</i> odpowiednich izomerów lizofosfatydylocholiny.....	82
3.16. Aktywność oraz specyficzność substratowa enzymu PtLPCAT w stosunku do różnych lizofosfolipidów i różnych acylo-CoA.....	83
3.17. Procedura reakcji enzymatycznych typu <i>backward</i> (do tyłu) katalizowanych przez enzymy typu LPCAT <i>in vitro</i> .....	84
3.18. Przygotowanie kasety ekspresyjnej zawierającej geny kodujące enzymy szklaku biosyntezy EPA metodą klonowania Golden Gate.....	85
3.18.1. Mutageneza.....	85
3.18.2. Wycinanie fragmentu DNA kodującego oporność na antybiotyk kanamycynę (do selekcji transformowanych roślin) z plazmidu pLCSL70004.....	88
3.18.3. Dodanie do zmutowanych sekwencji genów, fragmentów DNA rozpoznawanych przez enzym BsaI.....	89
3.18.4. Złożenie jednostek transkrypcyjnych w plazmidach poziomu pierwszego.....	90
3.18.5. Złożenie wielogenowych konstruktów w plazmidzie poziomu drugiego.....	92
3.18.6. Amplifikacja genów wchodzących w skład kaset ekspresyjnych.....	93
3.19. Analiza statystyczna.....	94
<b>4. WYNIKI.....</b>	<b>95</b>
4.1. Badania nad określeniem funkcji sklonowanych genów z okrzemka <i>Phaeodactylum triconutum</i> potencjalnie mogących kodować enzymy typu LPLAT.....	95
4.1.1. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „A” kodowanego przez gen <i>Phatr3_J54709</i> .....	96
4.1.2. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „B” kodowanego przez gen <i>Phatr3_J11916</i> .....	99

4.1.3. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „C” kodowanego przez gen <i>Phatr3_J40461</i> .....	102
4.1.4. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „D” kodowanego przez gen <i>Phatr3_J43099</i> .....	104
4.1.5. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „F” kodowanego przez gen <i>Phatr3_J20460</i> .....	106
4.1.6. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „G” kodowanego przez gen <i>Phatr3_J48640</i> .....	110
4.2. Charakterystyka reakcji enzymatycznych <i>in vitro</i> katalizowanych przez enzymy LPAAT (acylotransferazy acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy) kodowane przez geny <i>Phatr3_J11916</i> oraz <i>Phatr3_J43099</i> sklonowane z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> .....	113
4.2.1. Specyficzność substratowa enzymów typu LPAAT (acylotransferazy acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy) kodowanych przez geny <i>Phatr3_J11916</i> oraz <i>Phatr3_J43099</i> sklonowane z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> .....	113
4.2.2. Wpływ różnych parametrów reakcji na aktywność enzymów LPAAT (acylotransferaza acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy) kodowanych przez geny <i>Phatr3_J11916</i> oraz <i>Phatr3_J43099</i> sklonowane z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> .....	121
4.3. Charakterystyka reakcji enzymatycznych <i>in vitro</i> typu <i>forward</i> katalizowanych przez enzym LPCAT (acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> .....	129
4.3.1. Optymalizacja reakcji enzymatycznych <i>in vitro</i> katalizowanych przez enzym LPCAT (acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> .....	128
4.3.2. Specyficzność substratowa enzymu LPCAT (acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) kodowanego przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> .....	135
4.4. Remodelowanie <i>in vitro</i> fosfolipidów, w tym głównie fosfatydylocholiny, badanych frakcji mikrosomalnych w reakcjach katalizowanych przez enzym <i>PtLPCAT</i> - acylotransferazę acylo-CoA:lizofosfatydylocholina kodowaną przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> .....	144
4.4.1. Remodelowanie fosfolipidów zawierających kwasy tłuszczowe naturalnie występujące we frakcjach mikrosomalnych z drożdży przez enzym LPCAT	

(acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> .....	145
4.4.2. Remodelowanie fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży o zmodyfikowanym <i>in vitro</i> składzie kwasów tłuszczowych, przez <i>PtLPCAT</i> (enzym kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> ).....	151
4.4.2.1. Wpływ acylo-CoA i wprowadzonych modyfikacji frakcji mikrosomalnych (izolowanych z drożdży nadeksprymujących <i>PtLPCAT1</i> - enzym kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> ) na całkowitą intensywność remodelowania zawartych w nich cząsteczek PC.....	152
4.4.2.2. Udział reakcji typu <i>backward</i> oraz udział innego typu reakcji w remodelowaniu fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących <i>PtLPCAT1</i> (enzym kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> ) wzbogaconych o <i>sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC</i> .....	155
4.4.2.3. Udział reakcji typu <i>backward</i> oraz udział innego typu reakcji w remodelowaniu fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących <i>PtLPCAT1</i> (enzym kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> ) wzbogaconych o <i>sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC</i> .....	158
4.4.2.4. Udział reakcji typu <i>backward</i> oraz udział innego typu reakcji w remodelowaniu fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących <i>PtLPCAT1</i> (enzym kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> ) wzbogaconych o <i>sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC</i> .....	161
4.4.2.5. Udział reakcji typu <i>backward</i> oraz udział innego typu reakcji w remodelowaniu fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących <i>PtLPCAT1</i> (enzym kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> ) wzbogaconych o <i>sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC</i> .....	163
4.4.2.6. Udział reakcji typu <i>backward</i> oraz udział innego typu reakcji w remodelowaniu fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących <i>PtLPCAT1</i> (enzym kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> ) wzbogaconych o <i>sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC</i> .....	166
4.4.2.7. Względna aktywność typu <i>backward</i> wykazywana przez <i>PtLPCAT1</i> (enzym kodowany przez gen <i>Phatr3_J20460</i> sklonowany z okrzemka <i>Phaeodactylum tricorutum</i> ) w procesie remodelowania PC zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych w testach z różnymi [ <sup>14</sup> C]acylo-CoA.....	168



4.4.2.8. Procent kwasów tłuszczowych wymienionych w puli PC badanych frakcji mikrosomalnych w reakcjach typu <i>backward</i> katalizowanych przez <i>PtLPCAT</i> oraz całkowity procent tej wymiany.....	170
4.4.2.9. Remodelowanie fosfatydylocholiny zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących <i>PtLPCAT1</i> w testach kompetencji z wykorzystaniem mieszanin pięciu acylo-CoA.....	173
4.4.2.10. Remodelowanie fosfatydylocholiny zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących drożdżowy <i>LPCAT</i> - „ALE1” lub nadeksprymujących <i>AtLPCAT2</i> w testach kompetencji z wykorzystaniem mieszanin pięciu acylo-CoA.....	177
4.4.3. Wpływ różnych parametrów reakcji na intensywność procesu remodelowania PC frakcji mikrosomalnej z drożdży nadeksprymujących <i>PtLPCAT1</i> wzbogaconej o <i>sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC</i> .....	181
4.5. Próba uzyskania transgenicznych roślin <i>A. thaliana</i> produkujących bardzo długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3.....	186
<b>5. DYSKUSJA.....</b>	<b>198</b>
5.1. Acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid.....	198
5.2. Reakcje typu <i>forward</i> przeprowadzane przez <i>PtLPCAT1</i> .....	201
5.3. Reakcje typu <i>backward</i> przeprowadzane przez <i>PtLPCAT1</i> i reakcje „innego” typu włączone w proces remodelowania fosfolipidów - głównie fosfatydylocholiny.....	204
5.4. Remodelowanie PC badanych frakcji mikrosomalnych przez <i>PtLPCAT1</i> oraz przez inne <i>LPCATy</i> - testy kompetencji.....	209
5.5. Wpływ czynników środowiskowych na aktywność <i>PtLPCAT1</i> .....	212
5.6. Enzymy typu <i>LPAAT</i> kodowane przez geny sklonowane z <i>P. tricornutum</i> .....	215
5.7. Transgeniczne rośliny <i>A. thaliana</i> z genami szlaku biosyntezy VLC-PUFA.....	218
<b>6. WNIOSKI.....</b>	<b>220</b>
<b>7. SPIS LITERATURY.....</b>	<b>223</b>
<b>8. SUPLEMENT.....</b>	<b>233</b>

## WYKAZ SKRÓTÓW

ACC	karboksylaza acetylo-CoA (ang. <i>acetyl-CoA carboxylase</i> )
ACP	białkowy nośnik reszt acylowych (ang. <i>acyl carrier protein</i> )
ALA	kwasy $\alpha$ -linolenowy (ang. <i><math>\alpha</math>-linolenic acid</i> )
ARA	kwasy arachidonowy (ang. <i>arachidonic acid</i> )
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BL	lipidy betainowe (ang. <i>betaine lipids</i> )
BSA	surowicza albumina bydłęca (ang. <i>bovine serum albumin</i> )
CoA	koenzym A (ang. <i>coenzyme A</i> )
DAG	diacyloglicerol (ang. <i>diacylglycerol</i> )
DGAT	acylotransferazy acylo-CoA:diacyloglicerol (ang. <i>diacylglycerol acyltransferase</i> )
DGDG	digalaktozyldiacyloglicerol (ang. <i>digalactosyldiacylglycerol</i> )
DGLA	kwasy dihomo- $\gamma$ -linolenowy (ang. <i>dihomo-<math>\gamma</math>-linolenic acid</i> )
DHA	kwasy dokozaheksaenowy (ang. <i>docosahexaenoic acid</i> )
DPA	kwasy dokozapentaenowy (ang. <i>docosapentaenoic acid</i> )
DTNB	kwasy 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy)
EPA	kwasy eikozapentaenowy (ang. <i>eicosapentaenoic acid</i> )
FAS	syntaza kwasów tłuszczowych (ang. <i>fatty acid synthase</i> )
FAT	tioesteraza acylo-ACP (ang. <i>fatty acyl-ACP thioesterases</i> )
G3P	3-fosfoglicerol (ang. <i>glycero-3-phosphate</i> )
GC	chromatografia gazowa (ang. <i>gas chromatography</i> )
GLA	kwasy $\gamma$ -linolenowy (ang. <i><math>\gamma</math>-linolenic acid</i> )
GPAT	acylotransferaza acylo-CoA:3-fosfoglicerol (ang. <i>glycerol-3-phosphate acyltransferase</i> )
LA	kwasy linolowy (ang. <i>linoleic acid</i> )
LPA	kwasy lizofosfatydowy (ang. <i>lysophosphatidic acid</i> )
LPAAT	acylotransferaza acylo-CoA:kwasy lizofosfatydowy (ang. <i>lysophosphatidic acid acyltransferase</i> )
LPC	lizofosfatydylocholina (ang. <i>lysophosphatidylcholine</i> )
LPCAT	acylotransferaza acylo-CoA: lizofosfatydylocholina (ang. <i>lysophosphatidylcholine acyltransferase</i> )
LPE	lizofosfatydyloetanolamina (ang. <i>lysophosphatidylethanolamine</i> )

LPEAT	acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina (ang. <i>lysophosphatidylethanolamine acyltransferase</i> )
LPG	lizofosfatydyloglicerol (ang. <i>lysophosphatidylglycerol</i> )
LPI	lizofosfatydyloinozytol (ang. <i>lysophosphatidylinositol</i> )
LPL	lizofosfolipid (ang. <i>lysophospholipids</i> )
LPLAT	acyloransferaza acylo-CoA:lizofosfolipid (ang. <i>acylo-CoA:lysophospholipids acyltransferase</i> )
LPS	lizofosfatydyloseryna (ang. <i>lysophosphatidylserine</i> )
MF	białko wielofunkcyjne (ang. <i>multifunctional</i> )
KAS	syntaza 3-ketoacylo-ACP (ang. <i>ketoacyl synthase</i> )
MGDG	monogalaktozyldiacylloglicerol (ang. <i>monogalactosyldiacylglycerol</i> )
MS	kompleks wielobiałkowy (ang. <i>multisubunit</i> )
PA	kwas fosfatydowy (ang. <i>phosphatidic acid</i> )
PAP	fosfataza kwasu fosfatydowego (ang. <i>phosphatidic acid phosphatase</i> )
CDP-DAG	cytydino-diacylloglicerol (ang. <i>cytidine diacylglycerol</i> )
PC	fosfatydylocholina (ang. <i>phosphatidylcholine</i> )
PDAT	acylotransferaza fosfolipid:diacyloglicerol, (ang. <i>phospholipid:diacylglycerol acyltransferase</i> )
PE	fosfatydyloetanolamina (ang. <i>phosphatidylethanolamine</i> )
PG	fosfatydyloglicerol (ang. <i>phosphatidylglycerol</i> )
PI	fosfatydyloinozytol (ang. <i>phosphatidylinositol</i> )
PS	fosfatydyloseryna (ang. <i>phosphatidylserine</i> )
<i>Pt</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
SAD	desaturaza stearoilo-ACP (ang. <i>stearoyl-ACP desaturase</i> )
SDA	kwas stearydynowy (ang. <i>stearidonic acid</i> )
ETA	kwas eikozatetraenowy (ang. <i>eicosatetraenoic acid</i> )
SQDG	sulfochinowozylodiacylloglicerol (ang. <i>sulfoquinovosyldiacylglycerol</i> )
TAG	triacyloglicerol (ang. <i>triacylglycerol</i> )
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (ang. <i>thin layer chromatography</i> )
VLC-PUFA	bardzo długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. <i>very long-chain polyunsaturated fatty acids</i> )

## STRESZCZENIE

Enzymy z grupy acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT) występują powszechnie u roślin, zwierząt i mikroorganizmów. Biorą one udział w remodelowaniu składu kwasów tłuszczowych fosfolipidów oraz cytoplazmatycznej puli acylo-CoA poprzez katalizowanie tak zwanych reakcji *forward* jak i *backward*. Reakcja *forward* polega na przyłączaniu odpowiedniego kwasu tłuszczowego (pochodzącego z puli acylo-CoA) do określonego lizofosfolipidu w wyniku czego syntetyzowany jest odpowiadający mu fosfolipid. Natomiast w reakcji *backward* kwas tłuszczowy jest odłączany od fosfolipidu, przyłączany do CoA i kierowany do cytoplazmatycznej puli acylo-CoA, a powstały lizofosfolipid może być wykorzystany do syntezy odpowiedniego fosfolipidu o zmodyfikowanym (w porównaniu do fosfolipidu, z którego powstał) składzie kwasów tłuszczowych.

Głównym celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie reakcji enzymatycznych przeprowadzanych przez LPCATy (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) pochodzące z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*. Badania LPCATów pochodzących z *P. tricornutum* i innych mikroalg są istotne z uwagi na dotychczasowe przypuszczenia, że enzymy te mogą brać udział w procesie biosyntezy bardzo długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (VLC-PUFA), których wydajna biosynteza w tych organizmach nie została jeszcze w pełni poznana. Jak dotychczas brak było tego typu charakterystyki LPCATów pochodzących z mikroalg w tym z *P. tricornutum*.

Wstępne testy enzymatyczne *in vitro* wykazały, że enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* wykazuje wysoką preferencję w stosunku do LPC, co pozwoliło na nadanie mu nazwy *PtLPCAT1*. Dalsze poszukiwania genów z *P. tricornutum* kodujących enzymy o aktywności typu LPCAT, doprowadziły do zidentyfikowania dwu enzymów kodowanych przez geny *Phatr3\_J11916* i *Phatr3\_J43099* jako enzymy o aktywności typu LPAAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid), nazwanych odpowiednio *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2*. Badania te nie doprowadziły jednak do zidentyfikowania kolejnego/kolejnych genów kodujących enzymy o aktywności typu LPCAT. Kolejnym etapem badań była, więc charakterystyka biochemiczna i specyficzność substratowa jedyne zidentyfikowanego enzymu o aktywności LPCAT (*PtLPCAT1*) zarówno w reakcjach prowadzących do syntezy odpowiednich fosfolipidów (reakcje typu *forward*) jak i w procesie remodelowania fosfolipidów (reakcje typu *backward* oraz innego typu

reakcje włączone w powstawanie LPC). Ponadto przeprowadzono wstępną charakterystykę zidentyfikowanych enzymów *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2*. Ostatnim etapem badań była próba uzyskania transgeniczných roślin *A. thaliana* produkujących VLC-PUFA omega-3.

Uzyskane wyniki testów enzymatycznych *in vitro* pozwoliły ustalić właściwości biochemiczne *PtLPCAT1*. W procesie remodelowania PC najwyższą aktywność *PtLPCAT1* odnotowano w temperaturze 40 °C, a w reakcjach *forward* była to temperatura 30 °C. Enzym *PtLPCAT1* wykazywał najwyższą aktywność w zasadowym pH (8,0 – 11,0) zarówno w reakcjach *forward* jak i w procesie remodelowania mikrosomalnego PC. Ten ostatni proces przebiegał jednak dosyć intensywnie również w środowisku lekko kwaśnym (pH 5-6) w którym reakcje typu *forward* przebiegały ze śladową intensywnością. Jony wapnia i magnezu w stężeniach 0,05 – 0,5 mM stymulowały reakcje typu *forward* katalizowane przez *PtLPCAT1*. Natomiast w reakcjach remodelowania mikrosomalnego PC najniższe badane stężenia tych jonów powodowały hamowanie reakcji, a wraz ze wzrostem stężenia jonów hamowanie reakcji ustępowało. Wpływ jonów potasu badany był tylko w reakcjach typu *forward*. W reakcjach tych jony potasu nieznacznie hamowały aktywność *PtLPCAT1*.

Specyficzność substratową *PtLPCAT1* badano zarówno w reakcjach typu *forward* jak i w procesie remodelowania mikrosomalnego PC. Specyficzność ta badana była zarówno w stosunku do różnych donorów kwasów tłuszczowych (acylo-CoA) jak i w stosunku do różnych ich akceptorów (w reakcjach typu *forward* były to różne lizofosfolipidy, a w reakcjach remodelowania różne „gatunki” PC). W większości wariantów przeprowadzanych testów enzymatycznych *PtLPCAT1* wykazywał wyższą aktywność w stosunku do acylo-CoA zawierających nienasycone kwasy tłuszczowe w porównaniu do tych zawierających kwasy tłuszczowe nasycone. W reakcjach typu *forward* w których sprawdzano jego aktywność praktycznie do wszystkich potencjalnych acylo-CoA ze szlaku biosyntezy kwasu eikozapentaenowego (EPA, 20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>) wykazano jednak, że nie wszystkie acylo-CoA zawierające nienasycone kwasy tłuszczowe (potencjalne intermedyaty tej biosyntezy) były jednakowo akceptowane. Wykazano np. wysoką aktywność *PtLPCAT1* w stosunku do 20:4-CoA n-3 oraz niską w stosunku do 20:4-CoA n-6, co sugeruje lepsze wykorzystywanie tego pierwszego do biosyntezy EPA (wyniki zgodne z obecnie proponowanym szlakiem biosyntezy EPA u *P. tricornutum*). Z pośród wykorzystywanych w testach lizofosfolipidów *PtLPCAT1* oprócz LPC (najwyższa aktywność) był zdolny do acylacji również LPE, LPS i LPG. Z pośród badanych „gatunków” LPC wykorzystywał stosunkowo dobrze 16:0-LPC, 18:0-LPC

i 18:1-LPC. Wykazywał jednak śladową aktywność w stosunku 20:0-LPC. Aktywność *PtLPCAT1* w stosunku do pozycji *sn-2* (testy z *sn-1*-LPC) była o około 11 razy wyższa niż w stosunku do pozycji *sn-1* (testy z *sn-2*-LPC). *PtLPCAT1* był zdolny do przeprowadzania remodelowania składu kwasów tłuszczowych PC, PE i PA badanych frakcji mikrosomalnych (uzyskanych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1*) jednakże PC tych frakcji było remodelowane najintensywniej. Na intensywność remodelowania PC wpływał zarówno rodzaj donora kwasów tłuszczowych (w testach z acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi intensywność ta była zazwyczaj wyższa niż w ich odpowiednikach z kwasami tłuszczowymi nasyconymi) jak i rodzaj remodelowanego PC. Wpływ tego ostatniego czynnika badano poprzez wzbogacanie PC badanych frakcji mikrosomalnych w „nowe” cząsteczki PC syntetyzowane *de novo* przez endogenne *PtLPCAT1* w reakcjach typu *forward* z dostarczonych egzogennych substratów bezpośrednio przed testami sprawdzającymi intensywność remodelowania PC tak zmienionych frakcji mikrosomalnych. Tym sposobem uzyskano frakcje mikrosomalne wzbogacone o PC zawierające kwasy tłuszczowe ze szlaku biosyntezy EPA (stanowiły one około 50% PC znajdującego się w tak zmodyfikowanych mikrosomach). Z pośród tak zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych najintensywniejszemu remodelowaniu podlegało PC frakcji wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)*-PC, kolejno frakcji wzbogaconych o: *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)*-PC, *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)*-PC, *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)*-PC i *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)*-PC. Intensywność remodelowania PC wszystkich tych zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych była jednak wyższa niż intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnej z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* zawierających jedynie naturalnie występujące w drożdżach kwasy tłuszczowe. Wykazana specyficzność substratowa *PtLPCAT1* wobec PC z różnymi kwasami tłuszczowymi ze szlaku biosyntezy EPA nie wyklucza żadnej z „gałęzi” tego szlaku chociaż sugeruje, że jego biosynteza poprzez 18:3(n-6) może być faworyzowana.

Testy dotyczące specyficzności substratowej *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* wykazały, że enzymy te charakteryzują się odmienną preferencją w stosunku do różnych acylo-CoA, przy czym enzym *PtLPAAT1* najlepiej akceptował 18:4-CoA n-3, a *PtLPAAT2* najlepiej akceptował 18:1-CoA. Oba enzymy *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* wykazywały najwyższą aktywność w temperaturze 23 °C. *PtLPAAT1* wykazywał jednakże stosunkowo wysoką wrażliwość na zmiany temperatury w zakresie 10 – 60 °C. Aktywność *PtLPAAT2* podlegała zaś mniejszym wahaniom w badanym zakresie temperaturowym. *PtLPAAT1* wykazywał najwyższą aktywność przy pH 9,0, a *PtLPAAT2* przy pH 10,0. Jony wapnia

wpływały hamująco na aktywność obydwu badanych enzymów typu LPAAT. Wpływ jonów magnezu na ich aktywność zależał jednak od ich stężenia; stężenie 0,05 mM zwiększało aktywność obu enzymów, a stężenia 0,5 mM i 1 mM hamowały ich aktywność.

Przeprowadzone transformacje roślin *Arabidopsis* genami szlaku biosyntezy EPA nie doprowadziły do uzyskania roślin transgenicznych zawierających w lipidach zarówno części nadziemnej (liście, łodygi, kwiaty, strączki) jak i w nasionach kwasów tłuszczowych ze szlaku biosyntezy EPA. Przyczyna jak na razie pozostaje nieznana.

## ABSTRACT

Enzymes from the group of acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases (LPLAT) are common in plants, animals and microorganisms. They participate in remodeling the fatty acid composition of phospholipids and the cytoplasmic acyl-CoA pool by catalyzing the so-called forward and backward reactions. The forward reaction involves the attachment of an appropriate fatty acid (coming from the acyl-CoA pool) to a specific lysophospholipid, resulting in synthesis of the corresponding phospholipid. In the backward reaction, the fatty acid is detached from the phospholipid, attached to CoA and directed to the cytoplasmic pool of acyl-CoA, and the resulting lysophospholipid can be used to synthesize the appropriate phospholipid with a modified (compared to the phospholipid from which it was created) fatty acid composition.

The main aim of this research was to characterize the enzymatic reactions carried out by LPCATs (acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferases) derived from the diatom *Phaeodactylum tricoronatum*. Research on LPCATs originating from *P. tricoronatum* and other microalgae is important due to current assumptions that these enzymes may be involved in the biosynthesis of very long-chain polyunsaturated fatty acids (VLC-PUFA). So far, there has been no such characterization of LPCATs from microalgae, including *P. tricoronatum*.

Initial *in vitro* enzymatic assays showed that the enzyme encoded by the Phatr3\_J20460 gene has a high preference for LPC, and it was named as *PtLPCAT1*. Further search for genes from *P. tricoronatum* encoding enzymes with LPCAT-type activity led to the identification of two enzymes encoded by the Phatr3\_J11916 and Phatr3\_J43099 genes as enzymes with LPAAT (acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferase) activity, named *PtLPAAT1* and *PtLPAAT2*, respectively. However, these studies did not lead to the identification of further genes encoding enzymes with LPCAT-type activity. The next stage of the research was the biochemical characterization and substrate specificity studies of the only identified enzyme with LPCAT activity (*PtLPCAT1*) both in the reactions leading to the synthesis of appropriate phospholipids (forward reactions) and in the process of phospholipid remodeling (backward reactions and other types of reactions involved in the formation of LPC). Additionally, preliminary characterization of the identified enzymes *PtLPAAT1* and *PtLPAAT2* was performed. The last stage of the research was an attempt to obtain transgenic *A. thaliana* plants producing VLC-PUFA omega-3.



The obtained results of *in vitro* enzymatic assays allowed for determination of the biochemical properties of *PtLPCAT1*. In the PC remodeling process, the highest *PtLPCAT1* activity was recorded at 40 °C, and in forward reactions at 30 °C. The *PtLPCAT1* enzyme showed the highest activity at alkaline pH (8.0 – 11.0) both in forward reactions and in the process of microsomal PC remodeling. However, the latter process also took place quite intensively in a slightly acidic environment (pH 5-6), in which forward reactions took place with just a trace intensity. Calcium and magnesium ions at concentrations of 0.05–0.5 mM stimulated forward reactions catalyzed by *PtLPCAT1*. However, in microsomal PC remodeling reactions, the lowest tested concentrations of these ions resulted in inhibition of the reaction, and as the ion concentration increased, the reaction inhibition disappeared. The influence of potassium ions was examined only in forward reactions. In these reactions, potassium ions slightly inhibited the activity of *PtLPCAT1*.

The substrate specificity of *PtLPCAT1* was investigated both in forward reactions and in the process of microsomal PC remodeling. This specificity was tested both for various fatty acid donors (acyl-CoA) and for their various acceptors (different lysophospholipids in forward reactions and different PC "species" in remodeling reactions). In most variants of the enzymatic assays, *PtLPCAT1* showed higher activity towards acyl-CoAs containing unsaturated fatty acids compared to those containing saturated fatty acids. However, in forward reactions in which its activity towards virtually all potential acyl-CoAs from the eicosapentaenoic acid biosynthetic pathway (EPA, 20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>) was checked, not all acyl-CoAs containing unsaturated fatty acids (potential intermediates of this biosynthesis) were equally accepted. For example, high activity of *PtLPCAT1* in relation to 20:4-CoA n-3 and low activity in relation to 20:4-CoA n-6 was demonstrated, which suggests a better use of the former for EPA biosynthesis (results consistent with the currently proposed EPA biosynthesis pathway in *P. tricornutum*). Among the lysophospholipids used in the assays, *PtLPCAT1*, in addition to LPC (the highest activity), was also able to acylate LPE, LPS and LPG. Of the examined LPC "species", 16:0-LPC, 18:0-LPC, and 18:1-LPC were used relatively well. However, *PtLPCAT1* showed trace activity towards 20:0-LPC. The activity of *PtLPCAT1* towards the *sn*-2 position was approximately 11 times higher than towards the *sn*-1 position. *PtLPCAT1* was able to remodel the fatty acid composition of PC, PE and PA of the tested microsomal fractions (obtained from yeast overexpressing *PtLPCAT1*), however, the PC of these fractions was remodeled most intensively. The intensity of PC remodeling was

influenced by both the type of fatty acid donor (in assays with acyl-CoA containing unsaturated fatty acids, the intensity was usually higher than in their counterparts with saturated fatty acids) and the type of remodeled PC. The effect of the latter factor was examined by enriching the PC of the tested microsomal fractions with "new" PC molecules synthesized *de novo* by endogenous *PtLPCAT1* in forward reactions from the supplied exogenous substrates immediately before assays checking the intensity of PC remodeling of such modified microsomal fractions. In this way, microsomal fractions enriched with PC containing fatty acids from the EPA biosynthetic pathway were obtained (they constituted approximately 50% of the PC contained in such modified microsomes). Among such modified microsomal fractions, the PC of the microsomal fraction enriched with *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:3(n-6)-PC was subject to the most intensive remodeling, followed by the PC of microsomal fractions enriched with: *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4(n-3)-PC, *sn*-1-18:1-*sn*-2-20:5(n-3)-PC, *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:3(n-3)-PC and *sn*-1-18:1-*sn*-2-20:4(n-3)-PC. However, the PC remodeling intensity of all these modified microsomal fractions was higher than the PC remodeling intensity of the microsomal fraction from yeast overexpressing *PtLPCAT1* containing only fatty acids naturally occurring in yeast. The demonstrated substrate specificity of *PtLPCAT1* towards PC with various fatty acids from the EPA biosynthetic pathway does not exclude any of the "branches" of this pathway, although it suggests that its biosynthesis via 18:3(n-6) may be favored.

Substrate specificity assays of *PtLPAAT1* and *PtLPAAT2* showed that these enzymes have different preferences for different acyl-CoAs, with the *PtLPAAT1* enzyme best accepting 18:4-CoA n-3 and *PtLPAAT2* best accepting 18:1-CoA. Both enzymes, *PtLPAAT1* and *PtLPAAT2*, showed the highest activity at 23 °C. However, *PtLPAAT1* showed relatively high sensitivity to temperature changes in the range of 10 - 60 °C. The activity of *PtLPAAT2* was subject to smaller fluctuations in the tested temperature range. *PtLPAAT1* showed the highest activity at pH 9.0 and *PtLPAAT2* at pH 10.0. Calcium ions inhibited the activity of both tested LPAAT-type enzymes. However, the influence of magnesium ions on their activity depended on magnesium concentration; a concentration of 0.05 mM of Mg<sup>+2</sup> increased the activity of both enzymes, and concentrations of 0.5 mM and 1 mM inhibited their activity.

The transformation of *A. thaliana* plants with genes of the EPA biosynthetic pathway did not lead to obtaining transgenic plants containing fatty acids from the EPA biosynthetic pathway in the lipids of both the above-ground parts (leaves, stems, flowers, pods) and in the seeds. The cause of that remains currently unknown.

## WPROWADZENIE I CELE PRACY

Acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT) to enzymy których główną funkcją jest synteza odpowiednich fosfolipidów z lizofosfolipidów i kwasów tłuszczowych znajdujących się w formie ich połączeń z CoA. LPLATy odpowiedzialne są również za transport kwasów tłuszczowych pomiędzy odpowiednim fosfolipidem a cytoplazmatyczną pulą acylo-CoA, przez co odgrywają kluczową rolę zarówno w remodelowaniu składu kwasów tłuszczowych lipidów błonowych jak i w syntezie lipidów zapasowych. Enzymy te można podzielić na różne rodzaje, z których najlepiej poznane to LPAATy, LPEATy oraz LPCATy. Różnią się one między sobą, między innymi, preferencją w stosunku do lizofosfolipidów, tj. substratów ich reakcji głównych prowadzących do syntezy odpowiednich fosfolipidów. Wymienione klasy LPAATów preferują odpowiednio: LPA, LPE i LPC (co decyduje o ich nazwach). Ostatnia z tych klas tj. enzymy typu LPCAT, u roślin pełni ważną rolę podczas biosyntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Biosynteza tych kwasów odbywa się, bowiem w fosfatydylocholinie (PC), a enzymy typu LPCAT mogą je z tego lipidu przenieść do puli cytoplazmatycznego acylo-CoA, udostępniając je tym samym do syntezy innych lipidów. Wolną grupę hydroksylową w powstałych LPC mogą zaś reacylować, między innymi, kwasem oleinowym znajdującym się w puli cytoplazmatycznego acylo-CoA i tym samym udostępniać go do biosyntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

*Phaeodactylum tricornutum* to jednokomórkowy mikroorganizm fotosyntetyzujący należący do grupy mikroalg zwanej okrzemkami. Mikroalgi występują głównie w środowiskach morskich oraz słodkowodnych i są zdolne do produkcji znacznych ilości bardzo długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 (VLC-PUFA). Oleje pochodzące z mikroalg, zawierające kwas eikozapentaenowy (EPA) czy kwas dokozaheksaenowy (DHA) przyciągają uwagę badaczy z całego świata, bowiem, jak do tej pory, stanowią one główne źródło tych kwasów tłuszczowych (o wysokiej wartości odżywczej i zdrowotnej dla człowieka) pierwotnie dla ryb, a w konsekwencji również dla człowieka, gdy ryby stają się składnikiem jego diety. *P. tricornutum*, który jest organizmem modelowym w badaniach molekularnych nad okrzemkami, jest zdolny do naturalnej produkcji EPA mogącej sięgać do 35% wszystkich kwasów tłuszczowych. U *P. tricornutum* EPA jest magazynowane głównie w glikoglicerolipidach takich jak monogalaktozylodiacyloglicerol (MGDG) i digalaktozylodiacyloglicerol (DGDG), gdy glon ten rozwija się w warunkach zbliżonych

do optymalnych dla jego rozwoju. W warunkach stresowych znaczne jego ilości magazynowane są również w jego triacyloglicerolach (TAG). Uważa się, że za wysoką wydajność syntezy EPA u *P. tricornutum* może między innymi odpowiadać wydajny proces przekazywania produktów pośrednich w procesie jego biosyntezy, pomiędzy pulą acylo-CoA (miejsce wydłużania kwasów tłuszczowych) a fosfatydylocholiną (miejsce desaturacji kwasów tłuszczowych). Zakłada się, że za wymianę reszt acylowych pomiędzy pulą acylo-CoA a PC u *P. tricornutum* odpowiadają, podobnie jak u roślin wyższych, enzymy typu LPCAT.

Istnieje wiele doniesień naukowych, odnośnie prób wytworzenia transgenicznych roślin oleistych zdolnych do biosyntezy niewystępujących naturalnie w roślinach kwasów tłuszczowych EPA i DHA. Jednakże uzyskiwane zawartości tych kwasów tłuszczowych były jak dotychczas zbyt niskie, aby produkcja olejów je zawierających na skalę przemysłową była opłacalna. Przypuszcza się, że jedną z przyczyn braku odpowiednio wysokiej produkcji VLC-PUFA przez rośliny transgeniczne może być nieodpowiednia specyficzność substratowa roślinnych LPCATów, które mogłyby nie akceptować produktów, wprowadzanych do tych roślin nowych desaturaz czy elongaz pochodzących z organizmów cechujących się naturalną biosyntezą VLC-PUFA. Jednym z rozwiązań mogłoby być dodatkowe wprowadzenie enzymów typu LPCAT pochodzących z mikroalg (razem z desaturazami i elongazami) mogących uzupełnić specyficzność substratową LPCATów roślinnych i być może zwiększyć możliwości syntezy VLC-PUFA przez tego typu rośliny transgeniczne. Aktywność enzymów LPCAT pochodzących z *Phaeodactylum tricornutum* nie była jednak dotychczas badana, a ich udział w remodelowaniu fosfatydylocholiny u tego okrzemka był jedynie hipotetycznym założeniem. Dlatego głównym celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie genu kodującego enzym/y typu LPCAT u *P. tricornutum* i po jego/ich zidentyfikowaniu wykonanie charakterystyki katalizowanych przez niego/przez nie reakcji w warunkach *in vitro*.

Wstępne testy enzymatyczne pozwoliły na wyselekcjonowanie z pośród potencjalnych genów *P. tricornutum* wykazujących homologię do genów kodujących poznane już LPCATy jednego genu kodującego enzym o aktywności LPCAT. Produkt tego genu nazwano *PtLPCAT1*. W kolejnych etapach pracy, przeprowadzono szeroką charakterystykę biochemiczną *PtLPCAT1* w warunkach *in vitro*. Wykonano również określenie jego specyficzności substratowej w reakcjach *forward* i w procesach remodelowania fosfolipidów (głównie PC; reakcje typu *backward* oraz innego typu reakcje prowadzące do powstawania LPC). Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność *PtLPCAT1* do

przeprowadzania potencjalnych reakcji związanych z biosyntezą VLC-PUFA, dotychczas tylko domniemywaną.

Z potencjalnych genów *P. tricornutum* mogących kodować enzymy o aktywności LPCAT dwa okazały się genami kodującymi inne LPLATy, a mianowicie LPAATy (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid). Kodowane przez te geny enzymy nazwano *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* i przeprowadzono wstępną charakterystykę ich właściwości biochemicznych i specyficzności substratowej. W pracy podjęto również próbę wytworzenia transgenicznych roślin *A. thaliana* mogących produkować VLC-PUFA. W jednym z wariantów wprowadzono do nich tylko geny ze szlaku biosyntezy EPA, a w innym zarówno te geny jak i gen kodujący *PtLPCAT1*, w celu sprawdzenia wpływu tego enzymu na wydajność biosyntezy EPA (jeśli taką udałoby się uzyskać).

## 1. PRZEGLĄD LITERATURY

### 1.1. Okrzemki - fotosyntetyczne mikroalgi produkujące oleje

Okrzemki (*Bacillariophyceae*) reprezentują znaczną grupę eukariotycznych, jednokomórkowych mikroalg występujących w siedliskach morskich, słodkowodnych oraz w środowiskach lądowych (Domergue i wsp., 2003; Tesson i wsp., 2009). Odgrywają ważną rolę w światowym ekosystemie, poprzez asymilację nieorganicznych postaci węgla i jego konwersji do związków organicznych (Maeda i wsp., 2017). W efekcie procesu fotosyntezy produkują one więcej niż 20% tlenu produkowanego przez wszystkie organizmy fotosyntetyzujące, czyli mniej więcej tyle samo, co lasy tropikalne (Daboussi i wsp., 2014). Okrzemki magazynują węgiel głównie w tłuszczach i polisacharydach. W zależności od warunków rozwoju skład ich lipidów może ulegać zmianom. W warunkach stresowych np. przy niedoborze składników odżywczych takich jak azot, fosfor czy krzem, są zdolne do produkowania znacznych ilości triacylogliceroli (TAG, ang. *triacylglycerol*), których głównym komponentem są wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3 (Maeda i wsp., 2017; Cui i wsp., 2019). Okrzemki odgrywają również kluczową rolę w biogeochemicznym obiegu krzemionki. Większość z nich jest zdolna do metabolizowania krzemionki i wysycania nią ściany komórkowej, stąd też wzięła się ich nazwa (Domergue i wsp., 2003; Tesson i wsp., 2009). Ściana komórkowa okrzemek nazwana jest skorupką i składa się z dwóch części (okryw), z których jedna jest większa od drugiej. Z powodu różnicy ich wielkości zachodzą one na siebie w sposób przypominający szalkę Petriego (Tesson i wsp., 2009). Plastydy okrzemek zawierają ksantofile takie jak fukoksantyna jako główne barwniki pomocnicze w procesie fotosyntezy, które nadają tym organizmom brązowy kolor. Uważa się, że okrzemki powstały w wyniku pochłonięcia fotoautotroficznej komórki eukariotycznej, prawdopodobnie będącej przodkiem współczesnej algi czerwonej, przez heterotroficznego wiciowca z grupy Heterokonta. Plastydy okrzemek są otoczone przez 4 membrany przez co nazywa się je „plastydami złożonymi” (Domergue i wsp., 2003). Zdolność tych organizmów do biomineralizacji krzemionki stała się przedmiotem badań dążących do tworzenia, przy użyciu metod inżynierii genetycznej, nanomateriałów 3D o określonej strukturze i funkcjonalności (Kroger, 2007). Ze względu na zdolność wytwarzania dużych ilości lipidów przez okrzemki, istnieje również zainteresowanie potencjalnym ich zastosowaniem do produkcji biopaliw oraz produktów wartościowych dla zdrowia człowieka np. olei bogatych w kwasy omega-3 (Maeda i wsp., 2017; Cui i wsp., 2019). Jednakże produkcja na skalę

przemysłową tych olei wymaga utrzymania szybkiego rozmnażania komórek co niesie ze sobą wyzwanie opracowania odpowiednich warunków hodowli (Cui i wsp., 2019).

W niniejszej pracy do badań został wykorzystany gatunek okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*, który w przeciwieństwie do innych gatunków nie potrzebuje krzemu do wzrostu, a jego ściany są zbudowane w większości ze związków organicznych (Tesson i wsp., 2009). *P. tricornutum* stanowi jeden z głównych organizmów modelowych w badaniach molekularnych nad okrzemkami z uwagi na całkowicie zsekwencjonowany mały genom, szybkie tempo wzrostu i dobrze opracowane technologie edycji jego genomu (Bowler i wsp., 2008; Nymark i wsp., 2016; Falciatore i wsp., 2020). *P. tricornutum* jest głównie znany jako potencjalne źródło dla przemysłowej produkcji kwasu eikozapentaenowego (EPA; 20:5  $\Delta^{5,8,11,14,17}$ ). Naturalna zawartość EPA w tym okrzemku może sięgać do 35% wszystkich kwasów tłuszczowych (Hamilton i wsp., 2014). Natomiast występowanie kwasu dokozaheksaenowego (DHA, 22:6  $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ ; ang. *docosahexaenoic acid*) zależy od warunków hodowli oraz szczepu, ponieważ niektóre badania są w stanie wykryć jego obecność, a inne nie (Popko, 2016). *P. tricornutum* występuje głównie na obszarach przybrzeżnych o dużych wahaniami zasolenia. Posiada trzy morfotypy: wrzecionowaty, trójpromienisty i owalny. Występowanie danego morfotypu jest zależne od warunków środowiska (Tesson i wsp., 2009).

## **1.2. Rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*) – modelowa roślina oleista wykorzystywana w badaniach**

*Arabidopsis thaliana* należy do rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*), w której skład wchodzi np. gorczyca biała, kapusta czy rzepak. Roślina ta występuje naturalnie w całej Europie, Azji i Ameryce Północnej (Meinke i wsp., 1998). Znaczący wkład inwestycyjny w badania nad rzodkiewnikiem umożliwił zsekwencjonowanie jego całego genomu w 2000 roku (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Rośliny *Arabidopsis* mogą być hodowane na szalkach Petriego, w doniczkach umieszczonych w szklarni albo w pokoju hodowlanym z odpowiednim oświetleniem sztucznym (Meinke i wsp., 1998). Dodatkowe zalety takie jak krótki cykl życiowy, niewielki rozmiar, wytwarzanie dużej ilości nasion (ponad 5000 na roślinę) poprzez samopylność, łatwe krzyżowanie oraz stosunkowo mały genom (5 par chromosomów i około 20 000 genów) przyczyniły się do tego, że *Arabidopsis* stała się gatunkiem modelowym w naukach biologicznych (np. genetyce roślin), (Lavagi i wsp., 2012). Kwiat tworzy zewnętrzny okółek składający się z 4

zielonych działek, wewnętrzny okółek złożony z 4 białych płatków, 6 pręcików niosących pyłek oraz położona centralnie zalążnia. Korzenie mają prostą strukturę, nie wchodzą w symbiozę z bakteriami wiążącymi azot. Naturalne patogeny tej rośliny to różnorodne insekty, bakterie, grzyby i wirusy (Meinke i wsp., 1998).

### **1.3. Charakterystyka i biosynteza kwasów tłuszczowych**

#### **1.3.1. Struktura kwasów tłuszczowych**

Kwasy tłuszczowe to kwasy karboksylowe o wysoko zredukowanym łańcuchu węglowodorowym (Somerville i wsp., 2000). Łańcuch węglowy kwasów tłuszczowych na jednym końcu ma przyłączoną grupę metylową a na drugim grupę karboksylową. Natura wykorzystuje chemiczne właściwości kwasów tłuszczowych na wiele sposobów. Hydrofobowy charakter łańcuchów acylowych pozwala na tworzenie dwuwarstwowych struktur membranowych oddzielających w komórkach poszczególne jej kompartmenty. Kwasy tłuszczowe są również idealną formą magazynowania energii metabolicznej. Energia zawarta w wiązaniach między węglami (C-C), może być uwalniana przez  $\beta$ -oksydację, reakcję odwrotną do reakcji biosyntezy kwasów tłuszczowych (Tehlivets i wsp., 2007). Kwasy tłuszczowe mogą pełnić także funkcję izolacji termicznej, elektrycznej i mechanicznej (Rustan i wsp., 2005). Niektóre kwasy tłuszczowe służą jako prekursorzy dla związków bardziej aktywnych biologicznie, przez co mogą pełnić funkcję sygnalizacyjną (Tehlivets i wsp., 2007).

Nasycone kwasy tłuszczowe są wysyczone wodorem. Większość nasyconych kwasów tłuszczowych to proste łańcuchy węglowodorowe o parzystej liczbie atomów węgla. Jednonienasycone kwasy tłuszczowe posiadają jedno wiązanie podwójne między węglami, które może występować w różnych pozycjach. Jednonienasycone kwasy tłuszczowe mają najczęściej długość łańcucha od 16 do 22 atomów węgla i podwójne wiązanie w konfiguracji cis. To znaczy, że atomy wodoru po obu stronach podwójnego wiązania są ustawione w tym samym kierunku. Izomery trans mogą być wytwarzane podczas przemysłowego przetwarzania (uwodornienia) nienasyconych olejów oraz w przewodzie żołądkowo-jelitowym przeżuwaczy. Obecność podwójnego wiązania typu cis powoduje zmiany konformacji cząsteczki kwasu tłuszczowego. Powoduje załamanie łańcucha węglowego cząsteczki i sprawia, że kwasy tłuszczowe z tego typu podwójnymi wiązaniami są termodynamicznie mniej stabilne niż formy trans, przez co mają też niższą



temperaturę topnienia niż formy trans lub ich nasycone odpowiedniki (Rustan i wsp., 2005).

Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFA) charakteryzują się, co najmniej dwoma podwójnymi wiązaniami typu cis (Kim i wsp., 2014). W zależności od pozycji pierwszego podwójnego wiązania licząc od grupy metylowej, PUFA można podzielić na dwie główne rodziny: omega-6 i omega-3. Długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe (LC-PUFAs; ang. *long-chain polyunsaturated fatty acids*) są zbudowane z co najmniej 18 atomów węgla (Abedi i wsp., 2014). Z kolei te, które zawierają powyżej lub równo 20 atomów węgla (C<sub>20</sub>-C<sub>22</sub>) są już nazywane bardzo długołańcuchowymi wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi (VLC-PUFAs; ang. *very-long-chain polyunsaturated fatty acids*) (Abedi i wsp., 2014). Podwójne wiązania są włączane do łańcucha cząsteczki kwasu tłuszczowego w określonych pozycjach. Najczęściej występujący układ wiązań podwójnych w PUFA wygląda następująco -C=C-C-C=C-, podwójne wiązania są w nim oddzielone grupą metylenową. Rzadziej spotykaną strukturą jest -C=C-C=C-, w której wiązania podwójne nie są oddzielone przez grupę metylenową (Valenzuela i wsp., 2013).

Zgodnie z oficjalnie ustanowioną nomenklaturą przez IUPAC (ang. *International Union of Practical and Applied Chemistry*) atomy węgla kwasów tłuszczowych powinny być numerowane kolejno od atomu węgla grupy karboksylowej (C1) do atomu węgla grupy metylenowej (Cn). Pozycja podwójnego wiązania oznaczana jest symbolem delta ( $\Delta$ ) razem z numerem węgla gdzie podwójne wiązanie się rozpoczyna. Zgodnie z tą nomenklaturą 18:1  $\Delta^9$  oznacza, że podwójne wiązanie jest pomiędzy 9 a 10 węglem. Istnieje również drugi sposób nazewnictwa kwasów tłuszczowych zaproponowany przez R. Holmana w 1958 r., który jest często używany przez naukowców z obszaru nauk biochemicznych i żywienia. Polega on na numerowaniu atomów węgla cząsteczki kwasu tłuszczowego zaczynając od drugiego jej końca tj. grupy metylenowej. Pierwszym węglem (C1) nazywa się ten najbardziej oddalony od grupy karboksylowej i oznacza się go jako „n”, „ $\omega$ ” lub „omega”. I tak np. lokalizacja podwójnego wiązania zapisana jako 18:1  $\Delta^9$  zbiega się z jego drugą formą zapisu 18:1  $\omega$ -9. Jednakże zapis w tej formie np. kwasu tłuszczowego 18:2  $\Delta^{9,12}$  nie będzie się pokrywał z jego pierwszą formą zapisu i będzie wyglądał następująco: 18:2  $\omega$ -6, (Valenzuela i wsp., 2013). W Tabeli 1 zostały przedstawione nazwy zwyczajowe i systematyczne niektórych kwasów tłuszczowych oraz ich skrócone formy zapisu.

Najczęściej spotykane kwasy tłuszczowe w lipidach błon komórek roślinnych to: kwas palmitynowy (16:0), kwas stearynowy (18:0), kwas oleinowy (18:1), kwas linolowy (18:2) i kwas linolenowy (18:3), (Somerville i wsp., 2000). U drożdży skład kwasów tłuszczowych w porównaniu do wyższych eukariontów jest dość prosty bo składa się przeważnie z 16:0, 16:1, 18:0 i 18:1 (Anaokar i wsp., 2018). Zwykle 80% tych kwasów tłuszczowych stanowią kwasy jednonienasycone (Tehlivets i wsp., 2007). U *P. tricornutum* w profilu kwasów tłuszczowych dominuje 16:0, 16:1(n-7) i 20:5(n-3). Kwas tłuszczowy omega-3 - 20:5 - budzi szczególne zainteresowanie ponieważ jego udział w diecie jest korzystny dla zdrowia człowieka (Popko, 2016).

**Tabela 1.** Nazwy kwasów tłuszczowych i stosowane skróty.

Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna	Symbol
Kwas kaprynowy	Kwas dekanowy	10:0
Kwas laurynowy	Kwas dodekanowy	12:0
Kwas mirystynowy	Kwas tetradekanowy	14:0
Kwas palmitynowy	Kwas heksadekanowy	16:0
Kwas stearynowy	Kwas oktadekanowy	18:0
Kwas oleopalmitynowy	Kwas cis- $\Delta^9$ -heksadekenowy	16:1
Kwas oleinowy	Kwas cis- $\Delta^9$ -oktadekenowy	18:1
Kwas linolowy	Kwas cis- $\Delta^{9,12}$ -oktadekadienowy	18:2
Kwas $\alpha$ -linolenowy	Kwas cis- $\Delta^{9,12,15}$ -oktadekatrienowy	18:3
Kwas $\gamma$ -linolenowy	Kwas cis- $\Delta^{6,9,12}$ -oktadekatrienowy	18:3
Kwas stearydynowy	Kwas cis- $\Delta^{6,9,12,15}$ -oktadekatetraenowy	18:4
Kwas arachidowy	Kwas eikozanowy	20:0
Kwas eikozadienowy	Kwas cis- $\Delta^{8,11}$ -eikozadienowy	20:2
Kwas eikozatrienowy	Kwas cis- $\Delta^{11,14,17}$ -eikozatrienowy	20:3
Kwas dihomo-gamma linolenowy	Kwas cis- $\Delta^{8,11,14}$ -eikozatrienowy	20:3
Kwas arachidonowy	Kwas cis- $\Delta^{5,8,11,14}$ -eikozatetraenowy	20:4
Kwas eikozatetraenowy	Kwas cis- $\Delta^{8,11,14,17}$ -eikozatetraenowy	20:4
Kwas eikozapentaenowy	Kwas cis- $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -eikozapentaenowy	20:5
Kwas erukowy	Kwas cis- $\Delta^{13}$ -dokozenowy	22:1
Kwas adrenowy	Kwas cis- $\Delta^{7,10,13,16}$ -dokozaetraenowy	22:4
Kwas klupanodonowy	Kwas cis- $\Delta^{7,10,13,16,19}$ -dokozapentaenowy	22:5
Kwas osbondowy	Kwas cis- $\Delta^{4,7,10,13,16}$ -dokozapentaenowy	22:5
Kwas cerwonowy	Kwas cis- $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ -dokozaheksaenowy	22:6

### 1.3.2. Biosynteza kwasów tłuszczowych

We wszystkich typach komórek synteza kwasów tłuszczowych *de novo* polega zasadniczo na takich samych reakcjach. Natomiast pomiędzy różnymi gatunkami prokariotycznymi i eukariotycznymi dość zróżnicowana jest struktura molekularna enzymów przeprowadzających syntezę i wydłużanie tych kwasów tłuszczowych (Tehlivets

i wsp., 2007). U rośliny modelowej *A. thaliana* biosynteza kwasów tłuszczowych została szczegółowo zbadana. Przypuszcza się, że u okrzemek synteza kwasów tłuszczowych *de novo* jest podobna do tej u *Arabidopsis* (Sayanova i wsp., 2017). U mikroalg i roślin biosynteza kwasów tłuszczowych ma miejsce głównie w plastydach (Lupette i Benning, 2020).

Proces biosyntezy kwasów tłuszczowych rozpoczyna się od karboksylacji acetylo-CoA, do malonylo-CoA (główny donor węgla do syntezy kwasów tłuszczowych). Reakcja ta jest zależna od ATP. Następnie zachodzi transport grupy malonylowej do białkowego nośnika reszt acylowych (ACP; ang. *acyl carrier protein*). Powstały malonylo-ACP ulega kondensacji z acetylo-CoA. W ten sposób cząsteczka wydłuża się o dwa atomy węgla dając 3-ketobutyrylo-ACP. Kolejne, następujące po sobie trzy reakcje to: redukcja, dehydratacja oraz ponownie redukcja. Prowadzą one do utworzenia nasyconej cząsteczki acylo-ACP (butyrylo-ACP). Cząsteczki syntetyzowanych kwasów tłuszczowych są kolejno wydłużane o dwa atomy węgla poprzez reakcję kondensacji z malonylo-ACP i następującą po tej kondensacji serię reakcji: redukcji, dehydratacji i kolejnej redukcji; taka seria reakcji jest nazywana pojedynczym cyklem. Synteza acylo-ACP zawierającego 16 atomów węgla wymaga (oprócz cyklu pierwszego prowadzącego do powstania butyrylo-ACP) 7 takich cykli. U roślin, koenzymami obu reakcji redukcji są NADPH i NADH, przy czym w pierwszej redukcji główna izoforma reduktazy 3-ketoacylo-ACP wykorzystuje NADPH, a w drugiej redukcji główna izoforma reduktazy enoilo-ACP wykorzystuje NADH. Podczas biosyntezy kwasu tłuszczowego 18-to węglowego zużywane jest 16 cząsteczek NADPH/NADH. U roślin głównymi produktami końcowymi syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych są: kwas palmitynowy (16:0) i kwas stearynowy (18:0) (Somerville i wsp., 2000).

W syntezie kwasów tłuszczowych biorą udział dwa układy enzymatyczne: karboksylaza acetylo-CoA (ACCCase; ang. *acetyl-CoA carboxylase*) i syntaza kwasów tłuszczowych (FAS; ang. *fatty acid synthase*). U roślin i alg karboksylaza acetylo-CoA jest zlokalizowana w chloroplastach i w cytozolu. Zidentyfikowano dwie różne formy molekularne tego enzymu tworzące kompleks wielobiałkowy (MS; ang. *multisubunit*) – forma prokariotyczna i białko wielofunkcyjne (MF; ang. *multifunctional*) – forma eukariotyczna. Kompleks MS jest obecny w plastydach wszystkich roślin z wyjątkiem *Poaceae* (Gramineae). Natomiast kompleks MF u wszystkich roślin jest zlokalizowany w cytozolu natomiast u *Poaceae* w cytozolu i plastydach. ACCasy występujące w plastydach biorą udział wyłącznie w biosyntezie *de novo* kwasów tłuszczowych

natomiast malonylo-CoA będący produktem karboksylaz acetylo-CoA występujących w cytozolu bierze udział w biosyntezie bardzo długo łańcuchowych kwasów tłuszczowych i w innych procesach np. w biosyntezie flawonoidów i antocyjanów (Somerville i wsp., 2000).

Drugim kompleksem enzymatycznym biorącym udział w syntezie *de novo* kwasów tłuszczowych jest FAS. Występujące w naturze układy enzymatyczne „syntazy kwasów tłuszczowych” można podzielić na dwie grupy: typu I i typu II. FAS typu I charakteryzuje się dużymi wielofunkcyjnymi białkami zaś FAS typu II składa się z oddzielnych białek funkcjonujących jak szlak metaboliczny. FAS typu I jest charakterystyczny dla drożdży i ssaków zaś FAS typu II występuje u prokariotów i roślin. Występowanie FAS typu II u roślin, tłumaczy się hipotezą o endosymbiozie fotosyntetycznych prokariotów z roślinami i przekształceniu tych prokariotów w trakcie ewolucji w plastydy. Komponenty FAS to syntaza 3-ketoacylo-ACP (KAS; ang. *ketoacyl-ACP synthase*), reduktaza 3-ketoacylo-ACP, dehydrogenaza 3-hydroksyacylo-ACP i reduktaza enoiloacylo-ACP. Do enzymów należących do FAS zalicza się również: malonylo-CoA: ACP transacylazę, acetylo-CoA: ACP transacylazę oraz odpowiednie tioesterazy kończące reakcję syntezy. Do komponentów FAS zalicza się również białko przenoszące acyle (ACP). Wszystkie reakcje syntezy *de novo* łańcucha węglowego kwasów tłuszczowych wymagają substratów połączonych z ACP. Poszczególne enzymy wchodzące w skład FAS mogą występować w więcej niż jednej izoformie (Fatiha, 2020; Somerville i wsp., 2000). U okrzemek aktywność/specyficzność substratowa poszczególnych enzymów mogących brać udział w biosyntezie kwasów tłuszczowych nie została jeszcze (lub została słabo) scharakteryzowana (Sayanova i wsp., 2017).

Kluczowe dla szlaku syntezy kwasów tłuszczowych reakcje kondensacji, są przeprowadzane przez enzymy KAS (syntaza 3-ketoacylo-ACP). U roślin można wyróżnić trzy izoformy tych enzymów, różniące się specyficznością w stosunku do długości łańcucha acylowego. Pierwszą reakcją kondensacji pomiędzy acetylo-CoA i malonylo-ACP katalizuje KAS III. KAS I wydłuża acylo-ACP zawierające od 2 do 14 węgli. W ostatnim cyklu KAS II przeprowadza konwersję acylo-ACP o długości C<sub>16</sub> do C<sub>18</sub> (Winter i wsp., 1997).

Zsyntetyzowany kwas stearynowy (18:0) przyłączony do ACP wchodzi głównie w reakcję desaturacji katalizowaną przez enzym desaturazę stearoilo-ACP (SAD, ang. *stearoyl-ACP desaturase*) w wyniku czego powstaje kwas oleinowy (18:1). Jednakże dalsze reakcje desaturacji prowadzące do syntezy wielonienasyconych kwasów

tłuszczowych (C18 PUFA) przeprowadzane są na kwasach tłuszczowych wchodzących w skład glicerolipidów błonowych (He i wsp., 2020).

### **1.3.3. Wykorzystanie *de novo* zsyntetyzowanych kwasów tłuszczowych przez komórkę (szlak prokariotyczny i eukariotyczny)**

Powstałe *de novo* kwasy tłuszczowe 16:0, 18:0 i 18:1 mogą dalej uczestniczyć w syntezie glicerolipidów w szlaku: prokariotycznym i eukariotycznym. Szlak prokariotyczny dotyczy szeregu reakcji syntezy lipidów w plastydach. Szlak eukariotyczny reprezentuje szereg reakcji syntezy lipidów w retikulum endoplazmatycznym, ale też transport niektórych lipidów pomiędzy retikulum a plastydem oraz dalszą modyfikację tych lipidów w plastydach (Somerville i wsp., 2000).

W szlaku prokariotycznym kwasy oleinowy i palmitynowy są przyłączane do glicerolo-3-fosforanu odpowiednio w pozycji *sn*-1 i *sn*-2. Reakcje te katalizuje acylotransferaza glicerolo-3-fosforanu (GPAT) i acylotransferaza kwasu lizofosfatydowego (LPAAT). Natomiast w szlaku eukariotycznym kwasy tłuszczowe wyprodukowane w plastydach są eksportowane do retikulum endoplazmatycznego gdzie również są przyłączane do G3P. Zanim to się jednak stanie odpowiednie tioesterazy (FAT; ang. *fatty acyl-ACP thioesterases*) odłączają je od ACP (hydroliza wiązania tioestrowego występującego w acylo-ACP) w wewnętrznej błonie chloroplastów (He i wsp., 2020). Wolne kwasy tłuszczowe są następnie eksportowane do cytozolu i przyłączane do koenzymu A (CoA, ang. *coenzyme A*) przez syntazę długołańcuchowych acylo-CoA (LACS; ang. *long-chain acyl-CoA synthase*). Cytozolowe acylo-CoA są następnie wykorzystywane, między innymi, do biosyntezy fosfolipidów poprzez odpowiednie acylotransferazy. W fosfolipidach (głównie w fosfatydylocholinie; PC), mogą być poddane dalszym modyfikacjom np. reakcji desaturacji. Powstałe w PC wielonienasycone kwasy tłuszczowe mogą być udostępniane do syntezy innych lipidów membranowych lub zapasowych (triacylogliceroli; TAG) w wyniku działania np. acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydylocholina (Sayanova i wsp., 2017; Klińska i wsp., 2019).

Oba szlaki (prokariotyczny i eukariotyczny) rozpoczynają się od syntezy kwasu fosfatydowego (PA). Jednak acylotransferazy zlokalizowane w plastydach różnią się specyficznością substratową od tych zlokalizowanych w retikulum endoplazmatycznym. Dlatego PA wyprodukowany w szlaku prokariotycznym charakteryzuje się obecnością kwasu 16:0 w pozycji *sn*-2. Kwas fosfatydowy powstały zaś w szlaku eukariotycznym

w pozycji *sn*-2 posiada głównie 18-to węglowe kwasy tłuszczowe, a 16:0 obecny jest tylko w pozycji *sn*-1 (Somerville i wsp., 2000). W szlaku prokariotycznym w chloroplastach syntetyzowane są następujące lipidy: PA, PG, DAG, galaktolipidy takie jak monogalaktozydylodiacylglicerol (MGDG, ang. *monogalactosyldiacylglycerol*), digalaktozydylodiacylglicerol (DGDG; ang. *digalactosyldiacylglycerol*) i sulfochinowozylodiacylglicerol (SQDG, ang. *sulfoquinovosyldiacylglycerol*), (Sayanova i wsp., 2017). DAG wykorzystywany do biosyntezy tych galaktolipidów może jednakże pochodzić również z eksportu z cytoplazmy i być pierwotnie syntetyzowany w szlaku eukariotycznym. W szlaku eukariotycznym syntetyzowane są zaś główne glicerolipidy cytoplazmatyczne: PA, DAG, PC, PE, PG, PI, PS (Somerville i wsp., 2000).

Chloroplasty u okrzemek otoczone są przez cztery membrany, z których ta najbardziej zewnętrzna prawdopodobnie zapewnia połączenie z retikulum endoplazmatycznym. Z uwagi na to dokładna lokalizacja syntezy lipidów w tych organizmach poprzez szlak prokariotyczny jest trudna do ustalenia (Sayanova i wsp., 2017).

## **1.4. Charakterystyka i biosynteza fosfolipidów**

### **1.4.1. Budowa, funkcja i znaczenie fosfolipidów**

Fosfolipidy dzieli się na różne klasy, które definiuje grupa polarna dołączona do reszty fosforanowej z pozycji *n*-3 fosfolipidu (Rys. 1). W każdej klasie fosfolipidów można znaleźć liczne różnice molekularne określone przez łańcuchy acylowe zestryfikowane do szkieletu glicerolowego w pozycji *sn*-1 i *sn*-2, które to różnią się długością i stopniem nienasyconości. Każda klasa fosfolipidów ma specyficzne fizykochemiczne właściwości determinowane przez kompozycję kwasów tłuszczowych i właściwości grupy polarnej. Kompozycja kwasów tłuszczowych różni się między poszczególnymi klasami fosfolipidów. Np. u drożdży PE i kardiolipina (CL) są bogate w nienasycone grupy acylowe, a PI posiada przewagę nasyconych grup acylowych. Skład klas fosfolipidów i ich kompozycja kwasów tłuszczowych w dużym stopniu determinuje fizyczne właściwości membran, w tym ich ładunek powierzchniowy oraz płynność (Renne i wsp., 2015).

Fosfatydylocholina (PC, ang. *phosphatidylcholine*) i fosfatydyloetanolamina (PE, ang. *phosphatidylethanolamine*) stanowią ponad 50% wszystkich klas fosfolipidów w błonach komórek eukariotycznych. Fakt ten powoduje, że odgrywają one zarówno

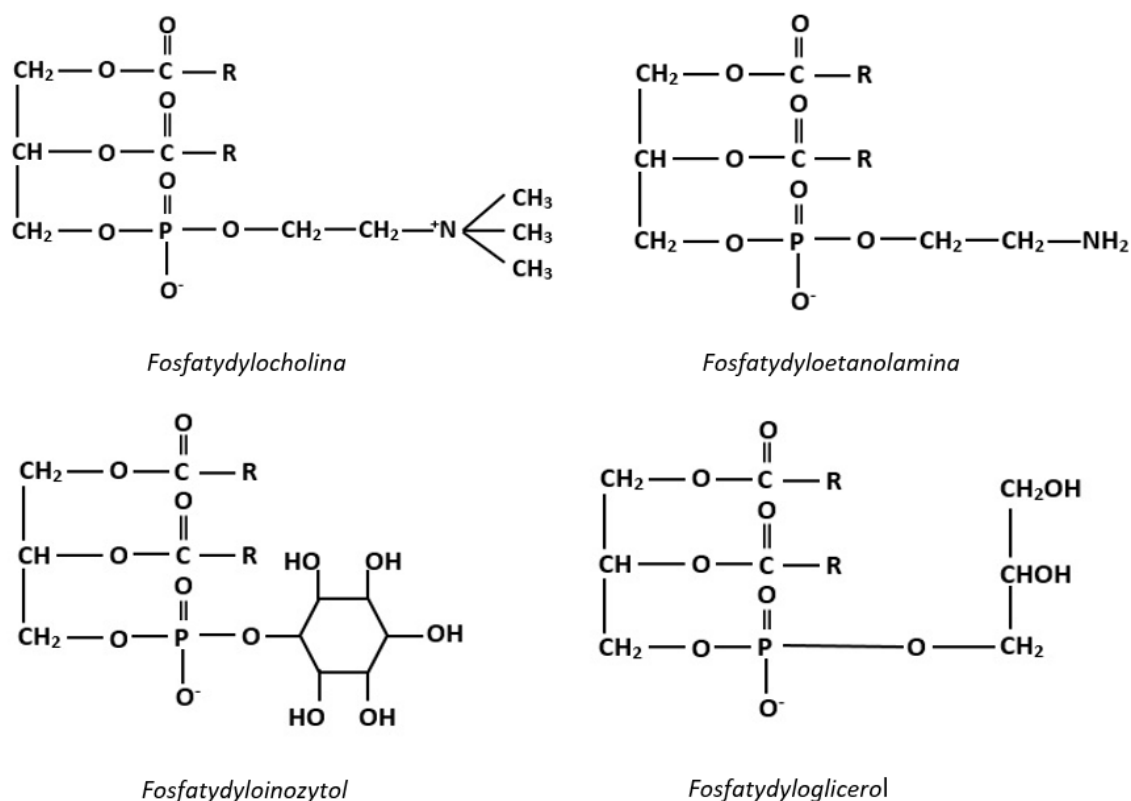
ważną rolę w budowie jak i w funkcjonowaniu tych błon (Gibellini i Smith, 2010; Cowan, 2006). Cząsteczka PC ma cylindryczny kształt, dzięki czemu spontanicznie wbudowuje się w błony dwuwarstwowe. Dlatego idealnie nadaje się na element strukturalny membran komórkowych. Oprócz pełnienia funkcji budulcowej membran biologicznych tworzących selektywną barierę pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a wewnętrznym, PC bierze udział w licznych specyficznych procesach biologicznych komórki. Jest prekursorem lipidowych cząsteczek sygnalizacyjnych takich jak LPC, kwas fosfatydowy (PA) i diacylglicerol (DAG), dlatego pełni ważną rolę w przekazywaniu sygnału w komórce. U roślin, w PC przebiega modyfikacja syntetyzowanych *de novo* kwasów tłuszczowych w tym wprowadzanie wiązań podwójnych. Wszelkie nieprawidłowości na drodze biosyntezy PC u drożdży prowadzą do tworzenia niewydolnych oddechowo komórek, które tworzą małe kolonie w pożywce z dodatkiem glukozy.

Fosfatydyloetanolamina jest zazwyczaj drugą, co do zawartości klasą fosfolipidów występujących w tkankach zwierzęcych i roślinnych, natomiast u mikroorganizmów przeważnie jest główną klasą (Christie i Han, 2012). PE przyjmuje kształt stożkowy, na co wpływa stosunkowo mała cząsteczka etanolaminy. Taka budowa PE powoduje, że fosfolipidy te mogą tworzyć jednowarstwowe struktury membranowe oraz struktury nazywane heksagonalnymi (Ball i wsp., 2017). Uważa się, że dzięki zdolności do tworzenia struktur błonowych innych niż dwuwarstwowe, PE odpowiada za włączanie białek w błony, ruch białek w płaszczyźnie błony, fałdowanie i stabilizację kompleksów białkowych w błonach, tworzenie pęcherzyków błonowych oraz transport białek za pomocą tych pęcherzyków (Birner i wsp., 2001). Dodatkowo PE jest odpowiedzialne za fałdowanie się błon i aktywność białek związanych z błoną (Gibellini i Smith, 2010). Badania nad komórkami *E. coli* oraz komórkami ssaków wskazują, że PE odgrywa kluczową rolę podczas podziału komórkowego, zapewniając właściwy przebieg cytokinezy (Mileykovskaya i Dowhan, 2005).

U wyższych eukariontów oraz drożdży fosfolipidy występują w podobnej kompozycji złożonej głównie z: PC, PE, PI, PS, oraz kardiolipiny (CL; ang. *cardiolipin*). Szlaki biosyntezy fosfolipidów u roślin i drożdży są dobrze poznane i w dużej mierze są do siebie podobne (Kroon, 2007). PI, PS oraz fosfatydyloglicerol (PG) są drugorzędnymi komponentami cytoplazmatycznych błon komórkowych. Za to w chloroplastach PG jest głównym fosfolipidem zarówno w tylakoidach jak i otoczce membranowej (Cowan, 2006). Cząsteczki PG lokalizują się blisko centrów reakcji fotosystemu I (PSI) i fotosystemu II (PSII), gdzie odgrywają kluczową rolę strukturalną i funkcjonalną w procesie fotosyntezy



(Wada i Murata, 2007). Ponadto, zlokalizowany w plastydach PG bierze udział w transporcie białek z cytoplazmy do zewnętrznej błony chloroplastu (Kim i wsp., 2014). PG odgrywa również rolę w regulacji biosyntezy MGDG poprzez aktywację enzymu syntazy monogalaktozydylacyloglicerolu – głównego enzymu biosyntetyzującego MGDG w roślinach (Dubots i wsp., 2010).



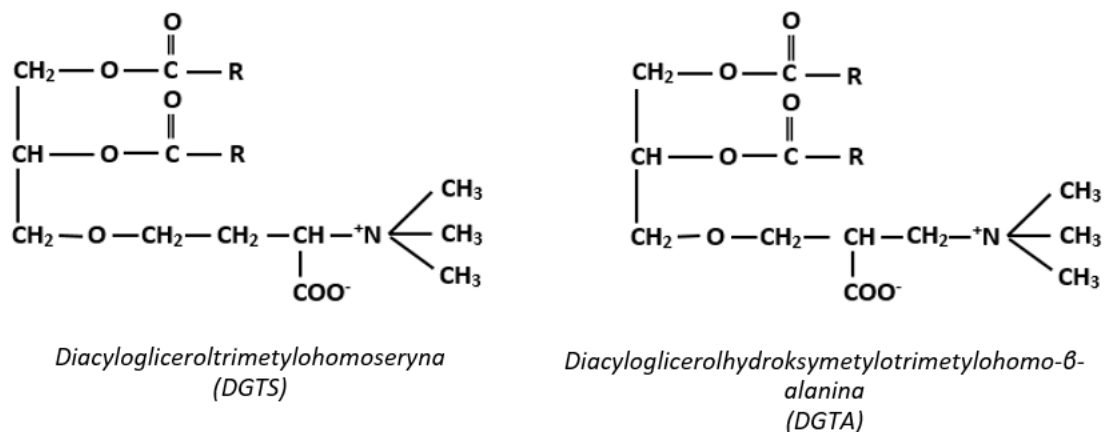
**Rys. 1.** Struktura chemiczna powszechnie występujących fosfolipidów.

Fosfatydyloseryna u roślin stanowi do 2% wszystkich klas fosfolipidów i występuje prawdopodobnie wyłącznie w wewnętrznej warstwie błony komórkowej. Pomimo niewielkiej zawartości PS w komórkach roślinnych cząsteczka ta pełni ważne funkcje strukturalne oraz bierze udział w procesach biologicznych komórki. Utrzymuje ona asymetrię błony komórkowej. Transport PS do zewnętrznej warstwy błony komórkowej powoduje zaburzenie asymetrii lipidów błon co prowadzi do śmierci komórki (Rani i wsp., 2020). Dodatkowo wykazano, że PS jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania niektórych enzymów np. dobrze poznano funkcję PS jako kofaktora podczas aktywacji białka kinazy C. Białka te pełnią ważną rolę w różnych szlakach

transdukcji sygnału w komórce podczas takich procesów jak wzrost komórkowy, morfogeneza czy egzocytoza (Vance i Steenbergen, 2005; Nishizuka, 2003).

PI jest trzecim najczęściej występującym fosfolipidem w niefotosyntetyzujących strukturach membranowych roślin. W komórkach eukariotycznych PI pełni dwie główne funkcje. Oprócz tego, że stanowi jeden z głównych fosfolipidów budujących błony biologiczne jest również ważnym prekursorem w syntezie polifosfoinozytydów - różnie ufosforylowanych cząsteczek PI biorących udział w procesie transdukcji sygnału w komórce podczas np. transportu pęcherzykowego czy regulacji proliferacji komórki (Collin i wsp., 1999).

Główne fosfolipidy występujące u *P. tricornutum* to PC, PE i PG, jednak ich względny udział może się różnić w zależności od warunków hodowli (Yang i wsp., 2017). Okrzemki syntetyzują również glicerolipidy niefosforowe, tzw. lipidy betainowe (BL), które nie występują w roślinach wyższych. BL zawierają polarną grupę amino-acylową, połączoną wiązaniem estrowym w pozycji *sn*-3 szkieletu glicerolowego (Rys. 2), (Sayanova i wsp., 2017). Najczęściej występującym lipidem betainowym wśród królestw takich jak bakterie, pierwotniaki, chromisty czy grzyby jest diacylglicerolotrimetylohomoseryna (DGTS, ang. *diacylglyceryltrimethylhomoserine*). Do tej pory nie udało się w pełni poznać funkcji pełnionej przez BL. Przypuszcza się, że DGTS odgrywa kluczową rolę w adaptacji alg podczas niedoboru fosforu w środowisku naturalnym. Niedobór fosforu powoduje degradację fosfolipidów poprzez wykorzystywanie zawartego w nich fosforu do innych szlaków metabolicznych. Wykazano, że podczas degradacji fosfolipidów zawartość lipidów betainowych wzrasta, co sugeruje, że mogą one zastępować funkcję fosfolipidów w membranach komórkowych. BL mogą również pełnić funkcje w procesie adaptacji do niskich temperatur, ponieważ DGTS charakteryzuje się wysoką zawartością EPA będącego wielonienasyconym długołańcuchowym kwasem tłuszczowym. Takie wielonienasycone kwasy tłuszczowe dołączane do lipidów membranowych przyczyniają się do utrzymania płynności membran, zwłaszcza w niskich temperaturach (Murakami i wsp., 2018).



**Rys. 2.** Struktura chemiczna dwóch lipidów betainowych.

#### 1.4.2. Szlaki biosyntezy fosfolipidów

U okrzemek mechanizm biosyntezy poszczególnych klas lipidów nie jest na chwilę obecną do końca poznany. Przypuszcza się, że jest on podobny do biosyntezy lipidów u roślin wyższych (Sayanova i wsp., 2017). U eukariontów prekursorem wszystkich fosfolipidów jest kwas fosfatydowy. Powstaje on w wyniku sekwencyjnego przyłączenia dwu kwasów tłuszczowych do grup hydroksylowych glicerolo-3-fosforanu. Z kolei pozostałe fosfolipidy powstają bądź w szlaku „CDP-diacylglicerolu” (PG, CL, PS, PI) bądź w szlaku „diacyloglicerolu” (PC, PE) przy wykorzystaniu metabolitów kwasu fosfatydowego (Somerville i wsp., 2000). U roślin synteza PA zachodzi w plastydach oraz w strukturach poza-plastydowych. Przyłączenie pierwszej grupy acylowej do glicerolo-3-fosforanu w pozycji *sn*-1 jest katalizowana przez acylotransferazę glicerolo-3-fosforanu (GPAT, ang. *glycerol-3-phosphate acyltransferase*), (Botella i wsp., 2017). U roślin i niektórych alg zidentyfikowano dwa typy enzymów GPAT: plastydowy i poza-plastydowy, co sugeruje, że reakcje te u okrzemek również mogą zachodzić zarówno w plastydach jak i w retikulum endoplazmatycznym (Sayanova i wsp., 2017). Acylotransferaza acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy (LPAAT; ang. *lysophosphatidic acid acyltransferase*) kończy syntezę PA poprzez przyłączenie drugiego kwasu tłuszczowego do kwasu lizofosfatydowego (LPA, ang. *lysophosphatidic acid*) w pozycji *sn*-2. Acylotransferazy plastydowe i poza-plastydowe wykazują wyraźne różnice w budowie i specyficzności substratowej (Botella i wsp., 2017).

Powstały kwas fosfatydowy może ulegać defosforylacji przekształcając się w diacyloglicerol (DAG). Reakcja katalizowana jest przez fosfatazę kwasu fosfatydowego

(PAP). PA może być też przekształcany do CDP-diacyloglicerolu w reakcji katalizowanej przez CDP:diacyloglicerol cytydylotransferazę wykorzystującą do tej reakcji CTP. Zarówno CDP-diacyloglicerol jak i DAG mogą być prekursorami fosfolipidów, galaktolipidów i TAG (Somerville i wsp., 2000).

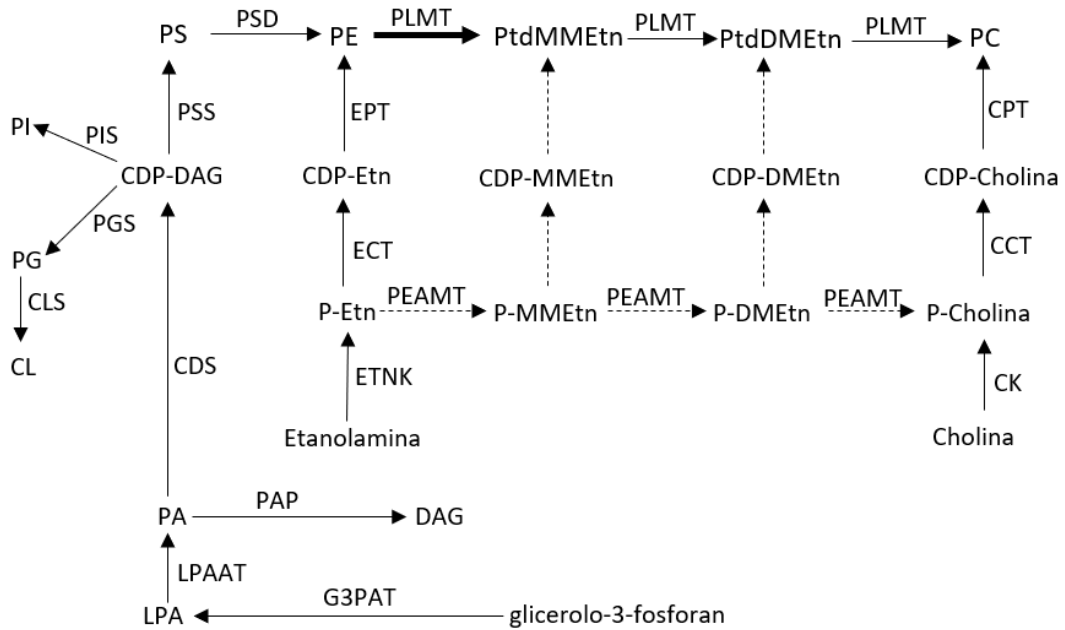
U większości komórek eukariotycznych w tym u drożdży i roślin synteza *de novo* PC i PE zachodzi w retikulum endoplazmatycznym, głównie poprzez szlak „diacyloglicerolu” przy wykorzystaniu, jako aktywnych metabolitów CDP-choliny i CDP-etanoloaminy. Synteza rozpoczyna się od fosforylacji choliny/etanoloaminy; powstaje fosfocholina/fosfoetanoloamina. Reakcja ta katalizowana jest przez zależną od ATP kinazę cholinową/kinazę etanoloaminową, a produktem ubocznym jest ADP. W drugim etapie cytydylotransferaza CTP:fosfocholiny/cytydylotransferaza CTP:fosfoetanoloamina wykorzystuje fosfocholiny/fosfoetanoloaminę i CTP do wytworzenia wysokoenergetycznego związku CDP-cholina/CDP-etanoloamina; uwolniony jest pirofosforan. Finalną reakcją syntezy PC/PE katalizuje CDP-cholina:1,2-diacyloglicerol fosfocholinotransferaza/CDP-etanoloamina:1,2-diacyloglicerol fosfoetanoloaminotransferaza, a substratami są CDP-cholina/CDP-etanoloamina i DAG; produktem ubocznym reakcji jest CMP (Somerville i wsp., 2000; Gibellini i Smith, 2010). U drożdży i roślin pozostałe fosfolipidy tj. PS, PI, PG i CL syntetyzowane są w szlaku CDP-diacyloglicerolu. CDP-DAG jest przekształcany do PS przez syntazę fosfatydyloseryny wykorzystującą jako drugi substrat wolną serynę. Syntaza ta zlokalizowana jest w retikulum endoplazmatycznym występującym w cytozolu oraz w jego subdomenie błonowej związanej z mitochondrium (MAM, ang. *mitochondria associated membrane*). Zsyntetyzowane w szlaku „CDP-diacyloglicerolu” PS może ulegać dekarboksylacji dając PE (fosfolipid, którego główny szlak biosyntezy *de novo* zachodzi w „szlaku diacyloglicerolu”). Reakcja przeprowadzana jest przez dekarboksylazę PS zlokalizowaną w wewnętrznej błonie mitochondrium oraz w aparacie Golgiego (Kroon, 2007). Synteza PI zachodzi w reakcji CDP-DAG z *myo*-inozytolem katalizowanej przez syntazę fosfatydyloinozytolu. PG powstaje zaś w reakcji CDP-DAG z glicerolo-3-fosforanem katalizowanej przez syntazę fosfatydyloglicerolo-fosforanową. Tworzy się wtedy fosforan fosfatydyloglicerolu, który jest przekształcany do PG przez fosfatazę fosfatydyloglicerolo-fosforanową. CL powstaje zaś w reakcji PG z CDP-DAG katalizowanej przez syntazę difosfatydyloglicerolową (Cowan, 2006; Carman i Han, 2011).

U drożdży dodatkowo istnieje szlak metylacji PE do PC (Renne i wsp., 2015). Gdy cholina jest dostarczana z zewnątrz synteza PC zachodzi poprzez szlak diacyloglicerolu z wykorzystaniem CDP-choliny. Natomiast w warunkach braku egzogennej choliny, produkcja PC polega na metylacji PE (Renne i wsp., 2015). Enzymy przeprowadzające proces metylacji to fosfolipidowe N-metylotransferazy (PLMT, ang. *phospholipid N-methyltransferase*) zlokalizowane w retikulum endoplazmatycznym, które wykorzystują s-adenozylometioninę (SAM) jako donora grupy metylowej. Aktywność enzymatyczną PLMT odnotowano również u roślin, jednak ich rola w biosyntezie PC jest mniej poznana, ponieważ większość roślin może wytwarzać grupę cholinową całkowicie za pośrednictwem metylacji fosfoetanolaminy (Keogh i wsp., 2009).

Metylacja PE do PC przez PLMT u drożdży przeprowadzana jest w trzech krokach. Pierwsza metylacja daje fosfatydylomonometyloetanolaminę (PMME, ang. *phosphatidylmonomethylethanolamine*). Druga i trzecia reakcja metylacji daje kolejno fosfatydylodimetyloetanolaminę (PDME, ang. *phosphatidyl dimethylethanolamine*) i PC (Kroon, 2007).

U niektórych roślin obserwuje się konwersję PE do PS przy udziale enzymu katalizującego wymianę zasady seryny (ang. *serine Base Exchange enzyme*) na etanolaminę. Część PS wchodzącego w skład błon komórkowych jest syntetyzowana *in situ*. Duża jednak część PS syntetyzowana w retikulum endoplazmatycznym (albo przez syntazę PS albo przez enzym katalizujący wymianę zasady seryny), jest transportowana do mitochondrium gdzie zachodzi jej dekarboksylacja do PE (Cowan, 2006).

Na poniższym Rys. 3 przedstawiono uproszczony schemat biosyntezy fosfolipidów.



**Rys. 3.** Uproszczony schemat biosyntezy fosfolipidów wg. Kroon (2007) oraz Keogh i wsp. (2009) z modyfikacjami. Szlaki zaznaczone ciągłymi strzałkami zachodzą zarówno u roślin jak i u drożdży. Pogrubioną strzałką została zaznaczona reakcja charakterystyczna tylko dla drożdży, a strzałkami przerywanymi tylko dla roślin.

CDP-DAG, cytydynodifosfoglicerol; PC, fosfatydylocholina; PE, fosfatydyloetanolamina; PS, fosfatydyloseryna; PI, fosfatydyloinozytol; PG, fosfatydyloglicerol; CL, kardiolipina; PtdMMEtn, fosfatydylomonometyloetanolamina; PtdDMEtn, fosfatydylodimetyloetanolamina; G3PAT, acylotransferaza glicerolo-3-fosforanu; LPAAT, acylotransferaza acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy; PAP, fosfataza kwasu fosfatydowego, PSS, syntaza fosfatydyloseryny; PSD, dekarboksylaza fosfatydyloseryny; CDS, syntaza CDP-diacylglicerolu; ETNK, kinaza etanolaminowa; CK, kinaza cholinowa; ECT, cytydylotransferaza CTP:fosfoetanolaminy; CCT, cytydylotransferaza CTP:fosfocholiny; EPT, CDP-etanolamina: 1,2-diacyloglicerol fosfoetanolaminotransferaza; CPT, CDP-cholina: 1,2-diacyloglicerol fosfocholinitransferaza; PIS, syntaza fosfatydyloinozytolu; CLS, syntaza kardiolipiny; PGS, syntaza fosforanu fosfatydyloglicerolu + fosfataza fosforanu fosfatydyloglicerolu; PLMT, fosfolipidowa N-metylotransferaza; PEAMT, N-metylotransferaza fosfoetanolaminy.

## **1.5. Charakterystyka i biosynteza triacylogliceroli**

### **1.5.1. Budowa, funkcja i znaczenie triacylogliceroli**

Triacyloglicerole (TAG; ang. *triacylglycerols*) zawierają trzy cząsteczki kwasów tłuszczowych związanych ze szkieletem glicerolowym. TAG są obecne u wszystkich eukariontów, w tym u zwierząt, roślin wyższych, alg, grzybów, protistów i niektórych prokariontów. U roślin są głównymi lipidami magazynującymi energię. Gromadzone są w rozwijających się nasionach, płatkach kwiatów, ziarnach pyłku i owocach. Te zgromadzone w nasionach dostarczają składniki odżywcze potrzebne do kiełkowania i rozwoju siewek (Cagliari i wsp., 2011). U różnych mikroalg w tym u *P. tricornutum* TAG jest najobficiej występującym lipidem. W warunkach hodowli z ograniczonym dostępem azotu organizmy te mogą produkować nawet wyższe jego ilości niż w normalnych warunkach, przekraczające 70% wszystkich lipidów (Yang i wsp., 2017). Po hydrolizie TAG przez odpowiednie lipazy, uwolnione kwasy tłuszczowe mogą być dalej metabolizowane w procesie  $\beta$ -oksydacji dostarczając energii lub substratów dla glukoneogenezy. Mogą też być przekształcane do acylo-CoA i stanowić substrat dla reakcji acylacji np. w celu biosyntezy fosfolipidów (Athenstaedt i Daum, 2006). U większości nasion TAG jest zbudowany z tych samych grup acylowych co lipidy membranowe: kwas palmitynowy (16:0), kwas stearynowy (18:0), kwas oleinowy (18:1), kwas linolowy (18:2), kwas  $\alpha$ -linolenowy (18:3). Te kwasy tłuszczowe są często nazywane, jako powszechnie/zwyczajne kwasy tłuszczowe.

Triacyloglicerole stanowią również wartościowy materiał energetyczny w diecie człowieka, szczególnie te pochodzące z olejów roślinnych (Cagliari i wsp., 2011). Stają się również coraz ważniejszym surowcem w przemyśle chemicznym gdzie wykorzystywane są do produkcji farb, detergentów, smarów, biopaliw oraz nylonu. Z uwagi na szybko wyczerpujące się zasoby ropy naftowej ich znaczenie w tym sektorze gospodarki będzie się tylko zwiększało (Lung i Weselake, 2006).

### **1.5.2. Szlaki biosyntezy triacylogliceroli**

Można wyróżnić dwie drogi syntezy TAG: szlak zależny od acylo-CoA i szlak niezależny od acylo-CoA. Szlak zależny od acylo-CoA nazywany jest szlakiem Kennedy'ego, który u eukariontów zachodzi prawdopodobnie w retikulum endoplazmatycznym. Rozpoczyna się on od stopniowej acylacji glicerolo-3-fosforanu do PA. Reakcje te zostały opisane w rozdziale wcześniejszym. Powstały PA może brać dalej

udział w syntezie TAG, poprzez działanie fosfatazy kwasu fosfatydowego (PAP), która uwalnia grupę fosforanową z cząsteczki PA i produkuje DAG. Następnie acylotransferaza acylo-CoA:diacyloglicerol (DGAT, ang. *diacylglycerol acyltransferase*) katalizuje reakcję acylacji DAG do TAG przy użyciu acylo-CoA.

Alternatywnie TAG powstaje poprzez szlak niezależny od acylo-CoA. W tym wypadku nowo zsyntetyzowane kwasy tłuszczowe są najpierw włączane do lipidów retikulum endoplazmatycznego, a potem akumulowane w TAG. Nowo zsyntetyzowane kwasy tłuszczowe mogą być wprowadzane bezpośrednio do PC poprzez cykl Lands'a lub cykl LPLAT (Lands, 1958; Klińska i wsp., 2020), a pośrednio przez PA i DAG. Dalej kwasy tłuszczowe z PC mogą być włączane do TAG poprzez działanie acylotransferazy fosfolipid:diacylglicerol (PDAT, ang. *phospholipid: diacylglycerol acyltransferase*). Ten enzym przenosi acyl z pozycji *sn*-2 fosfolipidów do DAG. Jego aktywność zidentyfikowano we frakcjach mikrosomalnych drożdży i niektórych roślinach oleistych. Wykazano, że PDAT z *A. thaliana* może wykorzystywać kwasy tłuszczowe różnych fosfolipidów, wykazując jednak najwyższą aktywność w stosunku PE i PC. Może przenosić kwasy tłuszczowe o długości łańcucha acylowego od C10 do C22 wykazując jednak najwyższą aktywność w stosunku do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i kwasów tłuszczowych posiadających grupę hydroksylową czy epoksydową (Stahl i wsp., 2004; Cagliari i wsp., 2011).

Większość organizmów eukariotycznych posiada geny kodujące dwie główne izoformy enzymów typu DGAT: DGAT1 i DGAT2. Każda z tych głównych izoform DGATu może być kodowana przez kilka genów (Demski i wsp., 2019). W okrzemce *Fragilariopsis cylindrus* zidentyfikowano cztery przypuszczalne geny kodujące enzymy typu DGAT2, a u *P. tricornutum* pięć genów kodujących ten typ enzymów. W warunkach standardowych VLC-PUFA u *P. tricornutum* występują głównie w galaktolipidach. Ich akumulacja w TAG rozpoczyna się dopiero w warunkach niskiej zawartości fosforanów i związków azotu. W warunkach tych następuje też zwiększona produkcja TAG. Wykorzystywany do biosyntezy triacylogliceroli DAG powstaje najprawdopodobniej w szlaku Kennedy'ego, a w końcowy etap syntezy TAG włączone są (prawdopodobnie) zarówno enzymy typu DGAT jak i enzymy typu PDAT chociaż ich względny udział nie jest określony (szlak Kennedy'ego przedstawiono na Rys. 4). Podobny mechanizm włączania EPA (należy do VLC-PUFA) do TAG zaobserwowano u *Fiistulifera solaris* (Sayanova i wsp., 2017).



## 1.6. Enzymy typu LPLAT (acyloransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid)

Acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLATy) są wszechobecną grupą enzymów, którą można znaleźć u zwierząt, roślin i grzybów. Mogą one wykorzystywać szerokie spektrum zarówno lizofosfolipidów jak i acylo-CoA do produkcji różnych rodzajów fosfolipidów. Specyficzność substratowa LPLATów jest zróżnicowana. Nazewnictwo poszczególnych grup LPLATów zależy od preferowanego przez nie lizofosfolipidu. Najlepiej poznane LPLATy to: LPCAT, LPEAT i LPAAT, które preferencyjnie wykorzystują LPC, LPE i LPA. U drożdży scharakteryzowano dwa rodzaje LPLATów: jeden z najwyższą specyficznością substratową do LPA i drugi z najwyższą specyficznością substratową do LPC. Pierwszy z nich jest kodowany przez gen *SLC1*, kolejny przez gen *YOR175c* (inne jego nazwy: *ALE1*, *SCL4*, *LPT1*). W genomie *A. thaliana* znaleziono dwa geny: *At1g12640* i *At1g63050*, kodujące acylotransferazy: *AtLPCAT1* i *AtLPCAT2* wykazujące preferencję do LPC, jako substratu. Sklonowano też geny: *At1g80950* i *At2g45670* kodujące enzymy: *AtLPEAT1* i *AtLPEAT2* specyficzne do LPE. Geny kodujące LPLATy o wysokiej specyficzności substratowej w stosunku do LPC zostały sklonowane również z innych organizmów: *Ricinus communis*, *Hiptage benghalensis*, *Lesquerella fendleri* i *Carthamus tinctorius* (Jasieniecka-Gazarkiewicz i wsp., 2016; Klińska i wsp., 2019). LPLATy u mikroalg nie zostały jeszcze dobrze scharakteryzowane.

Badania nad specyficznością substratową poznanych LPLATów wykazały, że pochodzące z *A. thaliana* enzymy LPCAT1 i LPCAT2 katalizują acylację i deacylację obydwu pozycji: *sn-1* i *sn-2* w PC, ale wykazują większą preferencję do pozycji *sn-2*. W reakcji odwrotnej, reszty acylowe z pozycji *sn-2* w PC takie jak oleyoyl, linoleoyl i linolenoyl były przenoszone do puli acylo-CoA z podobną intensywnością. Te oraz inne wyniki badań nad metabolizmem lipidów przyczyniły się do wysnucia hipotezy, że roślinne LPCATy pełnią ważną rolę w regulacji kompozycji acylo-CoA w komórkach roślinnych poprzez przenoszenie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych z PC, czyli miejsca ich syntezy, do puli acylo-CoA (Lager i wsp., 2013; Jasieniecka-Gazarkiewicz i wsp., 2016; Klińska i wsp., 2019).

Biologiczne funkcje enzymów typu LPLAT mogą znacznie różnić się między różnymi tkankami i organizmami. Badania przeprowadzone na komórkach drożdży z nokautem jednego z dwu genów kodujących LPLATy wykazały, że do zachowania żywotności drożdży wystarczająca jest obecność jednego aktywnego genu kodującego te enzymy; „knockout” obu genów był dla drożdży letalny (Stahl i wsp., 2007). Jak

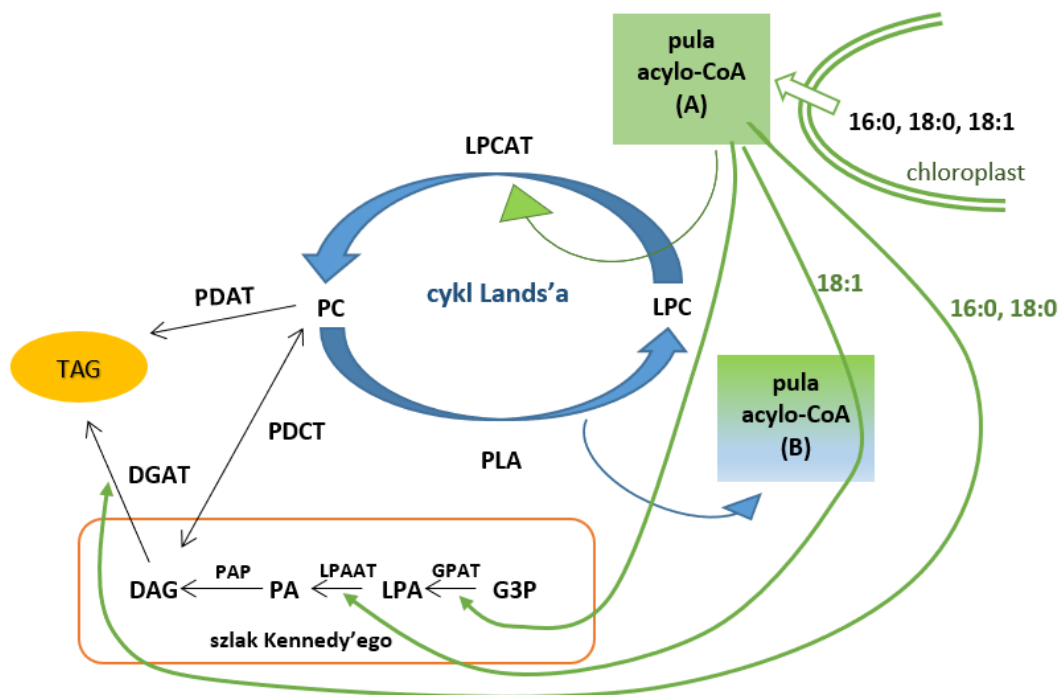
dotychczas istnieje niewiele doniesień na temat skutków „wyłączenia” genów kodujących roślinne LPLATy. Wang i wsp. (2012) wykazali, że „knockout” obu genów *Arabidopsis* (*At1g12640* i *At1g63050*) kodujących LPCAT1 i LPCAT2 nie miał wyraźnego wpływu na wzrost roślin i rozwój ich nasion. Z drugiej strony, homozygotyczny mutant *A. thaliana* z wyłączonym genem kodującym plastydowy LPAAT zamierał na wczesnym etapie embriogenezy (Kim i Huang, 2004). Wyłączenie genów kodujących LPEATy w roślinach *Arabidopsis* (mutanty insercyjne T-DNA) powodowało zaś poważne zaburzenia we wzroście i rozwoju tych roślin. Szczególnie wyraźne efekty fenotypowe odnotowywano u podwójnego mutantu (*lpeat1 lpeat2*) i mutantu z nieaktywnym genem kodującym LPEAT2 (Jasieniecka-Gazarkiewicz i wsp., 2017).

### **1.7. Remodelowanie fosfolipidów**

Mechanizm remodelowania fosfolipidów był znany dotychczas jako cykl Lands’a (Lands 1958). Wykazano, że zachodzi on u roślin, grzybów i ssaków. Polega on na deacylacji i reacylacji fosfolipidu w pozycji *sn*-2. Cykl ten zakłada, że w reakcjach tych biorą udział dwa typy enzymów; enzymy które przeprowadzają deacylację fosfolipidów np. fosfolipazy i enzymy typu LPLAT które przeprowadzają acylację powstałych lizofosfolipidów. Uważano/uważa się, że cykl Lands’a odgrywa ważną rolę w utrzymaniu optymalnych funkcji bony. Bierze on bowiem udział w redystrybucji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) w roślinach. Rośliny wytwarzają PUFA przez desaturację prekursorowych kwasów tłuszczowych, które są estryfikowane do galaktolipidów w chloroplastach i fosfolipidów w pozaplastydowych przedziałach komórkowych. Uważa się, że cykl Lands’a promuje wymianę kwasów tłuszczowych pomiędzy fosfolipidami a pulą acylo-CoA. PUFA są następnie przenoszone do innych lipidów, takich jak TAG przez bezpośrednią transacylację lub przeniesienie do puli acylo-CoA (cykl Lands’a), albo przez wymianę grupy fosfocholinowej między PC a DAG (Stahl i wsp., 2007). Ostatni proces zachodzi poza cyklem Lands’a przy udziale enzymu transferazy fosfocholinowej PC-DAG (PDCT, ang. *PC-DAG phosphocholine transferase*). Edycja grup acylowych w PC i następnie wymiana fosfocholiny między PC a DAG kontroluje większość przepływu PUFA przez PC do dalszej syntezy TAG (Bates i wsp., 2013). Ostatnio zaproponowano, że obok cyklu Lands’a w remodelowaniu acylo-lipidów bierze udział inny cykl nazwany „cyklem LPLAT” (Klińska i wsp., 2020). W cyklu tym odwracalność reakcji katalizowanej przez enzymy typu LPLAT odgrywa kluczową rolę – enzymy te

przeprowadzają zarówno deacylację fosfolipidów, jak i reacylację powstałych lizofosfolipidów. Względny udział cyklu Lands'a i cyklu LPLAT w remodelowaniu acylo-lipidów *in vivo* nie został jak dotychczas ustalony. Ostatnio Klińska i wsp. (2019) dostarczyli pewnych dowodów dotyczących remodelowania PC frakcji mikrosomalnych uzyskanych z nasion *Camelina sativa* w warunkach *in vitro* poprzez LPCATy (cykl LPLAT) i działanie innych enzymów (związanych z cyklem Lands'a) i wykazali, że intensywność obu cykli zmieniała się podczas rozwoju nasion z tym, że w cykl LPLAT był zawsze cyklem dominującym. Cykl Lands'a oraz jego oddziaływanie ze szlakiem Kennedy'ego przedstawiono na Rys. 4.

Nie wiadomo, czy proces remodelowania acylo-lipidów w okrzemkach zachodzi tak samo jak w roślinach wyższych, ponieważ w okrzemkach występują dodatkowo lipidy betainowe (BL) których nie ma w roślinach, i nie wiadomo czy mogą one również być donorem lub akceptorem grup acylowych (Sayanova i wsp., 2017).



**Rys. 4.** Uproszczony schemat przedstawiający główne etapy cyklu Lands'a, wg Wang i wsp. (2012) przy udziale enzymu LPCAT, oraz jego oddziaływanie ze szlakiem Kennedy'ego. Pula acylo-CoA oznaczona literą A to główna pula *de novo* zsyntetyzowanych acylo-CoA w chloroplastach. Z puli A głównie 18:1, jest kierowany do cyklu Lands'a do *sn*-2 pozycji w LPC. Kwasy tłuszczowe pochodzące z deacylacji PC mieszają się z pulą nowo powstających kwasów tłuszczowych i tworzą pulę B.

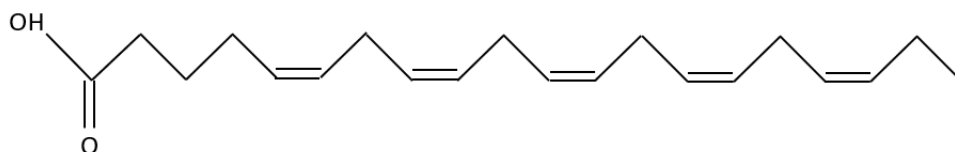
LPCAT, acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina; PC, fosfatydylocholina; LPC, lizofosfatydylocholina; TAG, triacyloglicerol; DAG, diacyloglicerol; PLA, fosfolipaza A; PA, kwas fosfatydowy; G3P, glicerolo-3-fosforan; PAP, fosfataza kwasu fosfatydowego; LPAAT, acylotransferaza acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy; GPAT, acylotransferaza acylo-CoA:3-fosfoglicerol; PDAT, acylotransferaza fosfolipid:diacyloglicerol; DGAT, acylotransferaza acylo-CoA:diacyloglicerol; PDCT, cholinofosfotransferaza fosfatydylocholina:diacyloglicerol.

## 1.8. Charakterystyka i biosynteza VLC-PUFA (bardzo długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych)

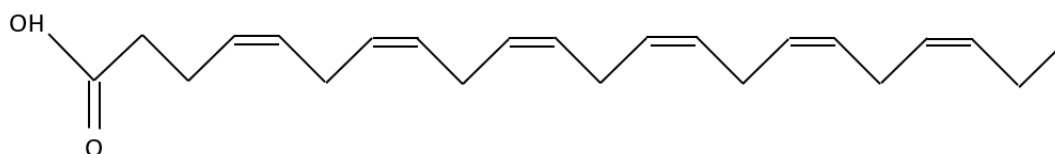
### 1.8.1. Rola VLC-PUFA w diecie człowieka

Główne kwasy omega-3 występujące w pożywieniu to kwas  $\alpha$ -linolenowy (ALA; 18:3,  $\Delta^{9, 12, 15}$ ), kwas eikozapentaenowy (EPA; 20:5;  $\Delta^{5, 8, 11, 14, 17}$ ), kwas dokozapentaenowy (DPA; 22:5;  $\Delta^{7, 10, 13, 16, 19}$ ), kwas dokozaheksaenowy (DHA; 22:6;  $\Delta^{4, 7, 10, 13, 16, 19}$ ), (Rys.

5.). Główne kwasy omega-6 występujące w pożywieniu to kwas linolowy (LA; 18:2;  $\Delta^{9,12}$ ) i kwas arachidonowy (AA; 20:4;  $\Delta^{5,8,11,14}$ ), (Abedi i wsp., 2014).



*Kwas eikozapentaenowy (20:5  $\Delta^{5,8,11,14,17}$ )*



*Kwas dokozaheksaenowy (22:6  $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ )*

**Rys. 5.** Struktura chemiczna dwóch bardzo długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3.

Najbogatszym źródłem kwasów tłuszczowych EPA i DHA są ryby i owoce morza, ale to algi są głównymi producentami *de novo* tych kwasów (Innis, 2007). Natomiast ALA i LA występują głównie w zielonych warzywach i niektórych olejach roślinnych (olej rzepakowy, sojowy, lniany). Rośliny w stanie naturalnym (nie modyfikowane genetycznie) nie zawierają VLC-PUFA (Kim i wsp., 2014).

Ludzki organizm podobnie jak reszta ssaków może syntetyzować EPA i DHA ale z bardzo niską wydajnością, niewystarczającą, aby pokryć jego zapotrzebowanie na te kwasy (Harwood, 2019). Ponadto nie jest w stanie syntetyzować LA i ALA z kwasu oleinowego (Abedi i wsp., 2014). Dla zachowania prawidłowych funkcji organizmu ludzkiego konieczne jest, więc dostarczanie tych kwasów tłuszczowych wraz z pożywieniem (Tocher i wsp., 2019). Rekomenduje się, aby stosunek omega-6/omega-3 w diecie wynosił około 4/1. Wynika to z faktu, że kwasy omega-6 powodują wzrost mediatorów stanów zapalnych, podczas gdy omega-3 są prekursorami związków przeciwzapalnych. Uważa się, że większość „diet zachodnich” charakteryzuje się współczynnikiem o wartości około 15-20/1. Takie spożywanie kwasów omega-6 w nadmiarze może powodować przewlekły stan zapalny, który ma związek z poważnymi chorobami takimi jak: zapalenie stawów, demencja lub choroby sercowo-naczyniowe (Harwood, 2019).

Główną rolą nienasyconych kwasów tłuszczowych jest utrzymanie prawidłowej płynności błon i struktury komórek eukariotycznych. Pełnią one również funkcje sygnałowe w komórce (Domergue i wsp., 2005). Omega-3 PUFA takie jak DHA i EPA wykazują ważne funkcje biologiczne promujące ludzkie zdrowie. Badania na zwierzętach ujawniły, że DHA po spożyciu jest łatwo włączany do lipidów osocza, komórek krwi i mózgu. Jego zawartość w błonach lipidowych mózgu jest regulowana w zależności od ilości i rodzaju kwasów tłuszczowych dostarczanych z pożywieniem, ale zależy również od wieku. Zawartość ta rośnie w okresie rozwoju osobniczego i obniża się w okresie starzenia się organizmu (Innis, 2007). Szczególnie ważne jest dostarczanie odpowiednich ilości EPA i DHA do organizmu podczas jego rozwoju płodowego i w okresie niemowlęcym ponieważ brak tych kwasów w tym okresie może powodować nieprawidłowy rozwój mózgu i wpływać niekorzystnie na procesy związane z widzeniem (Castejon i wsp., 2020). Znajomość tych faktów doprowadziła do szerokiej produkcji preparatów zawierających DHA, przeznaczonych dla niemowląt (Petrie i wsp., 2012). Ponadto kwasy te regulują ciśnienie krwi, krzepliwość krwi, tolerancję na podwyższoną zawartość glukozy i procesy zapalne, dzięki czemu łagodzą wiele stanów patologicznych (Gammone i wsp., 2018, Tocher i wsp., 2019). Badania kliniczne wskazują, że niskie spożycie omega-3 VLC-PUFA jest związane ze zwiększonym ryzykiem powstawania zaburzeń poznawczych lub demencją. Spożywanie tych kwasów w odpowiednich ilościach daje korzyści neuroprotektoryjne i właściwości neuromodulacyjne, które mogą zapobiegać umysłowemu upośledzeniu postępującemu wraz z wiekiem (np. choroba Alzheimera), oraz zmniejszać częstość chorób psychicznych takich jak depresja lub neurodegeneracja (Castejon i wsp., 2020).

Obecnie, nawet gdyby ludzie chcieli spożywać więcej EPA i DHA, zapewnienie odpowiednio zrównoważonej ich podaży jest utrudnione. Głównym źródłem EPA i DHA w diecie człowieka są ryby morskie np. tuńczyk i makrela (Ruiz-Lopez i wsp., 2012). Jednak nadmierna eksploatacja łowisk powoduje, że zasoby ryb na całym świecie maleją, przez co ich połowy mogą nie być w stanie sprostać zapotrzebowaniu stale rosnącej populacji ludzkiej na kwasy tłuszczowe omega-3 (Cheng i wsp., 2010). UN FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2010) w 2008 roku podało dane, że z puli monitorowanych grup łowisk rybnych, 53% było w pełni wykorzystywane, 28% było nadmiernie eksploatowanych a 3% było wyczerpanych. Tylko 15% obserwowanych grup łowisk sklasyfikowano, jako nie w pełni wykorzystywane i zdolne do wyprodukowania większej ilości ryb niż wynosiły połowy. Ponadto oleje rybne z powodu

zanieczyszczenia ekosystemów morskich, zawierają potencjalnie toksyczne substancje takie jak: metale ciężkie czy dioksyne, przez co kwestionuje się zdrowotne korzyści wynikające z konsumpcji ryb. Należy też wziąć pod uwagę, że problem z pozyskaniem kwasów omega-3 nie może być rozwiązany poprzez rozwój uprzemysłowionej akwakultury. Pomimo, że ryby morskie są głównym źródłem kwasów omega-3 w diecie człowieka nie są one ich producentem. Pierwotnym źródłem omega-3 są mikroalgi morskie (np. okrzemki), dostarczające te kwasy tłuszczowe kolejnym organizmom morskim na drodze łańcucha pożywienia, na końcu którego są ryby. Akwakultura nie jest rozwiązaniem samym w sobie, wymaga raczej udoskonalenia poprzez wzbogacenie paszy dla ryb o źródło VLC-PUFA, co jest kolejnym wyzwaniem przy malejących zapasach omega-3 (Ruiz-Lopez i wsp., 2012). Dlatego istnieje zapotrzebowanie na trwałe zamienniki źródła kwasów omega-3 w diecie człowieka (Graham i wsp., 2007). W tym celu w ostatnich latach przeprowadzono wiele badań nad naturalnie występującymi szlakami biosyntezy EPA i DHA w algach oraz nad wykorzystaniem genów z tych mikroorganizmów morskich do tworzenia roślin transgenicznych syntetyzujących i akumulujących VLC-PUFA (np. EPA i DHA) (Harwood, 2019). Możliwość rozwinięcia produkcji lipidów zawierających kwasy omega-3 u roślin ma wiele zalet. Takie rozwiązanie może złagodzić presję wywieraną na przemysł akwakultury i zmniejszyć rybołówstwo. Ograniczyłoby to również problemy zdrowotne związane z obecnością dioksyn i polichlorowanych bifenyli (PCB) w paszach dla ryb (Ruiz-Lopez i wsp., 2012).

### 1.8.2. Szlaki biosyntezy VLC-PUFA

Kwas linolowy (LA, 18:2  $\Delta^{9,12}$ ) i  $\alpha$ -linolenowy (ALA, 18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ) są syntetyzowane przez rośliny w dużych ilościach, lecz u ludzi i innych ssaków obserwuje się brak ich syntezy. Organizm człowieka potrafi syntetyzować ARA, DHA i EPA z prekursorów LA i ALA przy wykorzystaniu szeregu enzymów desaturaz i elongaz. Jednak ta konwersja jest na tyle niska i niewystarczająca, że konieczne jest dostarczanie tych kwasów wraz z pożywieniem (Abedi i wsp., 2014).

U okrzemek syntetyzowane *de novo* nasycone kwasy tłuszczowe – palmitynowy (16:0) i stearynowy (18:0) mogą podlegać dalszym modyfikacjom przy udziale desaturaz zlokalizowanych w plastydach lub retikulum endoplazmatycznym (Sayanova i wsp., 2017). Zlokalizowana w stromie chloroplastów desaturaza  $\Delta^9$ -stearylo-ACP (SAD) oraz związana z retikulum endoplazmatycznym desaturaza  $\Delta^9$ -acylo-CoA (ADS) przekształcają

kwasy stearynowy (18:0) w kwas oleinowy (OA, 18:1  $\Delta^9$ ). Reakcje zachodzą w miejscu występowania tych enzymów czyli odpowiednio w chloroplastach albo w cytozolu (Sayanova i wsp., 2017). Powstały kwas oleinowy jest substratem dla  $\Delta^{12}$  desaturazy, która przekształca go w kwas linolowy (LA; 18:2  $\Delta^{9,12}$ ), a ten może być dalej konwertowany przez  $\Delta^{15}$  desaturazę do kwasu  $\alpha$ -linolenowego (ALA, 18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ). Desaturazy  $\Delta^{12}$  i  $\Delta^{15}$  występujące w ER wykorzystują jako substraty odpowiednio kwas linolowy i kwas linolenowy z pozycji *sn*-2 fosfolipidów, głównie fosfatydylocholin (Sayanova i wsp., 2017).

LA i ALA jako prekursory kwasów omega-6 oraz omega-3, należą do grupy niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (EFA, ang. *essential fatty acid*). Biosynteza VLC-PUFA z LA i ALA może zachodzić na dwa sposoby. Są nimi „szlak  $\Delta^6$ ” (konwencjonalny) występujący u większości organizmów syntetyzujących PUFA oraz „szlak  $\Delta^8$ ” alternatywny (Rys. 6), (Sayanova i wsp., 2017). Pomimo, że okrzemki (w tym *P. tricornutum*) charakteryzują się wysoce aktywnym „szlakiem  $\Delta^6$ ” przypuszcza się, że „szlak  $\Delta^8$ ” również u nich zachodzi (Sayanova i wsp., 2017). U *P. tricornutum* wyróżnia się 5 genów prawdopodobnie zaangażowanych w syntezę EPA: *FAD2* (desaturaza  $\Delta^{12}$ ), *PTD6* (desaturaza  $\Delta^6$ ), *PTD5B* (desaturaza  $\Delta^5$  beta), *PTD5A* (desaturaza  $\Delta^5$  alpha), *ELO6b2* (elongaza  $\Delta^6$  b2). Mają one wysoko współregulowane wzorce ekspresji (Muhlroth i wsp., 2013).

Biosynteza LC-PUFA opiera się na naprzemiennych reakcjach desaturacji i elongacji. Pierwszym etapem „szlaku  $\Delta^6$ ” jest  $\Delta^6$  desaturacja wykorzystująca jako substraty zarówno LA jak i ALA, czego efektem jest synteza odpowiednio kwasu  $\gamma$ -linolenowego (GLA, 18:3  $\Delta^{6,9,12}$ ) i stearydynowego (SDA, 18:4  $\Delta^{6,9,12,15}$ ). Powstałe GLA i SDA są kolejno substratami „ $\Delta^6$  elongazy” która wydłuża je o dwa węgle, co daje odpowiednio kwas dihomu- $\gamma$ -linolenowy (DGLA; 20:3  $\Delta^{8,11,14}$ ) i eikozatetraenowy (ETA; 20:4  $\Delta^{8,11,14,17}$ ).  $\Delta^6$  elongaza wykazuje jedynie aktywność w stosunku do kwasów tłuszczowych zbudowanych z 18 węgli i posiadających podwójne wiązanie w pozycji  $\Delta^6$ . Kończącym etapem jest synteza kwasu arachidonowego (ARA; 20:4  $\Delta^{5,8,11,14}$ ) i EPA przy udziale enzymu  $\Delta^5$  desaturazy (Cheng i wsp., 2010). Przypuszcza się, że u okrzemków elongacja EPA do kwasu dokozapentaenowego (DPA; 22:5  $\Delta^{7,10,13,16,19}$ ) zachodzi przy udziale specyficznej  $\Delta^5$  elongazy. Z kolei DPA jest konwertowany do DHA przez  $\Delta^4$  desaturazę (Sayanova i wsp., 2017). Wspomniane desaturazy wykorzystują odpowiednie kwasy tłuszczowe związane głównie z pozycją *sn*-2 odpowiednich glicerolipidów zaś



wspomniane elongazy odpowiednie kwasy tłuszczowe połączone z CoA (Domergue i wsp., 2003; Napier, 2007)

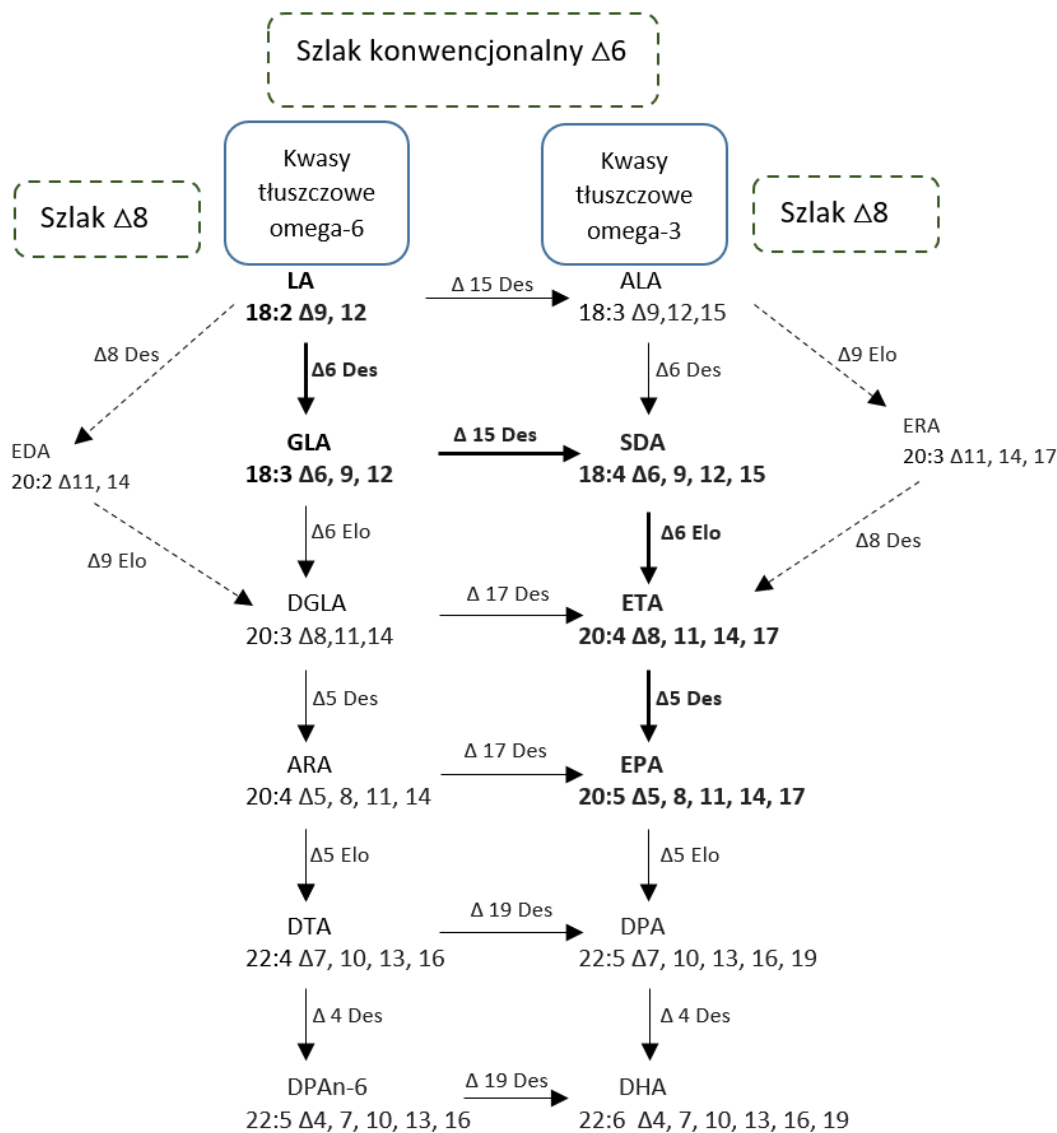
Niektóre organizmy morskie i protisty wykorzystują drugą drogę zwaną „szlakiem  $\Delta^8$ ”. W tym wypadku LA i ALA są najpierw wydłużane przez  $\Delta^9$  elongazę produkującą odpowiednio kwas eikozadienowy (EDA; 20:2  $\Delta^{11,14}$ ) i eikozatrienowy (ERA; 20:3  $\Delta^{11,14,17}$ ). EDA i ERA są zaś substratami dla następujących kolejno po sobie dwu desaturacji katalizowanych przez  $\Delta^8$  oraz  $\Delta^5$  desaturazę. Efektem tych reakcji są ARA i EPA podobnie jak w szlaku „konwencjonalnym” (Sayanova i wsp., 2017).

Kwasy tłuszczowe, aby przeszły etap elongacji muszą być w postaci acylo-CoA. Wydłużone kwasy tłuszczowe są z powrotem na drodze estryfikacji przyłączane do szkieletu glicerolowego fosfolipidów przy udziale odpowiednich acylotransferaz. Do reakcji przedłużania kwasów tłuszczowych elongazy wykorzystują malonylo-CoA i NADPH (Muhlroth i wsp., 2013).

U *P. tricornutum* desaturazy związane z retikulum endoplazmatycznym (*PtD6*, *PtD5*) wykorzystują jako substraty kwasy tłuszczowe wchodzące w skład PC. Pozycja związania kwasu tłuszczowego do cząsteczki glicerolu wpływa na przebieg reakcji. *PtD5* i *PtD6* wykazują najwyższą aktywność w stosunku do kwasów tłuszczowych z pozycji *sn*-2 PC. Natomiast desaturaza  $\Delta^{12}$  (*FAD2*) charakteryzuje się podobną aktywnością zarówno w stosunku do PC jak i MGDG oraz wykazuje wysoką specyficzność substratową do kwasu oleinowego (18:1  $\Delta^9$ ). Acylotransferazy znajdujące się w ER przeprowadzają estryfikację kwasów tłuszczowych do odpowiedniej pozycji cząsteczki glicerolu. Jest bardzo prawdopodobne, że acylotransferazy biorące udział w przyłączaniu LC-PUFA omega-3 u *P. tricornutum* podczas syntezy odpowiednich gliero-lipidów są podobne do tych u roślin (*LPLAT*, *GPAT*, *LPAAT*). Acylotransferazy u mikroalg nie zostały jednak dobrze scharakteryzowane i nie jest pewne jak daleko ich specyficzność substratowa pokrywa się z tą obserwowaną u ich odpowiedników u roślin wyższych (Muhlroth i wsp., 2013).

Po serii reakcji elongacji i desaturacji VLC-PUFA mogą uczestniczyć w różnych szlakach metabolicznych, w zależności od tego czy występują w postaci acylo-CoA czy związanej z łańcuchem glicerolowym acylo-lipidów (Zulu i wsp., 2018). Główne miejsce syntezy EPA nie jest dobrze poznane i wymaga dalszych badań. Proces ten jest dość złożony szczególnie w przypadku glonów z grupy Chromista, u których chloroplasty mają cztery membrany. EPA w postaci wolnej jest włączany do PE, PC albo lipidów betainowych, poprzez acylotransferazy szlaku Kennedy’ego. (Muhlroth i wsp., 2013).

VLC-PUFA syntetyzowane w cytozolu mogą być też transportowane do plastydów przez nieznaną jeszcze mechanizm gdzie są wbudowywane do glikolipidów: SQDG, MGDG oraz DGDG. Zawartość VLC-PUFA w tych lipidach może sięgać nawet do 50%. VLC-PUFA mogą być również włączane do TAG podczas przebudowy lipidów błonowych, kiedy to VLC-PUFA są uwalniane z glikolipidów (Zulu i wsp., 2018).



**Rys. 6.** Schemat przedstawiający biosyntezę VLC-PUFA u okrzemek z wyszczególnieniem szlaku konwencjonalnego  $\Delta 6$  i alternatywnego  $\Delta 8$ . Przeważający szlak biosyntezy EPA u *P.tricornutum* jest zaznaczony wytłuszczonym tekstem i strzałkami (Hamilton i wsp., 2014).

LA, kwas linolowy; GLA, kwas  $\gamma$ -linolenowy; DGLA, kwas dihomog $\gamma$ -linolenowy; ARA, kwas arachidonowy; DTA, kwas dokozatrienowy; DPAn-6, kwas dokozapentaenowy; ALA, kwas  $\alpha$ -linolenowy; SDA, kwas stearydynowy; ETA, kwas eikozatetraenowy; EPA, kwas eikozapentaenowy; DPA, kwas dokozapentaenowy; DHA, kwas dokozahexaenowy; EDA kwas eikozadienowy; ERA, kwas eikozatrienowy.

## 1.9. Wykorzystanie inżynierii genetycznej do produkcji VLC-PUFA w roślinach wyższych

Aby wytworzyć roślinę zdolną do syntetyzowania kwasów omega-3 VLC-PUFA metodami inżynierii genetycznej, trzeba wprowadzić do niej geny z innych organizmów kodujące białka biorące udział w szlaku ich biosyntezy. Będą to geny kodujące komponenty odpowiedzialne za pierwotną syntezę, ukierunkowany transport substratu jak i związków pośrednich w kierunku ostatecznego ich umiejscowienia w TAG. Geny te wymagają skoordynowanej ekspresji specyficznej tkankowo w rozwijających się nasionach transgenicznego gospodarza (Ruiz-Lopez i wsp., 2013). Aby zaszła konwersja występujących naturalnie w roślinach ALA do EPA, potrzeba trzech następujących po sobie etapów:  $\Delta^6$  desaturacji,  $\Delta^6$  elongacji i  $\Delta^5$  desaturacji. Na tej drodze enzymatycznej z LA może również powstać kwas tłuszczowy omega-6 „ARA”. Następnymi etapami prowadzącymi do uzyskania produkcji kolejnych omega-3 VLC-PUFA w roślinach są  $\Delta^5$  elongacja EPA do DPA oraz  $\Delta^4$  desaturacja DPA (22:5  $\Delta^{7, 10, 13, 16, 19}$ ) dająca DHA (Robert i wsp., 2005).

W ciągu ostatnich lat nastąpił znaczny postęp w ilości zidentyfikowanych genów wyżej opisanego szlaku biosyntezy VLC-PUFA u różnych organizmów takich jak: glony, grzyby, mchy, rośliny i ssaki (Ruiz-Lopez i wsp., 2012). Uzyskanie wysokiego poziomu akumulacji kwasów EPA czy DHA było jednak często trudne do zrealizowania pomimo wielu prób optymalizacji ich biosyntezy. Przyczyny tych niepowodzeń doszukiwano się między innymi w fakcie, że w skład konstruktów genetycznych wchodziły geny pochodzące z różnych organizmów akumulujących n-3 VLC-PUFA (Ruiz-Lopez i wsp., 2013). To przypuszczenie potwierdzają badania wskazujące, że na intensywność biosyntezy VLC-PUFA wpływał nie tylko gatunek rośliny ale również zastosowana kombinacja genów w konstrukcie wykorzystywanym do transformacji (Cheng i wsp., 2010).

Pomimo wspomnianych trudności, do tej pory przeprowadzono wiele udanych eksperymentów, w wyniku których udało się uzyskać rośliny transgeniczne przeprowadzające biosyntezę VLC-PUFA w nasionach i organach wegetatywnych. Jeden z takich eksperymentów polegał na wprowadzeniu do lnu (*Linum usitatissimum*) i tytoniu (*Nicotiana tabacum*) genów z okrzemka (*P. tricornutum*) kodujących  $\Delta^6$  desaturazę i  $\Delta^5$  desaturazę oraz gen z grzyba (*Physcomitrella patens*) kodujący  $\Delta^6$  elongazę. U lnu uzyskano produkcję ARA i EPA w ilości odpowiednio 1,5% oraz 1% wszystkich kwasów tłuszczowych. U tytoniu udało się uzyskać syntezę ARA (2% wszystkich kwasów tłuszczowych), natomiast syntezę EPA nie zaobserwowano (Abbadi i wsp., 2004).

Pomimo, że udało się w przypadku lnu uzyskać syntezę EPA to zawartość tego kwasu tłuszczowego była jednak stosunkowo niska. Przypuszczalne czynniki, z których mogło to wynikać zostały szeroko omówione w wyżej cytowanej publikacji. Autorzy podkreślają, że wykorzystane w procesie transformacji geny pochodzące z alg, kodują desaturazy wykorzystujące kwasy tłuszczowe wchodzące w skład PC, natomiast substratem w procesie elongacji są kwasy tłuszczowe przyłączone do koenzymu A (acylo-CoA). Kwasy tłuszczowe LA i ALA, są substratami dla  $\Delta^6$  desaturazy, tylko gdy są związane z PC. Odpowiednie acylotransferazy mogą je jednak efektywnie przenosić bezpośrednio do TAG (enzymy typu PDAT) lub do puli acylo-CoA (enzymy typu LPCAT) gdzie acylotransferazy typu DGAT wykorzystywać je mogą do włączenia do TAG. W wyniku tych procesów ilość LA i ALA w PC dostępnych dla  $\Delta^6$  desaturazy może być znacząco zredukowana, a to z kolei może powodować zmniejszoną produkcję EPA i ARA. Dodatkowo niska wydajność biosyntezy EPA i ARA może wynikać z braku naturalnie występujących w roślinach acylotransferaz wydajnie włączających powstające w fosfatydylocholinie kwasy GLA i SDA (z LA i ALA odpowiednio, w wyniku działania  $\Delta^6$ desaturazy) do cytoplazmatycznej puli acylo-CoA, gdzie mogłyby ulec elongacji. Dalszy problem mógłby być związany z brakiem odpowiednich acylotransferaz włączających powstające w procesie elongacji kwasy DGLA i ETA z puli CoA do PC, aby mogły ulec kolejnej desaturacji (Abbadi i wsp., 2004).

Wyższą, niż w omówionych powyżej transgenicznych roślinach lnu, produkcję ARA i EPA udało się uzyskać w transgenicznych roślinach *A. thaliana* (wynoszącą odpowiednio 6,6% i 3,0% całkowitej ilości kwasów tłuszczowych nasion) Qi i współpracownikom (Qi i wsp., 2004). W tym doświadczeniu do transformacji użyto genów kodujących komponenty „szlaku  $\Delta^8$ ” – szlaku alternatywnego. Wykorzystany został gen z mikroalgi (*I. galbana*) kodujący  $\Delta^9$  elongazę, gen z protista (*E. gracilis*) kodujący  $\Delta^8$  desaturazę i gen z grzyba (*M. alpina*) kodujący  $\Delta^5$  desaturazę. Dwa pierwsze geny pochodziły z organizmów wykorzystujących szlak alternatywny do biosyntezy VLC-PUFA. Natomiast gen kodujący  $\Delta^5$  desaturazę pochodził z organizmu, w którym zachodzi prawdopodobnie szlak konwencjonalny „ $\Delta^6$ ” biosyntezy VLC-PUFA (Qi i wsp., 2004).

Kinney i wsp. (2004) uzyskali jeszcze wyższą produkcję EPA (około 9,3% wszystkich kwasów tłuszczowych) w transgenicznych zarodkach somatycznych soi. Do transformacji wykorzystali geny kodujące  $\Delta^5$  desaturazę,  $\Delta^6$  desaturazę oraz  $\Delta^6$  elongazę z *M. alpina*. Dodatkowo konstrukty zawierały  $\Delta^{17}$  desaturazę z *Saprolegnia diclina* oraz  $\Delta^{15}$  desaturazę z *A. thaliana*. W wyniku działania tych dodatkowych desaturaz PUFA

omega 6 mogły być przekształcane w omega-3. Poszczególne geny były pod kontrolą różnych specyficznych dla nasion promotorów. Po zamianie  $\Delta^6$  desaturazy z *M. alpina* na  $\Delta^6$  desaturazę z *S.diclina* wspomnianym autorom udało się dodatkowo, chociaż nieznacznie, zwiększyć poziom EPA w tego typu transgenicznych zarodkach soi. Niektóre rośliny, pochodzące od tych zarodków, wytwarzały jednak nasiona o stosunkowo dużej zawartości EPA, dochodzącej do prawie 20% wszystkich kwasów tłuszczowych ich glicerolipidów. Wspomniane transgeniczne zarodki soi zawierały również około 4% DPA; efekt działania elongazy z *M. alpina* specyficznej w stosunku do kwasów tłuszczowych o długości C20 (Kinney i wsp., 2004).

Wu i wsp. (2005) badali syntezę DHA w roślinach transgenicznych *B.juncea*, poprzez stopniowe jej transformowanie konstruktami zawierającymi geny ze szlaku biosyntezy VLC-PUFA. Dzięki temu możliwe było obserwowanie poszczególnych etapów szlaku. Pierwszy konstrukt zawierał tylko minimalny zestaw genów potrzebnych do wytworzenia ARA i EPA, a mianowicie  $\Delta^5$  desaturazę z *Thraustochytrium sp.*,  $\Delta^6$  desaturazę z *P. irregulare* i  $\Delta^6$  elongazę z *P. patens*. W roślinach transformowanych takim konstruktem genowym obserwowano produkcję ARA na poziomie 7,3% i produkcję EPA w ilości 0,8% wszystkich kwasów tłuszczowych glicerolipidów nasion tych transformantów. W celu zwiększenia biosyntezy wspomnianych VLC-PUFA wprowadzono do uzyskanych wcześniej transformantów dodatkowo gen  $\Delta^{12}$  desaturazy z *Calendula officinalis* spodziewając się zwiększenia biosyntezy początkowego substratu szlaku: kwasu linolenowego (LA). Doprowadziło to do znacznego wzrostu ARA (do 17,7%) oraz EPA (do 1,3%). W kolejnej transformacji dodano do omawianych transformantów gen kodujący elongazę z *Thraustochytrium sp.* Spowodowało to jednak tylko nieznaczny wzrost poziomu EPA i ARA. Znaczący wzrost EPA zaobserwowano dopiero po dodatkowym wprowadzeniu do wcześniej omawianych transformantów genu kodującego  $\Delta^{17}$  desaturazę z *Phytophthora infestans*. W tego typu transformantach zawartość EPA wynosiła średnio 8,1%, a zawartość ARA zmniejszyła się w porównaniu do wcześniejszych transformantów. Dodatkowy wzrost zawartości EPA (do 15%) przy jednoczesnej znacznej produkcji DHA (produktu elongacji i kolejnej desaturacji EPA) - około 15% wszystkich kwasów tłuszczowych, uzyskano gdy do wcześniejszych transformantów dodano gen  $\Delta^6/\Delta^5$  elongazy z *O.mykiss*, gen  $\Delta^4$  desaturazy i gen acylotransferazy kwasu lizofosfatydowego (LPAAT) z *Thraustochytrium sp.* Syntetyzowane VLC-PUFA w tych transformantach *B.juncea* były obecne prawie

wyłącznie w triacyloglicerolach (TAG) nasion. Nasiona te wykazywały normalną morfologię i brak widocznych problemów z kiełkowaniem. Badania te wykazały również, że etapy elongacji (szczególnie EPA do DHA) zwykle były znacznie mniej wydajne niż etapy desaturacji. Wszystkie użyte geny były pod kontrolą tego samego promotora specyficznego dla nasion. Znajdował się on przed każdym genem. Taki zabieg miał wpłynąć na wysoką i jednolitą ekspresję wszystkich wprowadzanych genów. Te doskonałe wyniki przeprowadzonych transformacji niestety nie zachowały się w takiej samej intensywności w potomstwie wspomnianych transformantów; w kolejnych pokoleniach poziom VLC-PUFA spadał. Według Vrinten i wsp. (2007) powodem obserwowanego spadku produkcji VLC-PUFA w kolejnych pokoleniach mogło być wyciszenie transkrypcji wprowadzonych genów spowodowane obecnością wprowadzonej sekwencji promotorowej w wielu kopiach.

W badaniach przeprowadzonych przez Petrie i wsp. (2012) udało się uzyskać transgeniczną *A. thaliana*, w której akumulacja DHA sięgała (podobnie jak w opisanych wcześniej doświadczeniach dotyczących *B. juncea*) także do 15% wszystkich kwasów tłuszczowych glicerolipidów nasion. Taki poziom VLC-PUFA przekracza poziom tych kwasów występujący ogólnie w oleju rybnym (około 12%). Stosunek  $\omega 3/\omega 6$ , przy uwzględnieniu naturalnie występujących kwasów LA i ALA, wynosił 8/1 w oleju tych transformantów lub aż 16/1 przy ich pominięciu. Jest to niezwykle pożądana jakość oleju z punktu widzenia prozdrowotnego ze względu na niską zawartość kwasów tłuszczowych  $\omega 6$  o działaniu prozapalnym. Warto również zwrócić uwagę, że w tym eksperymencie udało się uzyskać niski poziom produktów pośrednich biosyntezy DHA tj. EPA i DPA (odpowiednio 1,8% i 1,5%) w produkowanym przez nasiona oleju. W badaniach które doprowadziły do produkcji oleju (przez uzyskane rośliny transgeniczne) o tak pożądanym parametrach prozdrowotnych najpierw zwiększono poziom produkcji ALA, a dopiero potem zwiększano przekształcanie ALA do DHA na drodze szlaku konwencjonalnego  $\Delta^6$  obserwowanego u mikroalg. W przeprowadzonych transformacjach użyto genu desaturazy  $\Delta^{12}$  pochodzącej z *Lachancea kluyveri*, desaturazy  $\Delta^{15}$  z *Pichia pastoris*, desaturazy  $\Delta^6$  z *Micromonas pusilla*, elongazy  $\Delta^6$  i  $\Delta^5$  z *Pyramimonas cordata* oraz desaturazy  $\Delta^5$  i  $\Delta^4$  z *Pavlova salina* (Petrie i wsp., 2012).

Zademonstrowane wyżej dotychczasowe osiągnięcia wydają się potwierdzać słuszność koncepcji zakładającej przeniesienie produkcji VLC-PUFA do roślin wyższych metodami inżynierii genetycznej. Celem który stoi obecnie przed badaczami zajmującymi

się tym zagadnieniem jest osiągnięcie wysokich poziomów tych kwasów tłuszczowych w nasionach wybranych roślin oleistych przy jednoczesnym wyeliminowaniu lub zmniejszeniu niepożądanych produktów pośrednich/ubocznych (omega-6) tego procesu, tak aby oleje tego typu mogły być produkowane w roślinach na skalę przemysłową.

Identyfikacja nowych genów kodujących desaturazy i elongazy, mające większą aktywność bądź bardziej pożądaną specyficzność substratową, nadal pełni potencjalnie główną rolę w zwiększaniu wydajności produkcji VLC-PUFA w roślinach. Nawet niewielka różnica w wydajności na którymś z etapów szlaku ich biosyntezy, szczególnie na etapie początkowym, może przełożyć się na znaczne zwiększenie ilości produktu końcowego. W badaniach tych należy jednak brać pod uwagę fakt, że wydajność/specyficzność substratowa poszczególnych enzymów może zmieniać się w zależności od organizmu do którego zostaną wprowadzone. Np. elongaza  $\Delta^9$  z *Isochrysis* wykazywała podobną wydajność/specyficzność substratową w stosunku do LA i ALA w systemie drożdżowym (podobny procent obu kwasów ulegał wydłużaniu), natomiast po wprowadzeniu do *A. thaliana* wydłużany był wyższy procent LA niż ALA. U *Arabidopsis* zawartość LA w tkankach liści jest jednak niższa niż zawartość ALA (Vrinten i wsp., 2007).

Jedną z możliwości podwyższenia produkcji VLC-PUFA w roślinach wydaje się być wprowadzenie do nich genów, kodujących enzymy posiadające aktywność acylotransferaz typu acylo-CoA:lizofosfolipid (np. enzymów typu LPCAT) z organizmów produkujących kwasy tłuszczowe omega-3 naturalnie. LPCATy katalizują nie tylko włączanie acylo-CoA do PC, ale również reakcję odwrotną, czyli przeniesienie kwasów tłuszczowych z pozycji *sn*-2 PC na koenzym A, a więc syntezę nowych acylo-CoA włączanych do puli cytoplazmatycznego acylo-CoA. Enzymy tego typu charakteryzujące się dużą specyficznością substratową w stosunku do kwasów tłuszczowych omega-3 w reakcjach odwrotnych, mogłyby zwiększać wydajności przepływu tego typu kwasów tłuszczowych między pulami fosfolipidów i acylo-CoA, co mogłoby poprawić wydajność elongacji  $\Delta^6$  (Graham i wsp., 2007).

Przedmiotem zainteresowań są również desaturazy wykorzystujące jako substraty acylo-CoA. Badania nad możliwością uzyskania roślin transgenicznych u których substratami zarówno do procesu elongacji jak i desaturacji są kwasy tłuszczowe połączone z CoA są obecnie prowadzone. Do roślin wprowadzane są np. geny kodujące  $\Delta^6$  desaturazy wykorzystujące acylo-CoA jako substraty. Takie desaturazy zostały



zidentyfikowane u ssaków oraz u mikroalgi *Ostreococcus tauri*. Nie występują one jednak powszechnie ani w algach ani bezkręgowcach, grzybach czy roślinach niższych. Występujące w tych organizmach  $\Delta^6$  desaturazy wykorzystują zazwyczaj jako substraty kwasy tłuszczowe z pozycji *sn*-2 fosfatydylocholocholiny (Domergue i wsp., 2005).

Zwiększenie całkowitego poziomu produktu końcowego przy jednoczesnym zmniejszeniu niepożądanych produktów pośrednich wydaje się mieć większe szanse powodzenia w doświadczeniach nakierowujących syntezę VLC-PUFA na jedną gałąź szlaku ich biosyntezy niż w doświadczeniach promujących oba szlaki. Jedną z możliwości uzyskania tylko jednego szlaku biosyntezy VLC-PUFA może być przekształcanie kwasów tłuszczowych omega-6 w kwasy tłuszczowe omega-3, poprzez wprowadzanie do konstruktyw genetycznych dodatkowo desaturaz  $\Delta^{15}$  i  $\Delta^{17}$  (Wu i wsp., 2005; Kinney i wsp., 2004; Eckert i wsp., 2006).

Zwiększenie produkcji VLC-PUFA omega-3 w olejach roślinnych teoretycznie może dokonywać się także na etapie przepływu produktów końcowych szlaku omega-3 do TAG. W tym celu należałoby zidentyfikować enzymy syntetyzujące TAG, wykazujące wysoką specyficzną substratową w stosunku do EPA i DHA. W końcowy etap biosyntezy triacylogliceroli włączone są enzymy typu DGAT (acylotransferazy acylo-CoA: diacyloglicerol) oraz enzymy typu PDAT (acylotransferazy fosfolipid:diacyloglicerol). Na obecnym etapie trudno wnioskować który rodzaj wspomnianych klas enzymów o potencjalnej wysokiej specyficznosci w stosunku do EPA i DHA (gdyby takie izoformy zostały zidentyfikowane) byłby bardziej skuteczny. Enzymy typu PDAT wydają się mieć jednak tą przewagę, że przenoszą kwasy tłuszczowe z pozycji *sn*-2 odpowiednich fosfolipidów bezpośrednio na diacyloglicerol a więc z pominięciem etapu przeniesienia ich najpierw na CoA (Graham i wsp., 2007).

## 2. MATERIAŁY

### 2.1. Sklonowane geny z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* potencjalnie kodujące acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLATy)

W celu znalezienia enzymu typu LPCAT pochodzącego z *Phaeodactylum tricornutum* wytypowano sześć genów (Tabela 2) z genomu *P. tricornutum* na podstawie podobieństwa sekwencji do enzymów typu LPCAT pochodzących z *Arabidopsis thaliana* i *Saccharomyces cerevisiae*. Sklonowane geny wprowadzono do komórek drożdży szczepu  $\Delta ALE1$  (z wyłączonym genem kodującym główny enzym typu LPCAT). Klonowanie genów i transformację komórek drożdżowych przeprowadziła grupa naukowców z „Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, China” biorąca udział w projekcie SHENG w ramach, którego powstała niniejsza praca doktorska.

**Tabela 2.** Wytypowane geny kodujące potencjalnie acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLATy) z *P. tricornutum* w celu znalezienia genu/genów kodujących enzym/enzymy typu LPCAT.

Gen	Numer akcesji (GenBank)
<i>Phatr3_J54709</i>	EEC46868.1
<i>Phatr3_J11916</i>	EEC48861.1
<i>Phatr3_J40461</i>	EEC44215.1
<i>Phatr3_J43099</i>	EEC51356.1
<i>Phatr3_J20460</i>	EEC48011.1
<i>Phatr3_J48640</i>	EEC45318.1

### 2.2. Szczepy drożdży

Aktywność oraz specyficzność substratową enzymów kodowanych przez wytypowane geny pochodzące z *Phaeodactylum tricornutum*, potencjalnie mogące kodować białka o aktywności typu LPLAT, badano poprzez ekspresję tych genów w systemie drożdżowym. Do transformacji wykorzystano mutanty szczepu drożdży piekarniczych (*Sacharomyces cerevisiae*) Y02431 z delecją genu *ALE1* kodującego główny enzym o aktywności LPCAT (Tabela 3). Drożdże Y02431 ( $\Delta ALE1$ ) stransformowane plazmidami pYES2/CT niosącymi sześć różnych genów (*Phatr3\_J54709*, *Phatr3\_J11916*, *Phatr3\_J40461*, *Phatr3\_J43099*, *Phatr3\_J20460*,

*Phatr3\_J48640*) pochodzących z *P. tricornutum* otrzymano od prof. Yangmin Gong z „Oil Crop Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Wuhan, China”. Jako kontrolę do testów aktywności i specyficzności substratowej *in vitro* enzymów kodowanych przez badane geny stosowano powyższy szczep drożdży ( $\Delta ALE1$ ) niosący pusty plazmid pYES2/CT. Dodatkowo transformację szczepu drożdży Y02431 ( $\Delta ALE1$ ) przeprowadzano również w naszym laboratorium w ramach niniejszej pracy doktorskiej, plazmidami pYES2/CT niosącymi geny *Phatr3\_J54709*, *Phatr3\_J11916*, *Phatr3\_J40461*, *Phatr3\_J43099* oraz pustym plazmidem pYES2/CT.

**Tabela 3.** Szczep *S. cerevisiae*:

Szczep	Genotyp
Y02431 ( $\Delta ALE1$ )	ale1: (Y02431; MAT $\alpha$ ale1 his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0; YOR175c::kanMX4)

### 2.3. Szczepy bakterii

Plazmidy wykorzystywane w procesie konstrukcji, metodą Golden Gate, kaset ekspresyjnych niosących geny szlaku biosyntezy EPA namnażano i przechowywano w chemokompetentnych komórkach *E. coli* - One Shot<sup>TM</sup> TOP10 Chemically Competent Cells (Thermo Fisher Scientific). Szczep ten jest odporny na antybiotyk streptomycynę.

W celu wprowadzenia genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy EPA do *A. thaliana* wykorzystano szczep *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, który jest odporny na antybiotyk rifampicynę oraz gentamycynę.

**Tabela 4.** Szczepy bakterii

Szczep	Genotyp
Szczep <i>E. coli</i>	F – $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK–, mK+) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ – <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
Szczep <i>A. tumefaciens</i> „GV3101 (pMP90)”	genotyp w „Koncz i Schell (1986)”

#### **2.4. *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity)**

Do wprowadzenia genów (przeprowadzenia transformacji) kodujących enzymy szlaku biosyntezy EPA wykorzystano rośliny typu „dzikiego” (WT; ang. *wild type*) *A. thaliana* z ekotypu Columbia-0.

#### **2.5. Podłoża hodowlane**

**YPD** – Yeast extract Peptone Dextrose, pH 6,5 (g/l H<sub>2</sub>O destylowanej)

- YPD Broth – 50 g (Sigma-Aldrich)
- Agar (lub bez agaru) – 20 g (Sigma-Aldrich)

**SD-URA** – Synthetic Defined (g/l H<sub>2</sub>O destylowanej):

- Yeast Nitrogen Base (bez aminokwasów) – 6,7 g (Sigma-Aldrich)
- CSM-URA – 0,77 g (MP Biomedicals)
- Glukoza/Galaktoza – 20 g (Sigma-Aldrich)
- Agar (lub bez agaru) – 20 g (Sigma-Aldrich)

**LB** – Luria-Bertani (g/l H<sub>2</sub>O destylowanej)

- LB Broth – 20 g (Sigma-Aldrich)
- Kanamycyna/ampicylina – 0,05 g (MP Biomedicals)
- Agar (lub bez agaru) – 20 g (Sigma-Aldrich)

**1/3 MS** – Murashige and Skoog, pożywka zestalona agarem (g/l H<sub>2</sub>O destylowanej)

- MS (z witaminami) – 1,468 g (Sigma-Aldrich)
- Sacharoza – 10 g (Sigma-Aldrich)
- Kanamycyna – 0,05 g (MP Biomedicals)
- Agar – 8 g (Sigma-Aldrich)

## 2.6. Startery

**Tabela 5.** Startery do amplifikacji genów podczas konstruowania kaset ekspresyjnych.

Nazwa	Sekwencja	T <sub>m</sub>
<i>OtD6 Fwd</i> ( $\Delta 6$ -desaturaza z <i>Ostreococcus tauri</i> )	5'-ATGTGCGTGGAGACG-3'	54 °C
<i>OtD6 Rev</i> ( $\Delta 6$ -desaturaza z <i>Ostreococcus tauri</i> )	5'-TTACGCCGTCTTTCCG-3'	54 °C
<i>PtD6 Fwd</i> ( $\Delta 6$ -desaturaza z <i>Phaeodactylum tricorutum</i> )	5'-ATGGGCAAAGGAGGGGAC-3'	58 °C
<i>PtD6 Rev</i> ( $\Delta 6$ -desaturaza z <i>Phaeodactylum tricorutum</i> )	5'-TTACATGGCGGGTCCATCG-3'	58 °C
<i>PSE1 Fwd</i> ( $\Delta 6$ -elongaza z <i>Physcomitrella patens</i> )	5'-ATGGAGGTTCGTGGAGAGATTC-3'	58 °C
<i>PSE1 Rev</i> ( $\Delta 6$ -elongaza z <i>Physcomitrella patens</i> )	5'-TCACTCAGTTTTAGCTCCCTTTTG-3'	58 °C
<i>PtD5 Fwd</i> ( $\Delta 5$ -desaturaza z <i>Phaeodactylum tricorutum</i> )	5'-ATGGCTCCGGATGCG-3'	57 °C
<i>PtD5 Rev</i> ( $\Delta 5$ -desaturaza z <i>Phaeodactylum tricorutum</i> )	5'-TTACGCCCCGTCCGGTC-3'	57 °C
<i>KanR Fwd</i> (oporność na kanamycynę)	5'-ATGGTTGAACAAGATGGATTGC-3'	57 °C
<i>KanR Rev</i> (oporność na kanamycynę)	5'-CTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG-3'	57 °C
<i>PtLPCAT1 Fwd</i> (enzym typu LPCAT z <i>Phaeodactylum tricorutum</i> )	5'-GAGGCTCTCACTAAGGTG-3'	59 °C
<i>PtLPCAT1 Rev</i> (enzym typu LPCAT z <i>Phaeodactylum tricorutum</i> )	5'-TTCTTTCTTCGGCGTCGG-3'	59 °C
promotor NOS Fwd (syntaza nopaliny)	5'-AGCCGTTTTACGTTTGGAAC-3'	56 °C
promotor NOS Rev (syntaza nopaliny)	5'-CTAATTGGATACCGAGGGGAAT-3'	56 °C
terminator OCS Fwd (syntaza oktopiny)	5'-CTGCTTTAATGAGATATGCGAG-3'	55 °C
terminator OCS Rev (syntaza oktopiny)	5'-TCGTCCACTGAAGAGCC-3'	55 °C

T<sub>m</sub> – temperatura przyłączenia startera

**Tabela 6.** Startery do przyłączania sekwencji flankujących do genów wchodzących w skład kaset ekspresyjnych. Podkreślona sekwencja oznacza sekwencję dodaną do genu, czerwonym kolorem zaznaczono miejsce cięcia enzymu BsaI, a niebieskim kierunkowość sekwencji.

Nazwa	Sekwencja	T <sub>m</sub>
XOtD6 Fwd	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCA</b> <u>AAATG</u> ATGTGCGTGGAGACG-3'	54 °C
XOtD6 Rev	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCA</b> <u>AAAGC</u> TTACGCCGTCTTTCCG-3'	54 °C
XPtD6 Fwd	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCA</b> <u>AAATG</u> ATGGGCAAAGGAGGGGAC-3'	58 °C
XPtD6 Rev	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCA</b> <u>AAAGC</u> TTACATGGCGGGTCCATCG-3'	58 °C
XPSE1 Fwd	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCA</b> <u>AAATG</u> ATGGAGGTCGTGGAGAGATTC-3'	58 °C
XPSE1 Rev	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCA</b> <u>AAAGC</u> TCGACTAGAATAGTAAATTGTAATG-3'	58 °C
XPtD5 Fwd	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCA</b> <u>AAATG</u> ATGGCTCCGGATGCG-3'	57 °C
XPtD5 Rev	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCA</b> <u>AAAGC</u> TTACGCCCGTCCGGTC-3'	57 °C
XNOS Fwd	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCAGGAG</b> AGCCGTTTTACGTTTGAAC-3'	56 °C
XNOS Rev	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCACATT</b> CTAATTGGATACCGAGGGGAAT-3'	56 °C
XOCS Fwd	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCAGCTT</b> CTGCTTTAATGAGATATGCGAG-3'	55 °C
XOCS Rev	5'- <u>ACTCAG</u> <b>GGTCTCAAGCGT</b> CGTCCACTGAAGAGCC-3'	55 °C

**Tabela 7.** Startery do mutagenazy klonowanych sekwencji wchodzących w skład kaset ekspresyjnych tworzonych systemem klonowania Golden Gate.

Nazwa	Sekwencja	T <sub>m</sub>
3_129_Fwd (OtD6)	5'-GGCGGCGCTGGCGAAAACGTTTCGCGAGGCGG-3'	82 °C
3_129_Rev (OtD6)	5'-CCGCCTCGCGAACGTTTTTCGCCAGCGCCGCC-3'	82 °C
3_627_Fwd (OtD6)	5'-CACAGCCGGGTTTCGGCCTCGCCGGTAGCGGC-3'	82 °C
3_627_Rev (OtD6)	5'-GCCGCTACCGGCGAGGCCGAACCCGGCTGTG-3'	82 °C
3_753_Fwd (OtD6)	5'-CAACACCGCGGTGGAGGACAATCGTCCCCGT-3'	82 °C
3_753_Rev (OtD6)	5'-ACGGGGACGATTGTCCTCCACCGCGGTGTTG-3'	82 °C
4_93_Fwd (PtD6)	5'-CCACGCGTCTCCGGAGGACGCCTGGATCATT-3'	80 °C
4_93_Rev (PtD6)	5'-AATGATCCAGGCGTCTCCGGAGACGCGTGG-3'	80 °C
4_852_Fwd (PtD6)	5'-ACTCAAGGCCAAGGGCCTCCAGTACCCCTT-3'	80 °C
4_852_Rev (PtD6)	5'-AAGGGGGTACTGGAGGCCCTTGGCCTTGAGT-3'	80 °C
6_45_Fwd (PSE1)	5'-GTTGGATGGGAAGGTATCGCAGGGCGTGAAT-3'	72 °C
6_45_Rev (PSE1)	5'-ATTCACGCCCTGCGATACCTTCCCATCCAAC-3'	72 °C
7_1182_Fwd (PtD5)	5'-TTGCTTACGGGAGGCCTCAACTTTCAGGTT-3'	70 °C
7_1182_Rev (PtD5)	5'-AACCTGAAAGTTGAGGCCTCCCGTGAAGCAA-3'	70 °C

## 2.7. Wektory

Wektor pYES2/CT – jest to wektor wahadłowy o wielkości 5,9 kb, przeznaczony do ekspresji genów w *Sacharomyces cerevisiae* pod kontrolą promotora galaktozowego (GAL1). Zawiera gen syntezy uracylu (URA3) stanowiący marker selekcyjny utrzymujący plazmid w komórkach drożdży oraz gen odporności na ampicylinę do prowadzenia selekcji transformowanych komórek *E. coli* podczas przygotowywania konstruktów.

pEASY-T Simple – wektor o wielkości 3,8 kb posiadający gen odporności na kanamycynę i ampicylinę do selekcji transformowanych komórek bakterii. Posiada promotor T7 oraz miejsca przyłączenia się starterów SR i M13 do sekwencjonowania klonowanych genów.

Plazmid na którym zostały dostarczone geny kodujące *PtD6*, *OtD6*, PSE, *PtD5* od współpracowników z Chin. Wykorzystany na pierwszych etapach klonowania metodą Golden Gate podczas przeprowadzania reakcji mutagenyzy sekwencji genów.

pK2GW7 – wektor binarny o wielkości 11,2 kb, przeznaczony do transformacji roślin. W niniejszej pracy został wykorzystany do sklonowania sekwencji kodującej promotor NOS włączony do kasyety ekspresyjnej szlaku biosyntezy EPA. Posiada gen odporności na spektynomycynę do selekcji transformowanych komórek bakteryjnych.

Wektory będące częścią zestawu „Golden Gate Modular Cloning (MoClo) Plant Tool Kit” oraz „Golden Gate Plant Parts Kit” do klonowania genów podczas tworzenia wielogenowych kaset ekspresyjnych systemem Golden Gate. Wektory te mogą utrzymać się i replikować w *E. coli* i w *Agrobacterium*, mają charakter binarny i są przeznaczone do przekazania T-DNA komórkom roślinnym podczas transformacji za pomocą *Agrobacterium* (Engler i wsp., 2014).

pLCSL70004 – wektor, z którego sklonowano gen oporności na antybiotyk kanamycynę do selekcji transformowanych roślin wraz z promotorem NOS i terminatorem OCS, które użyto do konstrukcji kasyety ekspresyjnej szlaku biosyntezy EPA. Plazmid ten posiada oporność na spektynomycynę do selekcji transformowanych komórek bakteryjnych.

Wektory poziomu pierwszego do konstrukcji jednostek transkrypcyjnych składających się z promotora NOS, danego genu (kodującego enzym ze szlaku biosyntezy EPA lub oporność na antybiotyk kanamycynę) i terminatora OCS.

- pICH47732 – do wprowadzenia i następnie klonowania roślinnego genu kodującego KanR (oporność na antybiotyk kanamycynę), posiada oporność na antybiotyk ampicylinę do selekcji transformowanych komórek bakterii.
- pICH47742 – do wprowadzenia i następnie klonowania genu kodującego *OtD6* lub *PtD6*, posiada oporność na antybiotyk ampicylinę do selekcji transformowanych komórek bakterii.
- pICH47751 – do wprowadzenia i następnie klonowania genu kodującego PSE, posiada oporność na antybiotyk ampicylinę do selekcji transformowanych komórek bakterii.



- pICH47761 – do wprowadzenia i następnie klonowania genu kodującego *PtD5*, posiada oporność na antybiotyk ampicylinę do selekcji transformowanych komórek bakterii.
- pICH47772 – do wprowadzenia i następnie klonowania genu kodującego *PtLPCAT1*, posiada oporność na antybiotyk ampicylinę do selekcji transformowanych komórek bakterii.

Powyższe wektory wymieniono w takiej kolejności, w jakiej ułożą się jednostki transkrypcyjne niesione przez te wektory podczas ich klonowania do wektora poziomu drugiego.

pAGM4673 – przeznaczony do złożenia jednostek transkrypcyjnych (promotor, dany gen i terminator) zawierających klonowane geny szlaku biosyntezy EPA z poziomu pierwszego w wielogenowy konstrukt. Posiada oporność na antybiotyk kanamycynę.

*End-linkers* czyli łączniki końcowe używane do łączenia końca ostatniej jednostki transkrypcyjnej z wektorem do klonowania poziomu drugiego. Mogą być zastąpione przez dodatkowe jednostki transkrypcyjne. W pracy wykorzystano następujące dwa zakończenia „*end-link*”:

- pICH41780 – *end-link 4*, do łączenia cztero-genowego konstrukt, posiada oporność na antybiotyk spektynomycynę do selekcji transformowanych komórek bakterii.
- pICH41800 – *end-link 5*, do łączenia pięcio-genowego konstrukt, posiada oporność na antybiotyk spektynomycynę do selekcji transformowanych komórek bakterii.

## 2.8. Odczynniki do reakcji PCR

*Taq* DNA Polymerase Recombinant (Thermo Fisher Scientific):

- 10 x PCR Bufor
- 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- Polimeraza DNA *Taq*

Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific):

- 5x Bufor Phusion GC
- 2 U/μl Polimeraza *Pfu*

10 mM roztwór dNTPs (GeneON)

10  $\mu$ M roztwory starterów (Serwis Sekwencjonowania i Syntezy DNA IBB PAN)

## **2.9. Odczynniki do mutagenazy i składania kaset ekspresyjnych tworzonego systemem klonowania Golden Gate**

BsaI - HF<sup>®</sup>v2 (BioLabs)

BbsI - HF (BioLabs)

rCutSmart<sup>™</sup> Buffer (BioLabs)

GeneArt<sup>®</sup> Site – Directed Mutagenesis PLUS Kit (Thermo Fisher Scientific)

- 200 x SAM
- Metylaza DNA
- 10 x Enhancer
- 0,5 M EDTA

## **2.10. Antybiotyki**

Zakupione antybiotyki rozpuszczano w wodzie destylowanej - wyjątkiem była rifampicyna którą rozpuszczano w DMSO, w celu przygotowania roztworów wyjściowych o stężeniu 50 mg/ml lub 25 mg/ml (dla rifampicyny). Roztwory antybiotyków sterylizowano przy użyciu filtrów strzykawkowych o porowatości 0,22  $\mu$ m. Stężenie końcowe antybiotyków w jałowych pożywkach wynosiło 50  $\mu$ g/ml lub 25  $\mu$ g/ml w przypadku rifampicyny.

- Ampicylina (MP Biomedicals)
- Kanamycyna (MP Biomedicals)
- Gentamycyna (MP Biomedicals)
- Spektynomycyna (MP Biomedicals)
- Rifampicyna (MP Biomedicals)

## **2.11. Odczynniki do izolacji DNA genomowego**

Bufor do ekstrakcji (1 litr H<sub>2</sub>O destylowanej):

- 1 M Tris-HCl, pH 8,0 – 100 ml (MP Biomedicals)
- 0,5 M EDTA – 100 ml (Sigma-Aldrich)
- NaCl – 5,8 g (Sigma-Aldrich)
- 10% SDS – 100 ml (Duchefa Biochemie)

Fenol/CHCl<sub>3</sub>/izoamylalkohol (25/24/1), (Sigma-Aldrich)

75% etanol (Sigma-Aldrich)

99% etanol (Sigma-Aldrich)

Chloroform (Sigma-Aldrich)

## **2.12. Odczynniki do elektroforezy w żelu agarozowym**

Agaroz (Prona)

10 x Bufor TAE (Sigma-Aldrich)

10000 x GelRed (GeneON)

6 x Bufor obciążający Loading Dye Solution (Thermo Fisher Scientific)

Gene Ruler 1kb DNA Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific)

## **2.13. Bufor do transformacji *Arabidopsis thaliana***

Bufor do infiltracji *Arabidopsis thaliana* (pH 5,7):

- MS (pożywka Murashige and Skoog) z witaminami – 2,2 g (Sigma-Aldrich)
- Sacharoza – 50 g (Sigma-Aldrich)
- MES [kwas 2-(N-morfolino) ethanesulfonowy] – 0,5 g (Sigma-Aldrich)
- BAP (benzyloaminopuryna; 1mg/ml DMSO) – 10 µl (Sigma-Aldrich)
- Silwet<sup>®</sup> L-77 (surfaktant) – 50 µl (Phyto Technology Laboratories)
- H<sub>2</sub>O (destylowana) – 1 litr

## **2.14. Odczynniki do transformacji bakterii**

One Shot<sup>®</sup> MAX Efficiency<sup>®</sup> DH5α<sup>™</sup>-T1<sup>R</sup> Chemically Competent Cells (Thermo Fisher Scientific) – do mutagenyzy sekwencji genów kodujących *OtD6*, *PtD6*, *PtD5* i PSE.

One Shot<sup>™</sup> TOP10 Chemically Competent Cells (Thermo Fisher Scientific) – do przechowywania i namnażania plazmidów niosących kasety ekspresyjne konstruowane metodą Golden Gate.

Pożywka LB płynna lub zestalona agarem (Sigma-Aldrich)

Pożywka S.O.C. (Thermo Fisher Scientific)

Odpowiedni antybiotyk (MP Biomedicals)

### **2.15. Odczynniki do transformacji drożdży**

10 mg/ml DNA ze spermy łososia (Thermo Fisher Scientific)

Roztwór PEG (glikolu polietylowego):

- 100 mM octan litu (Sigma-Aldrich)
- 1 mM EDTA, pH 7,5 (Sigma-Aldrich)
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 (MP Biomedicals)
- 40% PEG 3350 (Sigma-Aldrich)

### **2.16. Odczynniki do ekstrakcji lipidów, chromatografii cienkowarstwowej i chromatografii gazowej**

Chloroform (Merck)

Metanol (Merck)

Heksan do analizy (Merck)

Heksan do chromatografii gazowej (Merck)

Kwas octowy lodowaty (Merck)

Mieszanina chloroform:metanol (1:2)

Mieszanina metylacyjna (100 ml):

- Metanol suszony – 98 ml (Merck)
- Kwas siarkowy stężony – 2 ml (Merck)

Roztwór prymuliny 0,05%:

- Prymulina (Sigma-Aldrich)
- Aceton (Merck)

Ester metylowy kwasu heptadekanowego (17:0-Me), (Sigma-Aldrich)

Standardy lipidów (Avanti Polar Lipids)

### **2.17. Odczynniki do reakcji cięcia fosfolipazą A<sub>2</sub>**

Eter dietylowy (Merck)

Kwas octowy lodowaty (Merck)

Bufor do reakcji:

- 0,1 M Tris-HCl pH 8,9 (MP Biomedicals)
- 5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)

Fosfolipaza A<sub>2</sub> z jadu pszczoły (Sigma-Aldrich)

## 2.18. Odczynniki do izolacji frakcji mikrosomalnych z drożdży

Bufor do homogenizacji komórek drożdży (Glass Bead Disruption Buffer):

- 20 mM Tris-HCl, pH 7,9 (MP Biomedicals)
- 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)
- 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich)
- 0,3 M siarczek amonu (Sigma-Aldrich)
- 5% glicerol (Sigma-Aldrich)

Inhibitory proteaz (Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche)

0,1 M bufor fosforanowy pH 7,2 (Sigma-Aldrich)

## 2.19. Odczynniki do syntezy [<sup>14</sup>C]acylo-CoA oraz acylo-CoA

Benzen (Merck)

Etyloamina (Merck)

Dichlorometan (Merck)

Tetrahydrofuran (Merck)

Chloromrówczan etylu (Merck)

Eter dietylowy (Merck)

Koenzym A (Sigma-Aldrich)

1 M HCl (POCH)

0,1 M HCl (POCH)

1 M KHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich)

## 2.20. Odczynniki do reakcji enzymatycznych *in vitro*

Lizofosfolipidy (Sigma-Aldrich lub Avanti Polar Lipids): *sn*-1-18:1-LPC, *sn*-1-16:0-LPC, *sn*-1-18:0-LPC, *sn*-1-20:0-LPC, *sn*-1-18:1-LPE, *sn*-1-18:1-LPA, *sn*-1-18:1-LPG, *sn*-1-18:1-LPS

Lizofosfolipidy znakowane <sup>14</sup>C (zsyntetyzowane w laboratorium): *sn*-1-[<sup>14</sup>C]18:1-LPC

Eterowe analogi lizofosfatydylocholiny (Sigma-Aldrich): *sn*-1-18:1-O-GPC, *sn*-2-18:1-O-GPC

[<sup>14</sup>C]Acylo-CoA (zsyntetyzowane w laboratorium): [<sup>14</sup>C]16:0-CoA, [<sup>14</sup>C]18:0-CoA, [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]18:2-CoA, [<sup>14</sup>C]18:3-CoA, [<sup>14</sup>C]20:0-CoA i [<sup>14</sup>C]22:1-CoA

Acylo-CoA (zsyntetyzowane w laboratorium): 14:0-CoA, 16:0-CoA, 16:1<sup>Δ9</sup>-CoA, 18:0-CoA, 18:1<sup>Δ9</sup>-CoA, 18:2<sup>Δ9,12</sup>-CoA, 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>-CoA, 18:3<sup>Δ6,9,12</sup>-CoA, 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup>-CoA,

20:0-CoA, 20:1<sup>Δ11</sup>-CoA, 20:3<sup>Δ11,14,17</sup>-CoA, 20:4<sup>Δ5,8,11,14</sup>-CoA, 20:4<sup>Δ8,11,14,17</sup>-CoA, 20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>-CoA, 22:0-CoA, 22:1<sup>Δ9</sup>-CoA, 22:6<sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>-CoA, 24:0-CoA, 24:1<sup>Δ9</sup>-CoA, 26:0-CoA

0,1 M bufor fosforanowy pH 6,0 – 8,0 (Sigma-Aldrich)

0,1 M Tris-HCl pH 8,0 – 10,0 (MP Biomedicals)

0,1 M bufor NaHCO<sub>3</sub>-NaOH pH 10,0 – 11,0 (Sigma-Aldrich)

0,1 M bufor Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH pH 11,0 – 12,0 (Sigma-Aldrich)

MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)

CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)

KCl (Sigma-Aldrich)

Koenzym A (Sigma-Aldrich)

BSA (Sigma-Aldrich)

DTNB (Sigma-Aldrich)

## **2.21. Gotowe zestawy**

GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Fisher Scientific)

GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific)

## **2.22. Aparatura**

Licznik scyntylicyjny LS 6000 T (Beckman)

Chromatograf gazowy GC 2010 (Shimadzu)

Elektroporator Gene Pulser XCell (BioRad)

Ultrawirówka L-70 (Beckman)

Homogenizator Mini Bead Beater-8 (Biospec Products)

Elektroniczny autoradiograf Instant Imager (Packard Instrument Co.)

Grzewcze mieszadło magnetyczne VMS-A (VWR)

pH metr FiveEasy (Mettler Toledo)

Płyta grzewcza z łaźnią piaskową Yellow MAG Hp 7 (IKA Yellow Line)

Sonikator Branson M1800-E (Branson Instruments Company)

Spektrofotometr NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)

Termocykler C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad)

Termoblock Digital Heat Block (VWR)

Termomikser ThermoMixer F1.5 (Eppendorf)

Waga analityczna XA 60/220/X (Radwag)  
Wirówka Rotofix 32 A (Hettich)  
Wirówka Centrifuge 5415 C (Eppendorf)  
Wirówka, MiniSpin Plus (Eppendorf)  
Wyrząsarka Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)  
Wyrząsarka z inkubacją IST-4075R (Lab Companion)  
Molecular Imager ChemiDoc XRS Imaging System (Bio-Rad)  
Aparat do elektroforezy Mupid One (Advance)

### **2.23. Programy komputerowe**

GCsolution Analysis 2.31.00 (LabSolutions)  
Quantity One (BioRad)

### 3. METODY

#### 3.1. Hodowla *Arabidopsis thaliana*

Hodowlę *A. thaliana* w warunkach *in vitro* rozpoczynano od wyjąłowania nasion. W tym celu nasiona umieszczano w probówkach typu Eppendorf o objętości 1,5 ml i poddawano wstępnej sterylizacji 3% podchlorynem sodu przez 15 min. Po tym czasie nasiona płukano w jałowej wodzie destylowanej przez 1 min. Następnie stosowano sterylizację 70% etanolem przez 1 min i płukano nasiona czterokrotnie w jałowej wodzie destylowanej, każdorazowo przez 1 min. Nasiona poddane sterylizacji trzymano dwa dni w temperaturze 4 °C w celu wernalizacji. Wysterylizowane i zwernalizowane nasiona hodowano na szalkach Petriego na pożywce stałej (zestalonej agarom) 1/3 MS. Źródłem cukru była 1% sacharoza. Przygotowane szalki Petriego z nasionami inkubowano w pomieszczeniach fitotronowych w warunkach standardowych: 16-godzinny fotoperiod, wilgotność względna 60%, temperatura 23 °C; przez dwa tygodnie.

Hodowlę *A. thaliana* w doniczkach z glebą zakładano rozpoczynając od wernalizacji niesterylizowanych nasion przetrzymując je w temperaturze 4 °C na wilgotnej bibule filtracyjnej (POCH) w szalkach Petriego. Zwernalizowane nasiona przenoszono na powierzchnię gleby (podłoże hodowlane COMPO SANA®) wypełniającej 0,5 litrowe doniczki, które następnie umieszczano w fitotronie w warunkach standardowych: 16-godzinny fotoperiod, wilgotność względna 60%, temperatura 23 °C.

#### 3.2. Transformacja *Arabidopsis thaliana* metodą „floral dip”

Procedurę rozpoczynano od założenia hodowli *A. tumefaciens* niosących poszczególne plazmidy zawierające 4 różne wielogenowe konstrukty do biosyntezy kwasu eikozapentaenowego w komórkach roślinnych. Hodowlę komórek *A. tumefaciens* zakładano poprzez zaszczepienie 25 ml pożywki LB odpowiednią kolonią bakteryjną. Pożywka LB zawierała antybiotyki: kanamycynę, gentamycynę i rifampicynę. Hodowlę prowadzono przez noc w wytrząsarce przy 220 obrotach/minutę w 28 °C.

Następnego dnia 1 ml uzyskanej hodowli bakterii przenoszono do nowych kolb stożkowych o objętości 2800 ml zawierających 400 ml pożywki LB z antybiotykami (kanamycyna, gentamycyna i rifampicyna). Hodowlę prowadzono w wytrząsarce przy 220 obrotach/minutę w 28 °C do momentu osiągnięcia OD<sub>600</sub> hodowli wynoszącego 1,8 - 2,0. Kolejnym krokiem było wirowanie hodowli przez 10 minut przy 5000 obr/min. Osadzone komórki zawieszano w niewielkiej ilości buforu do transformacji (rozdział 2.13)



i przenoszono do zlewek 500 ml po czym dolewano buforu do transformacji do objętości 400 ml.

Rośliny *A. thaliana* (hodowane w warunkach opisanych w rozdziale 3.1) umieszczano około godzinę przed transformacją w laboratorium aby mogły się zaaklimatyzować. Do transformacji wybierano rośliny, które miały stosunek otwartych pąków kwiatowych do zamkniętych pąków kwiatowych około 50%. Górne części roślin zanurzano w buforze do transformacji z zawieszonymi bakteriami *A. tumefaciens* niosącymi wielogenowe konstrukty. Po infiltracji rośliny owijano folią i pozostawiano na noc w ciemności. Kolejnego dnia umieszczano je w fitotronie odpowiednio izolując od siebie poszczególne linie roślin, aby uniknąć krzyżowania pomiędzy nimi. Rośliny były hodowane do czasu rozwinięcia się nasion (F1), które następnie zbierano i poddawano kilkusetapowej selekcji w celu uzyskania homozygotycznych linii.

### **3.3. Selekcja nasion po transformacji *Arabidopsis thaliana***

Wysterylizowane nasiona pokolenia F1 wykładano na szalki Petriego ze stałą pożywką  $\frac{1}{3}$  MS zawierającą antybiotyk kanamycynę (50  $\mu\text{g/ml}$ ). Szalki z nasionami umieszczano w fitotronie na około dwa tygodnie do momentu rozwinięcia się siewek odpornych na kanamycynę, które następnie przenoszono do gleby. Siewki pokolenia F1 hodowano w fitotronie w celu uzyskania nasion F2, które następnie wysiewano do gleby (1 nasiono na doniczkę). Rośliny pokolenia F2 hodowano do czasu rozwinięcia się nasion pokolenia F3, które zbierano odpowiednio dla każdej rośliny. Wysterylizowane nasiona pokolenia F3 wysiewano na szalki z pożywką tak jak to opisano wyżej i hodowano do czasu rozwinięcia się siewek. Po dwóch tygodniach inkubacji, dokonywano analizy ilości wykiełkowanych siewek na płytce, wykazujących odporność na kanamycynę. Nasiona pokolenia F3, z których wszystkie siewki były odporne na kanamycynę traktowano jako linie homozygotyczne.

### **3.4. Izolacja DNA genomowego z *Arabidopsis thaliana***

Jeden lub dwa świeże liście odcinano od rośliny i wkładano do probówki Eppendorfa (1,5 ml), zalewano 300  $\mu\text{l}$  buforu do ekstrakcji DNA (rozdział 2.11) i ucierano przy użyciu mikrohomogenizatora ręcznego (NeoLab). Shomogenizowany materiał roślinny zalewano 300  $\mu\text{l}$  mieszaniny fenol/chloroform/izoamylalkohol (25/24/1; v/v/v) i ostrożnie mieszano poprzez odwracanie probówki. Po wymieszaniu zawartości, probówki wirowano przez 1 min przy 9000 rpm (wirówka Eppendorf MiniSpin Plus). Górną warstwę

odpipetowywano do nowej probówki Eppendorfa i dodawano do niej 300  $\mu$ l chloroformu, po czym ostrożnie mieszano. Probówkę ponownie wirowano przez 1 min przy 9000 rpm (wirówka Eppendorf MiniSpin Plus) aby odseparować górną warstwę, którą przenoszono do nowej probówki. Do górnej warstwy dodawano 99% etanolu schłodzonego w lodówce w objętości równej objętości pobranej górnej warstwy pomnożonej razy dwa. Następnie probówkę trzymano przez co najmniej godzinę na stole laboratoryjnym. Po tym czasie probówkę wirowano przez 10 min przy 14000 rpm (wirówka Eppendorf MiniSpin Plus). Supernatant odrzucano a osad przemywano 2 razy 75% etanolem (500  $\mu$ l); po każdym płukaniu osadu probówkę wirowano przez 1-2 min. Po ostatnim płukaniu, probówkę pozostawiano na stole do czasu aż resztki etanolu odparują. Wysuszony „pellet” zawieszano w 30  $\mu$ l wody destylowanej. Stężenie wyizolowanego DNA mierzono za pomocą spektrofotometru.

### **3.5. Transformacja komórek kompetentnych *Escherichia coli***

Probówki zawierające komórki kompetentne *E. coli* (One Shot™ TOP10 Chemically Competent Cells) wyjmowano z -80 °C i rozmrażano je trzymając w lodzie. Do rozmrożonych komórek bakterii dodawano 5  $\mu$ l odpowiedniego plazmidu i pozostawiano na minimum 30 min w lodzie. Następnie inkubowano komórki dokładnie 30 s w 42 °C w celu wywołania szoku cieplnego i trzymano na lodzie przez 2 min. Po tym czasie dodawano 250  $\mu$ l pożywki LB lub S.O.C i inkubowano komórki przez 60 min w 37 °C z wytrząsaniem 700 rpm/min (Thermomixer Compact 5350, Eppendorf). Po inkubacji komórki wysiewano na podłoże stałe LA z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku (aby wyselekcjonować transformanty) i hodowano w 37 °C przez około 20 godzin.

### **3.6. Transformacja *Saccharomyces cerevisiae***

Hodowle drożdży odpowiednich linii prowadzone przez noc w pożywce płynnej YPD rozcieńczano do OD<sub>600</sub> wynoszącego 0,1 i hodowano do momentu uzyskania OD<sub>600</sub> pomiędzy 0,4 a 0,8. Pobierano po 1 ml takiej hodowli i przenoszono do probówek typu Eppendorf 1,5 ml i wirowano przez 10 min przy 12000 rpm, aby oddzielić komórki drożdżowe od pożywki. Osady płukano w 1 ml H<sub>2</sub>O destylowanej, poprzez ponowne ich zawieszenie i wirowano (10 min, 12000 rpm, wirówka Eppendorf MiniSpin Plus). Po zlaniu supernatantu, bezpośrednio na „pellet” dodawano 100 ng plazmidu oraz 100  $\mu$ g DNA ze spermy łososia (Thermo Fisher Scientific) ogrzanego przed użyciem przez 5 minut w 95 °C. Probówkę krótko wytrząsano na wytrząsarce typu Vortex, dodawano

500 µl roztworu PEG i ponownie wytrząsano. W kolejnym etapie przeprowadzano inkubację przez 15 min w 23 °C oraz następną inkubację 15 min w 42 °C. Probówki poddawano wirowaniu (10 min, 12000 rpm, wirówka Eppendorf MiniSpin Plus), supernatant usuwano, a osad drożdżowy przemywano wodą destylowaną. Komórki drożdżowe wysiewano na stałe podłoże selekcyjne SD-URA z 2% glukozą, które pozwalało na przeżycie tylko tych komórek drożdży które zawierały wprowadzony plazmid z genem do syntezy uracylu. Wysiane komórki drożdży hodowano przez 48 godzin w 30 °C.

### **3.7. Ekstrakcja lipidów z komórek roślinnych**

Ekstrakcję lipidów z komórek roślinnych przeprowadzano za pomocą zmodyfikowanej metody Bligh i Dyer (1959). W celu ekstrakcji lipidów z liści roślin hodowanych w doniczkach z glebą odcinano świeże jeden/dwa liście, ważono i ucierano w szklanym homogenizatorze razem z 3,75 ml mieszaniny chloroform:metanol (1:2) oraz 1,25 ml 0,15 M kwasu octowego. Gdy tkanka roślinna została dobrze utarta dodawano do niej 1,25 ml chloroformu i 1,25 ml wody. Powstałą mieszaninę przelewano do 15 ml probówek szklanych, intensywnie mieszano na wytrząsarce typu Vortex i wirowano przez 3 min przy 3500 rpm (wirówka Hettich ROTOFIX 32 A) aby rozdzielić warstwę metanolowo-wodną od chloroformowej. Dolną warstwę chloroformową przenoszono za pomocą szklanej pipety Pasteura do nowej probówki. Ekstrakty chloroformowe zawierające lipidy wykorzystywano od razu do kolejnych etapów analizy bądź przechowywano w -20 °C przez pewien okres czasu.

Ekstrakcję lipidów z nasion wykonano według tej samej metodyki co ekstrakcję lipidów z liści.

### **3.8. Chromatografia cienkowarstwowa**

Do rozdziału mieszaniny lipidów na poszczególne ich klasy wykorzystywano metodę chromatografii cienkowarstwowej, którą przeprowadzano na szklanych płytkach (20x20 cm lub 10x20 cm) wyłożonych żelem krzemionkowym (Silica Gel 60, Merck). Rozdział przeprowadzano w układzie „polarnym” lub „neutralnym” w zależności od pożądanego rozdzielenia lipidów tzn. lipidów polarnych lub neutralnych/obojętnych. Skład układu rozwijającego lipidy polarne („układ polarny”) stosowanego do rozdziału lipidów z mieszanin po reakcjach enzymatycznych (*in vitro*) oraz do określenia zawartości fosfatydylocholinę we frakcjach mikrosomalnych wyizolowanych z drożdży był

następujący: "chloroform: metanol: kwas octowy: woda (90:15:10:2,5 lub 85:15:10:2; v:v:v:v)". Układu „neutralny” zawierał zaś: heksan: eter di-etylowy: kwas octowy (70:30:1; v:v:v). Stosowany był między innymi do sprawdzania czystości/oczyszczania kwasów tłuszczowych wykorzystywanych do syntezy acylo-CoA. Rozdział w tym układzie oddziela wszystkie lipidy polarne (pozostają na starcie) od lipidów obojętnych (diacyloglicerole, wolne kwasy tłuszczowe, triacyloglicerole, estry steroli i estry wosków) i pozwala te ostatnie rozdzielić pomiędzy sobą.

Probówki zawierające lipidy rozpuszczone w chloroformie przeznaczone do rozdzielania metodą chromatografii cienkowarstwowej podgrzewano na łaźni piaskowej (35 - 40 °C) pod strumieniem azotu w celu odparowania rozpuszczalnika. Wyszuszone osady rozpuszczano w 50 µl chloroformu i nakładano na płytki w porcjach po 5 µl aż do wyczerpania ekstraktu. Tak przygotowane płytki rozwijano w szklanej komorze chromatograficznej wysyczonej parami wlanego wcześniej układu „polarnego” lub „neutralnego”. Gdy faza ruchoma (układ rozpuszczalników) podniosła się odpowiednio wysoko na fazie stacjonarnej (warstwa krzemionki) płytkę wyjmowano z komory chromatograficznej i czekali aż wyschnie. Rozdzielone klasy lipidów wybarwiano poprzez umieszczenie płytki na krótki okres czasu w komorach szklanych wysyconych parami jodu (lub w przypadku rozdzielania mieszanin poreakcyjnych zawierających lipidy znakowane węglem <sup>14</sup>C poddawano analizie przy pomocy autoradiografu; rozdział 3.13). Po wyjęciu płytki z komory przeprowadzano identyfikację rozdzielonych klas lipidów poprzez porównywanie ich lokalizacji na płytce z lokalizacją odpowiednich wzorców. Wybarwioną płytkę pozostawiano na około 20 minut, aż jod odparuje z płytki. W następnym etapie spryskiwano płytkę wodą, aby móc zdrapać pożądane lipidy z płytki i poddać je dalszym analizom. W niektórych przypadkach lokalizację lipidów przeprowadzano poprzez spryskanie płytki TLC wodą; niektóre lipidy (np. lizolipidy) wybarwiają się wtedy na biało.

### **3.9. Chromatografia gazowa**

Rozdział na płytkach TLC pozwala na wyodrębnienie poszczególnych klas lipidów z rozdzielanej mieszaniny i pozwala jedynie w sposób bardzo przybliżony określić ich względną zawartość. Do dokładnego określenia zawartości poszczególnych lipidów w rozdzielanej mieszaninie oraz do określenia składu ich kwasów tłuszczowych służy zaś chromatografia gazowa (GC). Zanim jednak dana próbka zawierająca rozdzielone poszczególne klasy lipidów (lub nie rozdzielony ekstrakt chloroformowych) zostanie

poddana/y analizie na GC musi zostać przeprowadzona procedura „metylacji” powodująca przekształcenie kwasów tłuszczowych zawartych w poszczególnych acylo-lipidach lub występujących jako wolne kwasów tłuszczowe, w ich estry metylowe. Pozwala to na obniżenie temperatury przechodzenia poszczególnych kwasów tłuszczowych w stan lotny i ich rozdział metodą GC. Aby przeprowadzić procedurę „metylacji” rozdzielonych na płytkach TLC lipidów (np. fosfatydylocholino przy określaniu jej zawartości w przygotowanych frakcjach mikrosomalnych) zdrapywano z płytki żel krzemionkowy w obrębie wybarwionej plamki zidentyfikowanej jako dany lipid i umieszczano go w szklanej probówce. Zdrapany żel krzemionkowy zalewano następnie niewielką ilością suszonego metanolu (aby pozbyć się z niego wody) i trzymano pod strumieniem azotu, aż do całkowitego wysuszenia. Następnie wysuszony żel krzemionkowy zawierający cząsteczki analizowanego lipidu zalewano mieszaniną metylacyjną (2% kwas siarkowy w metanolu; 2 ml) i inkubowano w bloku grzewczym w 90 °C przez 40 minut w celu zajścia transmetylacji. W przypadku analizy składu i zawartości kwasów tłuszczowych w nierozdzielanych ekstraktach chloroformowych, określone objętości tych ekstraktów przenoszono do probówek „metylacyjnych” (15 ml probówki z nakrętkami z teflonową membraną; takie probówki stosowano również przy metylacji rozdzielonych lipidów), odparowywano chloroform pod strumieniem azotu, zalewano 2 ml mieszaniny metylacyjnej i inkubowano 40 min w 90°C. Po wystygnięciu próbek dodawano do każdej z nich 3 ml heksanu, 2 ml wody i 50-100 nmol wewnętrznego standardu (ester metylowy kwasu heptadekanowego; 17:0-Me). Mieszaniny dokładnie wytrząsano i wirowano przez 3 min przy 4000 rpm (wirówka Hettich ROTOFIX 32 A) w celu oddzielenia się fazy heksanowej zawierającej estry metylowe kwasów tłuszczowych (górnej) od fazy metanolowo-wodnej (dolnej). Fazę heksanową przenoszono szklaną pipetą Pasteura do nowej probówki i odparowywano na łaźni piaskowej (38 °C) pod strumieniem azotu. Powstałe osady zalewano niewielką ilością heksanu (od 50 do 100 µl) i przenoszono do „insertów”, które umieszczano w małych probówkach przystosowanych do automatycznego podajnika współpracującego z chromatografem gazowym GC-2010 (Shimadzu) na którym rozdzielano przygotowane próbki. Wykorzystywany do analiz chromatograf gazowy posiadał detektor płomieniowo-jonizujący z kolumną 60 m x 0.25 mm CP-WAX 58 CB (Agilent Technologies). Chromatograf ten „współpracował” z komputerem wyposażonym w program GCsolutions Analysis 2.31.00 (LabSolutions), który automatycznie identyfikował poszczególne estry metylowe kwasów tłuszczowych poprzez porównywanie ich czasów retencji z czasami retencji wzorców. Program ten

mierzył również stężenie poszczególnych kwasów tłuszczowych poprzez porównywanie powierzchni ich pików z powierzchnią pików standardu wewnętrznego dodawanego w znanym stężeniu do każdej badanej próbki.

### **3.10. Izolacja frakcji mikrosomalnej z *Saccharomyces cerevisiae***

Do izolacji frakcji mikrosomalnej z komórek drożdżowych wykorzystywano 100 ml hodowli płynnej tych komórek. Procedurę izolacji przeprowadzano w chłodni o temperaturze około 4 °C, w celu ograniczenia aktywności niektórych enzymów w tym enzymów hydrolitycznych powodujących degradację białek. Najpierw hodowlę płynną poddawano wirowaniu (10 min, 4000 rpm, wirówka Hettich ROTOFIX 32 A) w celu odseparowania komórek drożdżowych od pożywki. Osadzone komórki drożdżowe zawieszano w buforze Tris-HCl (25 mM) aby przepłukać je z pozostałej pożywki i ponownie wirowano (10 min, 3500 rpm, wirówka Hettich ROTOFIX 32 A). Osad zawieszano w 1 ml buforu do homogenizacji drożdży (wzbogaconego o inhibitory proteaz) i przenoszono do 2 ml zakręcanych probówek typu Eppendorf wypełnionych wcześniej 1 ml szklanych kulek (o średnicy 0,45 – 0,5 mm). Następnie przeprowadzano procedurę homogenizacji poprzez wytrząsanie przy użyciu Mini Beat Beater-8 (Biospec Product). Przygotowane próbki do homogenizacji wytrząsano 10 razy po 30 s, z 30 s przerwami po każdym 30 s okresie wytrząsania i 5 minutową przerwą po 5 razach wytrząsania. Zawartość probówek przelewano do 50 ml probówek typu Falcon i uzupełniano do objętości 20 ml buforem do homogenizacji drożdży. Probówki wirowano (10 min, 4000 rpm, wirówka Hettich ROTOFIX 32 A), a uzyskane supernatanty przesączano dodatkowo przez gazę typu Miracloth zanim umieszczono je w probówkach ultrawirówkowych. Kolejnym etapem było 2 godzinne wirowanie w 4 °C przy 42000 rpm (100000xg) w ultrawirówce Beckman L-70 (Beckman). Supernatanty odrzucano, a frakcje mikrosomalne, które osadziły się na dnie probówek przemywano buforem fosforanowym (0,1 M; pH 7,2), a następnie zawieszano je w tym buforze poprzez dokładne rozcieranie w homogenizatorach szklanych.

Końcowym etapem było sprawdzenie zawartości fosfatydylocholiny w jednostce objętości przygotowanych zawiesin frakcji mikrosomalnych aby określić „stężenie” tych frakcji. W tym celu pobierano po 50 µl zawiesin i ekstrahowano z nich lipidy metodą Bligh i Dyer (1959). Ekstrakt lipidowy rozdzielano za pomocą techniki chromatografii cienkowarstwowej (rozdział 3.8); zidentyfikowaną na żelu krzemionkowym

fosfatydylocholinę zdrapowano z płytek TLC i określano jej zawartość przy pomocy chromatografii gazowej (rozdział 3.9).

### **3.11. Synteza acylo-CoA oraz [<sup>14</sup>C]acylo-CoA na potrzeby przeprowadzenia reakcji enzymatycznych**

Syntezę acylo-CoA oraz [<sup>14</sup>C]acylo-CoA przeprowadzano na podstawie zmodyfikowanej procedury opisanej przez Sánchez i wsp. (1973). 5 µmol kwasu tłuszczowego (nieznakowanego lub znakowanego węglem [<sup>14</sup>C]) rozpuszczonego w chloroformie podgrzewano na łaźni piaskowej (30 °C) pod strumieniem azotu w celu odparowania całego rozpuszczalnika. Następnie powstały osad rozpuszczano w 100 µl chloroformu i kolejno rozpuszczalnik odparowywano. Osad ponownie rozpuszczano w takiej samej objętości chloroformu i ponownie rozpuszczalnik odparowywano pod strumieniem azotu (procedura pozbywania się resztek wody mogących zalegać w próbówce/osadzie). Uzyskany osad kwasu tłuszczowego rozpuszczano w 500 µl dichlorometanu. Do uzyskanego roztworu dodawano 6 µl etyloaminy, mieszano, przedmuchiwało strumieniem azotu i pozostawiano próbkę w temperaturze pokojowej na 30 min. Po tym czasie dodawano 4 µl chloromrówczanu etylu, przedmuchiwało azotem i ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej (kwasy tłuszczowe nasycone i kwas oleinowy) lub w lodówce (kwasy tłuszczowe nienasycone) przez 2 godziny. Kolejnym etapem było odparowanie całej mieszaniny do sucha pod strumieniem azotu. Osad rozpuszczano w 1,5 ml tetrahydrofuranu poprzez sonifikację (1 min), po czym próbkę wirowano przez 4 min przy 4000 rpm (wirówka Hettich ROTOFIX 32 A). Supernatant przenoszono do nowej próbki, a do osadu dodawano 1 ml tetrahydrofuranu i ponownie przeprowadzano krótką sonifikację, po której następowało wirowanie. Supernatant przenoszono do próbki zawierającej wcześniejszą porcję supernatantu, a następnie zawartość próbki odparowywano pod strumieniem azotu. Do osadu dodawano 300 µl tetrahydrofuranu, zawartość próbki dokładnie mieszano i dodawano 1 ml 0,1 M KHCO<sub>3</sub> zawierającego 20 mg koenzymu A. Następnie mieszaninę poddawano 90 minutowej inkubacji na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Po inkubacji tetrahydrofuran odparowywano pod strumieniem azotu. W celu zobojętnienia roztworu pozostałego po odparowywaniu tetrahydrofuranu powoli wkraplano do próbki 2 M kwas solny (HCl). Podczas zobojętniania obserwowano powstanie zmętnienia (zanikającego po wymieszaniu), a po uzyskaniu pH lekko kwaśnego następowało wytworzenie precipitatu, który zawierał zsyntetyzowany acylo-CoA. Kolejnym krokiem

było oczyszczenie zsyntetyzowanego acylo-CoA. Powstały osad był najpierw płukany dwukrotnie 2 ml 0,1 M HCl, a następnie również dwukrotnie 2 ml eteru dietylowego. Po każdym płukaniu roztwór/zawiesinę wirowano, supernatant odrzucano a powstały osad rozpuszczano/zawieszano w kolejnej porcji roztworu wykorzystywanego do płukania. Po ostatnim płukaniu, resztki eteru dietylowego odparowywano pod strumieniem azotu, a osad rozpuszczano w wodzie destylowanej (zazwyczaj w 1-3 ml; w zależności od wzrokowo oszacowanej wielkości osadu). Stężenie uzyskanego acylo-CoA określano metodą chromatografii gazowej (rozdział 3.9). W tym przypadku metylację badanych porcji acylo-CoA przeprowadzano przy zastosowaniu 0,1 M NaOH rozpuszczonego w metanolu (5 min inkubacja w 90 °C; pozostała procedura taka jak to opisano wcześniej dla metody metylacji przy wykorzystaniu 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w metanolu; rozdział 3.9). Radioaktywność zsyntetyzowanych [<sup>14</sup>C]acylo-CoA określano przy pomocy licznika scyntylicyjnego Beckam LS6000TA (Beckam). Specyficzną radioaktywność zsyntetyzowanych [<sup>14</sup>C]acylo-CoA wyliczano wykorzystując dane z GC i licznika scyntylicyjnego. Znakowane i nieznakowane acylo-CoA przechowywano w -80 °C w czasie gdy nie były wykorzystywane do przeprowadzania reakcji enzymatycznych *in vitro*.



### 3.12. Przygotowanie [<sup>14</sup>C]18:1-LPC na potrzeby przeprowadzenia reakcji enzymatycznych

Chloroformowy roztwór fosfatydylocholinoi (2  $\mu$ mol) znakowanej węglem <sup>14</sup>C – di-[<sup>14</sup>C]18:1-PC, odparowywano pod strumieniem azotu w łaźni piaskowej podgrzanej do 45 °C. Następnie do próbówki dodawano 500  $\mu$ l eteru dietylowego, 1 ml buforu Tris-HCl (pH 8,9) z 5 mM CaCl<sub>2</sub> i 5 U fosfolipazy A<sub>2</sub> z jadu pszczoły. Całość przedmuchiwano krótko azotem i umieszczano próbówkę na mieszadle magnetycznym w celu nieprzerwanego mieszania zawartych w niej składników. Reakcję prowadzono w ten sposób przez godzinę, po czym stopowano ją dodając 20  $\mu$ l lodowatego kwasu octowego. Po zakończeniu reakcji próbówkę umieszczano pod strumieniem azotu w celu odparowania eteru dietylowego tworzącego górną warstwę mieszaniny. Frakcje lipidowe izolowano z mieszaniny poreakcyjnej stosując zmodyfikowaną metodę Bligh i Dyer (1959). W tym celu do próbówki zawierającej frakcje lipidowe dodawano 3,75 ml mieszaniny chloroform:metanol (1:2), 1,25 ml chloroformu i 1 ml wody. Mieszaninę ekstrakcyjną intensywnie wytrząsano na wytrząsarce typu Vortex i wirowano przez jedną minutę przy 3500 rpm (wirówka Hettich ROTOFIX 32 A). Po rozdzieleniu się warstw do nowej próbówki pobierano warstwę chloroformową dolną zawierającą frakcje lipidowe. Natomiast warstwę górną poddawano kolejnej ekstrakcji metodą „Bligh i Dyer” poprzez dodanie 2,5 ml chloroformu aby zwiększyć wydajność odzyskiwania LPC z górnej warstwy metanolowo-wodnej. Po dokładnym wymieszaniu zawartości oraz wirowaniu (1 minuta, 3500 rpm, wirówka Hettich ROTOFIX 32 A), warstwę chloroformową dolną pobierano i dodawano do tej pierwszej, którą uzyskano po pierwszej ekstrakcji metodą „Bligh i Dyer”. Wyekstrahowaną frakcję lipidową rozpuszczoną w chloroformie, odparowywano do sucha pod strumieniem azotu w łaźni piaskowej podgrzanej do 45 °C. Osad rozpuszczano w 200  $\mu$ l chloroformu i poddawano rozdzielaniu metodą chromatografii cienkowarstwowej przy użyciu układu polarnego przystosowanego do rozdzielania lizofosfolipidów (chloroform: metanol: kwas octowy: woda w stosunku objętościowym 90:17,5:10:3,5). Zidentyfikowany na płytce fragment żelu zawierający [<sup>14</sup>C]18:1-LPC (poprzez spryskanie wodą) był zdrapywany i poddawany ekstrakcji zmodyfikowaną metodą „Bligh i Dyer” w celu wyeluwania [<sup>14</sup>C]18:1-LPC. Żel zalewano 3,75 ml mieszaniny chloroform:metanol (1:2) i poddawano 15 min sonikacji. Po tym czasie zawartość poddawano wirowaniu (4 minuty, 3500 rpm, wirówka Hettich ROTOFIX 32 A). Ekstrakt przenoszono do nowej próbówki, dodawano 1,25 ml chloroformu, 1,25 ml 0,15 M kwasu octowego i 1,25 ml wody. Całość mieszano i wirowano. Warstwę chloroformową

(dolną) przenoszono do nowej probówki, a do warstwy górnej dodawano 2,5 ml chloroformu, mieszano, wirowano i uzyskaną warstwę chloroformową dodawano do poprzedniej. Całość odparowywano i rozpuszczano w 2 ml chloroformu. Z tak uzyskanego roztworu [<sup>14</sup>C]18:1-LPC pobierano dwie 50 µl porcje i poddawano je transmetylacji wymaganej do dalszej analizy jego stężenia na chromatografii gazowej. Radioaktywność uzyskanego roztworu [<sup>14</sup>C]18:1-LPC (dwie 20 µl porcje) badano na liczniku scyntylacyjnym.

### **3.13. Procedura reakcji enzymatycznych typu *forward* katalizowanych przez enzymy LPLAT *in vitro***

Pierwszym etapem analizy było przygotowanie mieszaniny reakcyjnej. W tym celu do probówek typu Eppendorf dodawano 5 nmol odpowiedniego lizofosfolipidu (egzogenny akceptor grup acylowych) rozpuszczonego w chloroformie. Po odparowaniu chloroformu do osadu dodawano najczęściej 0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,2 (wyjątki opisane są przy odpowiednich wynikach badań), w takiej objętości, aby uzyskać stężenie końcowe 40 mM. Następnie dodawano dH<sub>2</sub>O w takiej ilości, aby uzyskać 100 µl mieszaniny końcowej, oraz 5 nmol testowanego acylo-CoA (egzogenny donator grup acylowych), po czym mieszaninę intensywnie wytrząsano. W każdej z przeprowadzanych reakcji jeden z substratów (acylo-CoA lub lizofosfolipid) był znakowany węglem [<sup>14</sup>C]. Źródłem enzymu były dodawane do tak przygotowanych mieszanin reakcyjnych wyizolowane frakcje mikrosomalne z poszczególnych linii drożdżowych niosących określony gen. Jako rozpoczęcie reakcji uznawano moment dodania frakcji mikrosomalnej do probówek. Reakcję prowadzono w termomikserze „Eppendorf Thermomixer Compact” przy wytrząsaniu 1250 obrotów/minutę przez określony czas i w odpowiedniej w temperaturze. Zakończeniem reakcji było dodanie 375 µl mieszaniny chloroform:metanol (1:2; v:v), 125 µl 0,15 M kwasu octowego oraz 125 µl chloroformu. Mieszaniny poreakcyjne dobrze wytrząsano i wirowano (2 min, 3500 rpm, wirówka Hettich ROTOFIX 32 A), aby rozdzieliły się na dwie warstwy. Dolne warstwy chloroformowe przenoszono do probówek szklanych, po czym odparowywano chloroform pod strumieniem azotu. Osady rozpuszczano w znanej objętości chloroformu (50 µl) i nakładano na płytki do chromatografii cienkowarstwowej. Płytki rozwijano w układzie „polarnym” (rozdział 3.8). Po rozwinięciu i wysuszeniu, lokalizację oraz stężenie [<sup>14</sup>C] w poszczególnych lipidach określano przy pomocy autoradiografu (Instant Imager; Packard Instrument Co.). Produkty reakcji identyfikowano na podstawie lokalizacji

wzorców znakowanych węglem  $^{14}\text{C}$  i rozwijanych na płytkach razem z chloroformowymi ekstraktami z mieszanin reakcyjnych. Od aktywności uzyskiwanych w testach przeprowadzonych z mikrosomami niosącymi enzym *PtLPCAT1* odejmowano aktywności uzyskiwane w testach z mikrosomami kontrolnymi (wyzolowanych z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT).

### **3.14. Optymalizacja parametrów reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzymy *PtLPCAT1* obecne we frakcjach mikrosomalnych z drożdży Y02431 (*ΔALE1*) transformowanych genem *Phatr3\_J20460***

W ramach optymalizacji warunków reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzym *PtLPCAT1* zbadano wpływ na aktywność testowanego enzymu takich czynników jak: ilość frakcji mikrosomalnej (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 nmol mikrosomalnego PC), czas reakcji (5, 10, 15, 30, 60, 120 min), temperaturę (10, 20, 30, 40, 50, 60 °C), pH buforu (6; 6,5; 7,0; 7,2; 7,5; 8; 8,5; 9; 10; 11; 12) oraz obecność jonów w buforze reakcyjnym ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). Jako substraty przeprowadzanych reakcji wykorzystywano [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA (5 nmol/test; donor kwasów tłuszczowych) i *sn*-1-18:1-lizofosfatydylocholinę (5 nmol/test; akceptor kwasów tłuszczowych). W reakcjach badających wpływ pH na aktywność enzymu *PtLPCAT* wykorzystano 4 różne bufony, różniące się zakresem pH: 0,1 M bufor fosforanowy – pH 6,0-8,0; 0,1 M Tris-HCl – pH 8,0-10,0; 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ -NaOH – pH 10,0-11,0 i 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -NaOH – pH 11,0-12,0. Testy dotyczące wpływu jonów na aktywność *PtLPCAT1* przeprowadzono z zastosowaniem buforu HEPES (pH 7,2) ze względu na możliwość tworzenia się nierozpuszczalnych soli jonów  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  w buforze fosforanowym. Pozostałe reakcje optymalizacji zostały przeprowadzone z buforem fosforanowym (0,1 M; pH 7,2). Bufory dodawano do reakcji w takiej objętości, aby końcowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 40 mM.

### **3.15. Aktywność *PtLPCAT1* w stosunku do pozycji *sn*-1 i *sn*-2 odpowiednich izomerów lizofosfatydylocholiny**

Testy enzymatyczne dotyczące specyficznej aktywności enzymu *PtLPCAT1* w stosunku do pozycji *sn*-1 i *sn*-2 zostały przeprowadzone przy użyciu dwóch eterowych analogów *sn*-1-18:1-LPC i *sn*-2-18:1-LPC (akceptorów grup acylowych), którymi były odpowiednio *sn*-1-18:1-O-GPC i *sn*-2-18:1-O-GPC. Eterowe analogi 18:1-LPC dodawano do mieszaniny reakcyjnej w ilości 5 nmol wraz z 5 nmol [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA.

Stężenie frakcji mikrosomalnych wynosiło 0,05 nmol mikrosomalnego PC. Reakcje prowadzono w środowisku buforu fosforanowego (40 mM; pH 7,2) w temperaturze 30 °C przez 30 minut.

### **3.16. Aktywność oraz specyficzność substratowa enzymu *PtLPCAT* w stosunku do różnych lizofosfolipidów i różnych acylo-CoA**

W testach wykorzystano kombinacje 4 różnych rodzajów LPC (*sn*-1-16:0-LPC, *sn*-1-18:0-LPC, *sn*-1-18:1-LPC, *sn*-1-20:0-LPC) z siedmioma różnymi acylo-CoA ( $[^{14}\text{C}]18:0\text{-CoA}$ ,  $[^{14}\text{C}]18:1\text{-CoA}$ ,  $[^{14}\text{C}]18:2\text{-CoA}$ ,  $[^{14}\text{C}]18:3\text{-CoA}$ ,  $[^{14}\text{C}]16:0\text{-CoA}$ ,  $[^{14}\text{C}]20:0\text{-CoA}$ ,  $[^{14}\text{C}]22:1\text{-CoA}$ ). Dodatkowo przeprowadzono testy enzymatyczne sprawdzające aktywność *PtLPCAT1* w stosunku do *sn*-1-18:1-LPA, *sn*-1-18:1-LPE, *sn*-1-18:1-LPC, *sn*-1-18:1-LPG i *sn*-1-18:1-LPS w kombinacji z  $[^{14}\text{C}]18:1\text{-CoA}$  oraz  $[^{14}\text{C}]18:3\text{-CoA}$ . Oprócz testów sprawdzających aktywność *PtLPCAT1* w stosunku do dodawanych do mieszanin reakcyjnych pojedynczych lizofosfolipidów, przeprowadzono również testy wykorzystywania ich przez enzym, gdy znajdują się razem w mieszaninie reakcyjnej; tzw. testy selektywności substratowej. W testach tych wykorzystywano mieszaniny następujących lizofosfolipidów: *sn*-1-18:1-LPA, *sn*-1-18:1-LPE, *sn*-1-18:1-LPC, *sn*-1-18:1-LPG i *sn*-1-18:1-LPS, w kombinacji z  $[^{14}\text{C}]18:1\text{-CoA}$  i  $[^{14}\text{C}]18:3\text{-CoA}$ . W przeprowadzonych testach specyficzności substratowej, do mieszanin reakcyjnych dodawano po 5 nmol odpowiedniego lizofosfolipidu i po 5 nmol odpowiedniego acylo-CoA. W testach selektywności substratowej mieszanina lizofosfolipidów zawierała zaś po 1 nmol każdego z nich oraz 5 nmol wykorzystywanego acylo-CoA.

Testy badające specyficzność substratową w stosunku do różnych donorów kwasów tłuszczowych przeprowadzono z *sn*-1- $[^{14}\text{C}]18:1\text{-LPC}$  oraz następującymi acylo-CoA: 14:0-CoA, 16:0-CoA, 16:1 $^{\Delta 9}$ -CoA, 18:0-CoA, 18:1 $^{\Delta 9}$ -CoA, 18:2 $^{\Delta 9,12}$ -CoA, 18:3 $^{\Delta 9,12,15}$ -CoA, 18:3 $^{\Delta 6,9,12}$ -CoA, 18:4 $^{\Delta 6,9,12,15}$ -CoA, 20:0-CoA, 20:1 $^{\Delta 11}$ -CoA, 20:3 $^{\Delta 11,14,17}$ -CoA, 20:4 $^{\Delta 5,8,11,14}$ -CoA, 20:4 $^{\Delta 8,11,14,17}$ -CoA, 20:5 $^{\Delta 5,8,11,14,17}$ -CoA, 22:0-CoA, 22:1 $^{\Delta 9}$ -CoA, 22:6 $^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ -CoA, 24:0-CoA, 24:1 $^{\Delta 9}$ -CoA, 26:0-CoA. Mieszaniny reakcyjne zawierały 5 nmol *sn*-1- $[^{14}\text{C}]18:1\text{-LPC}$  oraz 5 nmol testowanego acylo-CoA.

Porcje frakcji mikrosomalnych dodawanych do mieszanin reakcyjnych zawierały 0,05 nmol mikrosomalnego PC. Reakcje prowadzono w środowisku buforu fosforanowego (40 mM; pH 7,2) w temperaturze 30 °C przez 30 minut.

### 3.17. Procedura reakcji enzymatycznych typu *backward* (do tyłu) katalizowanych przez enzymy typu LPCAT *in vitro*

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej do przeprowadzenia reakcji *in vitro* typu *backward* rozpoczynano od dodania do probówek typu Eppendorf 1 mg BSA (w postaci roztworu wodnego) oraz 0,2  $\mu\text{mol}$  koenzymu A (w postaci roztworu wodnego). Następnie dodawano 10 nmol odpowiedniego [ $^{14}\text{C}$ ]acylo-CoA ([ $^{14}\text{C}$ ]16:0-CoA, [ $^{14}\text{C}$ ]18:0-CoA, [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA, [ $^{14}\text{C}$ ]18:2-CoA lub [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA). Część mieszanin reakcyjnych zawierała dodatkowo 0,5  $\mu\text{mol}$  DTNB (kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy wiążący wolny CoA; w celu zatrzymania reakcji *backward*), który rozpuszczano w 40  $\mu\text{l}$  0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,2. Do pozostałych reakcji (bez dodatku DTNB) dodawano sam bufor fosforanowy w takiej samej objętości. Objętość mieszaniny reakcyjnej (liczoną razem z objętością dodawanych na końcu porcji frakcji mikrosomalnych) uzupełniano wodą do 100  $\mu\text{l}$ . Jako start reakcji uznawano moment dodania frakcji mikrosomalnej do mieszanin reakcyjnych - porcje zawierające 5 nmol mikrosomalnego PC. Reakcje prowadzono w termomikserze Thermomixer Compact 5350 (Eppendorf) przez określony czas w temperaturze 30  $^{\circ}\text{C}$  z wytrząsaniem ustawionym na 1250 obrotów/minutę. Reakcje z dodatkiem [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA prowadzono przez 2, 5, 10, 30 i 60 minut. Natomiast reakcje z dodatkiem [ $^{14}\text{C}$ ]16:0-CoA, [ $^{14}\text{C}$ ]18:0-CoA, [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA lub [ $^{14}\text{C}$ ]18:2-CoA przez 10, 30 i 60 minut. Dalsza procedura dotycząca zatrzymania reakcji, rozdzielenia produktów reakcji z wykorzystaniem chromatografii cienkowsarstwowej oraz analiza wyników przy pomocy autoradiografu (Instant Imager; Packard Instruments Co.) przebiegała tak samo jak opisano to w rozdziale 3.13. dotyczącym reakcji typu *forward*.

Aktywność enzymów typu LPCAT w reakcji *backward* obliczano poprzez odjęcie ilości zsyntetyzowanego PC w wyniku reakcji *backward* z dodatkiem DTNB od ilości zsyntetyzowanego PC w reakcji bez dodatku DTNB. Przy określaniu aktywności *backward* *PtLPCAT1* (opis powyżej; mikrosomy z drożdży transformowanych genem *PtLPCAT1*), jako kontrolę stosowano frakcje mikrosomalne z drożdży transformowanych pustym plazmidem.

W celu określenia aktywności *backward* *PtLPCAT1* w stosunku do fosfatydylocholin zawierającej inne kwasy tłuszczowe niż naturalnie występujące w PC drożdży, powyżej opisaną procedurę określania tej aktywności zmodyfikowano. W pierwszym etapie testów przeprowadzano reakcje typu *forward* w celu wzbogacenia endogennej fosfatydylocholin o nowo zsyntetyzowane cząsteczki PC zawierające „nowe” kwasy tłuszczowe. Mieszaniny reakcyjne przygotowane tak jak opisano w rozdziale 3.13.

zawierały porcje (1 nmol endogennej PC) frakcji mikrosomalnych z drożdży transformowanych genem *PtLPCAT1*, 5 nmol *sn-1-18:1-LPC* oraz 5 nmol acylo-CoA którego jednostką acylową planowano zmodyfikować PC drożdżowej frakcji mikrosomalnej. Reakcje prowadzono w temperaturze 30 °C przez okres 5 min (optymalny czas wyznaczony doświadczalnie; metodyka przeprowadzanych reakcji opisana w rozdziale 3.13). Po tym czasie mieszaniny reakcyjne (najczęściej z trzech powtórzeń) łączono i poddawano wirowaniu przy 14000 rpm (wirówka Eppendorf MiniSpin Plus) przez okres 20 min (chłodnia o temperaturze około 4 °C). Supernatanty odrzucano, a powstałe osady (zawierające frakcje mikrosomalne wzbogacone o nowo zsyntetyzowane PC zalewano mieszaninami reakcyjnymi i przeprowadzano określanie aktywności typu *backward* tak jak to opisano powyżej. Część uzyskanych osadów, bezpośrednio po wirowaniu wykorzystywano do ekstrakcji zawartych w nich lipidów (metoda opisana w rozdziale 3.13). Zawartość fosfatydylocholiny w uzyskanych ekstraktach oraz skład jej kwasów tłuszczowych określano na GC (metodyka opisana w rozdziale 3.8. i 3.9). Do modyfikacji mikrosomalnego PC zastosowano kwasy tłuszczowe z szlaku biosyntezy EPA. Wykorzystano następujące acylo-CoA: 18:3<sup>Δ9,12,15</sup>-CoA, 18:3<sup>Δ6,9,12</sup>-CoA, 18:4<sup>Δ6,9,12,15</sup>-CoA, 20:4<sup>Δ8,11,14,17</sup>-CoA i 20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>-CoA. Dodatkowo modyfikację mikrosomalnego PC przeprowadzono wykorzystując 18:1<sup>Δ9</sup>-CoA. W reakcjach typu *backward* wykorzystano zaś: [<sup>14</sup>C]16:0-CoA, [<sup>14</sup>C]18:0-CoA, [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]18:2-CoA i [<sup>14</sup>C]18:3-CoA, tak jak w przypadku reakcji typu *backward* z niemodyfikowaną frakcją mikrosomalną. Reakcje przeprowadzono z dodatkiem i bez dodatku DTNB.

### **3.18. Przygotowanie kasety ekspresyjnej zawierającej geny kodujące enzymy szlaku biosyntezy EPA metodą klonowania Golden Gate**

#### **3.18.1. Mutageneza**

Pierwszym etapem pracy podczas klonowania metodą Golden Gate było przeprowadzenie reakcji metylacji i mutagenezy sekwencji genów kodujących *OtD6*, *PtD6*, *PtD5* i PSE, która została przeprowadzona zgodnie z protokołem GeneArt<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis PLUS Kit. Reakcję tą przeprowadzano, aby zmienić sekwencje nukleotydowe obecne w sklonowanych genach, które są rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne typu BsaI i BbsI, wykorzystywane w kolejnych etapach klonowania.

Mieszanina reakcyjna do metylacji i mutagenyzy sekwencji genowych składała się z:

5 x Bufor Phusion GC	4 $\mu$ l
10 x Enhancer	2 $\mu$ l
Matryca DNA	8 ng
Mix starterów (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
Metylaza DNA	0,4 $\mu$ l
25 x SAM	0,8 $\mu$ l
10 mM roztwór dNTPs	0,5 $\mu$ l
2 U/ $\mu$ l Polimeraza <i>Pfu</i>	0,2 $\mu$ l
Woda destylowana	do 20 $\mu$ l

W przypadku konieczności zmutowania więcej niż jednego miejsca w danej sekwencji genowej konieczne było przygotowanie odpowiednich mieszanek starterów do mutagenyzy. Poniżej opisano schemat przygotowywania mieszanin starterów do reakcji mutagenyzy na przykładzie mutacji w trzech miejscach sekwencji.

Wymagane startery do mutagenyzy w trzech miejscach:

F1: starter *forward* dla pierwszego miejsca.

R1: starter *reverse* dla pierwszego miejsca.

F2: starter *forward* dla drugiego miejsca.

R2: starter *reverse* dla drugiego miejsca.

F3: starter *forward* dla trzeciego miejsca.

R3: starter *reverse* dla trzeciego miejsca.

Mieszaniny starterów (10  $\mu$ M):

Mieszanina 1: R1 i F3

Mieszanina 2: F1 i R2

Mieszanina 3: F2 i R3

Każda mieszanina starterów zawiera odpowiedni starter przedni i starter wsteczny odpowiadające osobnym miejscom mutacji w jednej sekwencji genowej. Każdą mieszaninę tak przygotowanych starterów dodawano do osobnych mieszanin reakcyjnych zawierających tą samą matrycę DNA. Takie rozwiązanie miało na celu zapobieżeniu łączeniu się ze sobą starterów w jednej mieszaninie reakcyjnej do mutacji tej samej sekwencji genowej w wielu miejscach.

Po dokładnym wymieszaniu składników reakcji, przeprowadzano inkubację w termocyklerze C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad), która przebiegała następująco:

Metylacja plazmidu	37 °C	20 min	
Wstępna denaturacja	98 °C	30 s	
Denaturacja	98 °C	30 s	} 18 cykli
Wydłużanie	72 °C	2 min 45 s	
Końcowa elongacja	72 °C	5 min	

Po przeprowadzeniu reakcji metylacji i mutagenezy przystępowano do kolejnego etapu reakcji rekombinacji. Jeśli sekwencja genowa wymagała mutacji tylko w jednym miejscu reakcja rekombinacji nie była wymagana i przechodząco od razu do etapu transformacji bakterii.

Mieszanina reakcji rekombinacji składała się z:

Produkt PCR z próbówki 1	2 µl
Produkt PCR z próbówki 2	2 µl
Produkt PCR z próbówki 3	2 µl
GeneArt® 2 x Enzyme Mix	10 µl
Woda destylowana	do 20 µl

Reakcję prowadzono przez 15 minut w temperaturze pokojowej, po czym stopowano ją dodając 1 µl 0,5 M EDTA (Thermo Fisher Scientific). Następnie próbówkę wytrząsano, umieszczano w łaźni lodowej i przystępowano do transformacji komórek kompetentnych One Shot® MAX Efficiency® DH5αTM-T1R (Thermo Fisher Scientific).

Pierwszym etapem procesu transformacji bakterii było rozmrożenie znajdujących się w plastikowej próbówce komórek kompetentnych One Shot® MAX Efficiency® DH5αTM-T1R poprzez trzymanie próbówki w łaźni lodowej przez około 5-7 minut. Po tym czasie do próbówki z komórkami bakterii dodawano 3 µl mieszaniny uzyskanej po zajściu reakcji rekombinacji lub 3 µl mieszaniny po reakcji PCR (w przypadku mutacji jednego miejsca w sekwencji genowej). Następnie delikatnie mieszano zawartość próbówki poprzez stukanie i inkubowano ją przez 15 minut w łaźni lodowej. Kolejnym etapem była inkubacja komórek w temperaturze 42 °C przez 30 sekund, aby wywołać szok cieplny. Po tej krótkiej inkubacji próbówkę umieszczano w łaźni lodowej na 2 minuty, po czym dodawano 250 µl pożywki S.O.C (Thermo Fisher Scientific) i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 60 minut z wytrząsaniem ustawionym na 225 obrotów/minutę (ThermoMixer® C; Eppendorf). Kolejnym krokiem było wysianie zawiesiny komórek za



pomocą głaszczki na płytki z pożywką LB zestaloną agarem z dodatkiem kanamycyny i ampicyliny do selekcji transformantów. Zawiesinę komórek z jednej probówki wysiewano w dwóch porcjach, pierwsza to 30  $\mu$ l a druga to reszta zawiesiny która pozostała, aby zapewnić prawidłową gęstość komórek. Płytki inkubowano w temperaturze 37 °C przez około 18 godzin. Wyrośnięte kolonie bakterii pobierano do hodowli na izolację plazmidów, którą przeprowadzano według instrukcji dostarczonej przez producenta zestawu GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific).

Prawidłowe zmutowanie sekwencji genów potwierdzano poprzez sekwencjonowanie korzystając z usług firmy: Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN.

### **3.18.2. Wycinanie fragmentu DNA kodującego oporność na antybiotyk kanamycynę (do selekcji transformowanych roślin) z plazmidu pLCSL70004**

Gen kodujący oporność na antybiotyk kanamycynę został pozyskany z wektora pLCSL70004 poprzez cięcie enzymem BsaI. Gen oporności na kanamycynę po wycięciu z powyższego wektora posiadał już dołączone fragmenty typu *over-hang*, oraz dołączony promotor NOS i terminator OCS.

Mieszanina reakcyjna do wycinania genu oporności na kanamycynę z wektora pLCSL70004 składała się z:

10 x CatSmart Bufor	10 $\mu$ l
BsaI	2 $\mu$ l
Wektor pLCSL70004	2 $\mu$ g
Woda destylowana	do 100 $\mu$ l

Reakcję cięcia prowadzono przez 3 godziny w 37 °C w termomikserze (Thermomixer Compact 5350, Eppendorf). Połowę mieszaniny poreakcyjnej rozdzielano przy pomocy elektroforezy agarozowej w celu potwierdzenia, że gen kodujący oporność na kanamycynę został prawidłowo wycięty.

Wycięty fragment zawierający gen oporności na kanamycynę oraz promotor NOS i terminator OCS był następnie wstawiany do plazmidu poziomu pierwszego pICH47732. W tym celu wektor pICH47732 również został potraktowany enzymem BsaI. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji były takie same jak opisano powyżej dla wektora pLCSL70004.

Po reakcjach cięcia można było przystąpić do reakcji ligacji jednostki transkrypcyjnej zawierającej gen oporności na kanamycynę z wektorem pICH47732. Skład mieszaniny reakcyjnej do ligacji wyglądał następująco:

Mieszanina reakcyjna do ligacji:

10 x Bufor do ligacji	2 $\mu$ l
Pocięty wektor pLCSL70004	50 ng
Pocięty wektor pICH47732	50 ng
Ligaza T4	1 $\mu$ l
Woda destylowana	do 20 $\mu$ l

Reakcję prowadzono w chłodni w termomikserze (Thermomixer Compact 5350, Eppendorf) ustawionym na 16 °C przez noc. Reakcję stopowano poprzez 10 minutową inkubację w 65 °C. Po tym czasie probówkę wstawiano do łaźni lodowej i rozpoczynano transformację komórek kompetentnych One Shot™ TOP10 (Thermo Fisher Scientific). Transformację przeprowadzono tak jak opisano to w rozdziale numer 3.5. Selekcję transformowanych komórek wykonano przy użyciu antybiotyku ampicyliny.

### **3.18.3. Dodanie do zmutowanych sekwencji genów, fragmentów DNA rozpoznawanych przez enzym BsaI**

Kolejnym etapem podczas tworzenia wielogenowego konstruktów metodą Golden Gate było dodanie do zmutowanych sekwencji genów, promotora i terminatora, fragmentów DNA typu *over-hang* rozpoznawanych przez enzym BsaI. Fragmenty *over-hang* zawierały sekwencję kierunkową określającą w jakiej kolejności mają być złożone geny. Dodanie tych fragmentów DNA było niezbędne, aby złożyć jednostki transkrypcyjne: promotor NOS, GOI (ang. gen of interest; *PtD6*, *OtD6*, PSE, *PtD5*) i terminator OCS. Po cięciu enzymem BsaI fragmenty sekwencji NOS, GOI i OCS z dodanymi fragmentami *over-hang* połączą się komplementarnie w plazmidzie poziomu pierwszego w tej właśnie kolejności. Wyjątkiem był gen kodujący oporność na kanamycynę, którego sekwencja wraz z promotorem NOS i terminatorem OCS, po wycięciu enzymem BsaI z wektora pLCSL70004 posiadała już fragmenty *over-hang* pozwalające na wstawienie tej jednostki transkrypcyjnej do plazmidu poziomu pierwszego pICH47732. Z kolei sekwencję genu *PtLPCAT1* zakupiono już zmutowaną z dodanymi fragmentami typu *over-hang* korzystając z usług firmy Integrated DNA Technologies.

Zakupiona sekwencja genu kodującego *PtLPCAT1* była również zoptymalizowana (*codon optimize*) w kierunku jej ekspresji u *A. thaliana*.

Dodawanie fragmentów typu *over-hang* do sekwencji genów wykonano poprzez przeprowadzenie reakcji PCR ze specjalnie zaprojektowanymi do tego celu starterami.

Mieszanina reakcyjna składała się z:

Matryca DNA	5 ng
10 $\mu$ M starter <i>forward</i>	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M starter <i>reverse</i>	1 $\mu$ l
10 mM roztwór dNTPs	1 $\mu$ l
5 x Bufor Phusion GC	10 $\mu$ l
Polimeraza <i>pfu</i>	0,5 $\mu$ l
Woda destylowana	do 50 $\mu$ l

Reakcje prowadzono przy następujących parametrach:

Wstępna denaturacja	98 °C	30 s	
Denaturacja	98 °C	10 s	} 9 cykli
Przyłączanie starterów	54 -58 °C	30 s	
Elongacja	72 °C	45 s	
Denaturacja	98 °C	10 s	} 39 cykli
Elongacja	72 °C	27 s – 45 s	
Końcowa elongacja	72 °C	10 min	
	4 °C	$\infty$	

Mieszaniny poreakcyjne poddawano elektroforezie agarozowej a produkty izolowano z żelu za pomocą gotowego zestawu GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Fisher Scientific) lub oczyszczano mieszaniny poreakcyjne za pomocą zestawu GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific).

### 3.18.4. Złożenie jednostek transkrypcyjnych w plazmidach poziomu pierwszego

W następnym etapie tworzenia wielogenowego konstrukt metodą Golden Gate przeprowadzono reakcje ligacji „oflankowanych” sekwencji NOS, GOI (and. *gene of interest*; *PtD6*, *OtD6*, PSE, *PtD5*, *PtLPCAT1*) i OCS z odpowiednim plazmidem poziomu pierwszego (pICH47732; pICH47742; pICH47751; pICH47761; pICH47772). Reakcję tą przeprowadzono według protokołu Golden Gate (24 Fragment) Assembly Protocol

(<https://www.neb.com/en/protocols/2018/06/05/golden-gate-24-fragment-assembly-protocol>).

Mieszanina reakcyjna do ligacji jednostek transkrypcyjnych:

Akceptor plazmidowy poziomu pierwszego	75 ng
Oflankowana sekwencja promotora OCS	75 ng
Oflankowana sekwencja terminatora NOS	75 ng
Oflankowana sekwencja genu ( <i>PtD6</i> ; <i>OtD6</i> ; PSE; <i>PtD5</i> ; <i>PtLPCAT1</i> )	75 ng
10 x Bufor do ligacji	2,5 µl
Ligaza T4	0,5 µl
BsaI	1,5 µl
Woda destylowana	do 25 µl

Reakcję prowadzono w termocyklerze C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad) przy następujących ustawieniach:

5 minut, 37 °C }  
5 minut, 16 °C } 30 cykli  
5 minut, 60 °C }

Następnym etapem była transformacja komórek kompetentnych One Shot™ TOP10 (Thermo Fisher Scientific), która była przeprowadzana tak jak to opisano w rozdziale 3.5. W celu selekcji zastosowano antybiotyk ampicylinę.

Poniżej podano sklonowane jednostki transkrypcyjne i plazmidy do których zostały wstawione:

- NOS, KanR, OCS w plazmidzie pICH47732
- NOS, *OtD6* lub *PtD6*, OCS w plazmidzie pICH47742
- NOS, PSE, OCS w plazmidzie pICH47751
- NOS, *PtD5*, OCS w plazmidzie pICH47761
- NOS, *PtLPCAT1*, OCS w plazmidzie pICH47772

Powyższe plazmidy są tak zaprojektowane, aby na etapie ligacji wielogenowych konstruktów po cięciu enzymem restrykcyjnym BbsI, jednostki transkrypcyjne ułożyły się w takiej kolejności jak wymieniono powyżej.

### 3.18.5. Złożenie wielogenowych konstruktów w plazmidzie poziomym drugiego

Następnym krokiem było przeprowadzenie reakcji cięcia i ligacji w celu złożenia czterech różnych wielogenowych konstruktów przy pomocy plazmidu poziomym drugiego pAGM4673.

Poniżej podano geny wchodzące w skład wielogenowych konstruktów, w tej samej kolejności, w jakiej ułożyły się one w plazmidzie pAGM4673.

- Konstrukt A – KanR; *PtD6*; PSE; *PtD5*
- Konstrukt A' – KanR; *PtD6*; PSE; *PtD5*; *PtLPCAT1*
- Konstrukt B – KanR; *OtD6*; PSE; *PtD5*
- Konstrukt B' – KanR; *OtD6*; PSE; *PtD5*; *PtLPCAT1*

Reakcje złożenia wielogenowych konstruktów przeprowadzano według protokołu Golden Gate (24 Fragment) Assembly Protocol (<https://www.neb.com/en/protocols/2018/06/05/golden-gate-24-fragment-assembly-protocol>), tak samo jak w przypadku składania jednostek transkrypcyjnych w plazmidach poziomym pierwszym. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący:

- Plazmid pAGM4673 75 ng
- Plazmid End-linker 4  
(w przypadku konstruktów zawierających cztery geny) 75 ng
- Plazmid End-linker 5  
(w przypadku konstruktów zawierających pięć genów) 75 ng

(W zależności od składu wielogenowego konstruktowi poniższe plazmidy dodawano w różnych kombinacjach).

- Plazmid pICH47732  
(niosący gen kodujący oporność na kanamycynę) 75 ng
- Plazmid pICH47742  
(niosący gen kodujący *PtD6* lub *OtD6*) 75 ng
- Plazmid pICH47751  
(niosący gen PSE) 75 ng
- Plazmid pICH47761  
(niosący gen *PtD5*) 75 ng
- Plazmid pICH47772  
(niosący gen *PtLPCAT1*) 75 ng
- Ligaza T4 0,5 µl
- 10 x Bufor do ligacji 2,5 µl

- Enzym restrykcyjny BbsI 1,5  $\mu$ l
- Woda do 25  $\mu$ l

Reakcje prowadzono w termocyklerze przy tych samych ustawieniach jak w przypadku reakcji składania jednostek transkrypcyjnych w plazmidach poziomu pierwszego. Procedura transformacji komórek bakteryjnych One Shot™ TOP10 (Thermo Fisher Scientific) również przebiegała tak samo. Jediną różnicą był zastosowany antybiotyk; w tym przypadku była to kanamycyna.

### 3.18.6. Amplifikacja genów wchodzących w skład kaset ekspresyjnych

Obecność klonowanych genów w wektorach na poszczególnych etapach tworzenia konstruktów genetycznych, oraz w DNA pochodzącym z transformowanych roślin była potwierdzana za pomocą reakcji PCR. Skład mieszaniny reakcyjnej był następujący:

10 x PCR bufor	2,5 $\mu$ l
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75 $\mu$ l
10 mM roztwór dNTPs	0,5 $\mu$ l
10 $\mu$ M starter <i>forward</i>	1,25 $\mu$ l
10 $\mu$ M starter <i>reverse</i>	1,25 $\mu$ l
Polimeraza DNA Taq	0,1 $\mu$ l
Matryca DNA	6-10 ng
Woda	do 25 $\mu$ l

Reakcję prowadzono w termocyklerze C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad), która przebiegała następująco:

Wstępna denaturacja	94 °C	3 min	} 35-45
Denaturacja	94 °C	45 s	
Przyłączanie starterów	różna	30 s	
Wydłużanie	72 °C	90 s/kb	
Końcowa elongacja	72 °C	10 min	

W przypadku sprawdzania obecności wprowadzanych genów w wektorach na poszczególnych etapach tworzenia konstruktów genetycznych reakcję PCR prowadzono z ustawieniem termocyklera na 35 cykli. Natomiast gdy sprawdzano obecność

wprowadzanych genów w roślinach transgenicznych wyselekcjonowanych jako homozygotyczne, reakcję PCR prowadzono z ustawieniem termocyklera na więcej niż 35 cykli, zazwyczaj było to 40 lub 45 cykli. Temperatura przyłączania starterów różniła się w zależności od amplifikowanego genu i pary starterów mu odpowiadającej. Startery do amplifikacji genów wchodzących w skład konstruktów genetycznych wraz z temperaturami przyłączania starterów zostały przedstawione w rozdziale 2.6.

W przypadku genu kodującego enzym *PtLPCAT1*, którego obecności nie udało się potwierdzić w jednej z rodzajów rośliny transgenicznej *A. thaliana* (zawierającej konstrukt A'), próbę amplifikacji tego genu prowadzono dodatkowo w innych warunkach reakcji – w zależności od ilości matrycy DNA dodawanej do reakcji (10 – 500 ng), od temperatury przyłączania starterów (53,8 – 60,1 °C), stężenia  $MgCl_2$  w mieszaninie reakcyjnej (1,9 – 3,1 mM), stężenia polimerazy DNA Taq w mieszaninie reakcyjnej (0,5 U – 1,5 U).

### **3.19. Analiza statystyczna**

Wyniki badań przedstawiono w pracy w postaci średnich razem z odpowiadającymi im odchyleniami standardowymi (SD).

Aby ocenić istotność różnic dla wyników zależnych grup przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, po czym stosowano test Tukey'a. Z kolei w celu wyliczenia statystycznych różnic między wynikami uzyskanymi dla dwóch niezależnych grup, stosowano test t-Studenta. Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano przy użyciu programu Microsoft Excel.

## 4. WYNIKI

### 4.1. Badania nad określeniem funkcji sklonowanych genów z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* potencjalnie mogących kodować enzymy typu LPLAT

Pierwszym etapem badań nad sklonowanymi genami z *P. tricornutum* było scharakteryzowanie aktywności enzymów kodowanych przez nie w testach badających aktywność enzymów typu LPLAT. W testach tych wykorzystywano kombinacje pięciu akceptorów kwasów tłuszczowych (lizofosfolipidów; *sn*-1-18:1-LPA, *sn*-1-18:1-LPE, *sn*-1-18:1-LPC, *sn*-1-18:1-LPG i *sn*-1-18:1-LPS) z jednym ich donorem tj. [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Po zakończeniu reakcji określano ilość zsyntetyzowanych *de novo* [<sup>14</sup>C]fosfolipidów. Ten wstępny eksperyment pozwolił na zidentyfikowanie enzymów, których aktywność w stosunku do badanych lizofosfolipidów była na tyle wysoka, aby uznać je, jako jeden z LPLATów i poddać dalszej analizie *in vitro* pod kątem ich aktywności w zmieniających się warunkach otoczenia (np. zależność od pH czy temperatury) oraz pod kątem ich specyficzności substratowej. Jako kontrolę traktowano aktywność enzymatyczną uzyskiwaną dla frakcji mikrosomalnych izolowanych z drożdży Y02431 (szczep z wyłączonym genem kodującym główny drożdżowy enzym typu LPCAT; *ΔALE1*) transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. Testy sprawdzające możliwości syntezy fosfolipidów z dodanych substratów (wymienionych powyżej) przeprowadzano na frakcjach mikrosomalnych z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT oraz plazmidem niosącym określony gen z *P. tricornutum*, dodawanych do mieszanin reakcyjnych w porcjach zawierających 1 nmol endogenego PC (testy z mikrosomami niosącymi enzym „A”, „C”, „F” i „G”) lub 0,5 nmola endogenego PC (testy z mikrosomami niosącymi enzym „B” i „D”).

Zarówno dla drożdży transformowanych pustym plazmidem jak i dla drożdży transformowanych badanymi genami izolowano frakcje mikrosomalne z trzech lub czterech niezależnych kolonii drożdżowych uzyskanych po transformacji wprowadzającej określony plazmid (pusty lub niosący badany gen), które traktowano, jako powtórzenia biologiczne. Aby uprościć opis wyników dla każdego enzymu kodowanego przez określony gen przypisano literowy symbol oraz liczbę od 1 do 4. Przypisana liczba wskazuje nr kolonii stransformowanych drożdży, użytej do uzyskania frakcji mikrosomalnej wykorzystywanej w badaniach (Tabela 8). W przypadku drożdży transformowanych pustym plazmidem nr kolonii użytej do przygotowania frakcji



mikrosomalnej oznaczano również liczbą od 1 do 4 wpisywaną po symbolu oznaczającym tego typu frakcje mikrosomalne np. pYES2/CK.1.

**Tabela 8.** Nazwy genów oraz przypisane do nich symbole literowe kodowanych przez nie enzymów. Liczby od 1 do 4 przy symbolu literowym oznaczają niezależną kolonię drożdżową, z której przygotowywano frakcję mikrosomalną wykorzystywaną w badaniach.

Pełna nazwa genu	Symbol enzymu
<i>Phatr3_J54709</i>	A1 A2 A3
<i>Phatr3_J11916</i>	B1 B2 B3 B4
<i>Phatr3_J40461</i>	C1 C2 C3
<i>Phatr3_J43099</i>	D1 D2 D3 D4
<i>Phatr3_J20460</i>	F1 F2 F3
<i>Phatr3_J48640</i>	G1 G2 G3

#### 4.1.1. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „A” kodowanego przez gen *Phatr3\_J54709*

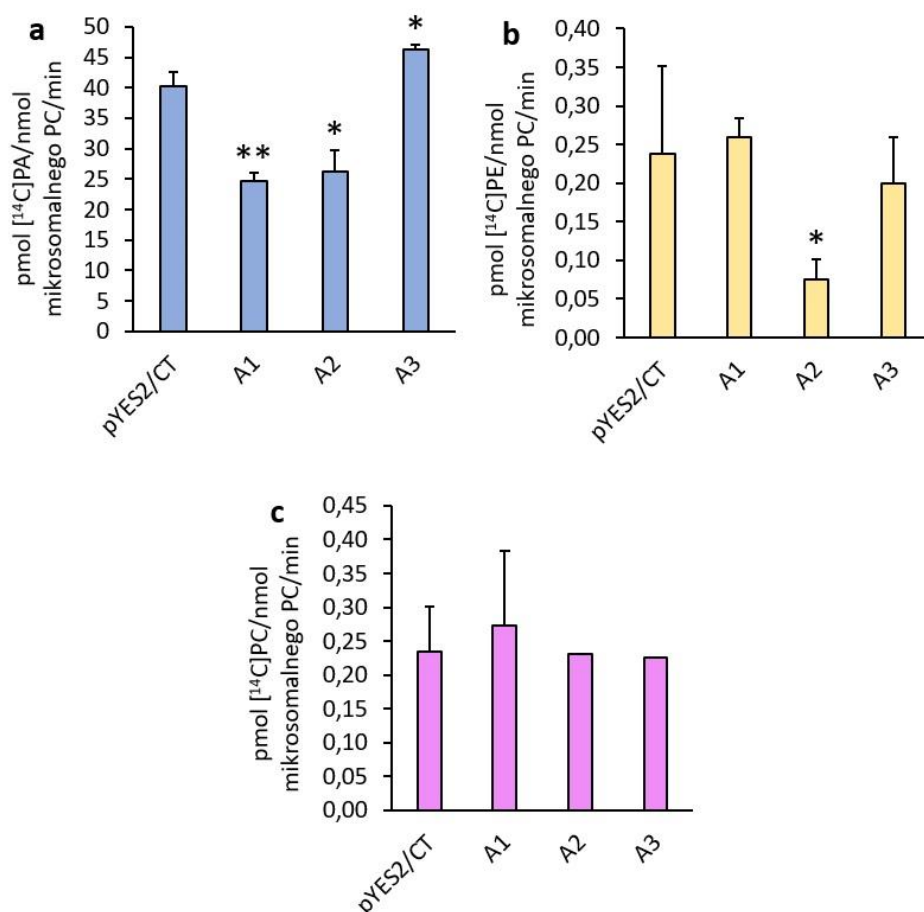
Testy enzymatyczne *in vitro* badające LPLAT’ową aktywność enzymu „A” kodowanego przez gen *Phatr3\_J54709* wykazały podwyższoną aktywność LPAAT’ową (acylotransferazy typu acylo-CoA:kwasy lizofosfatydowy) jedynie dla enzymu (kodowanego przez ten gen) obecnego we frakcji mikrosomalnej z kolonii „3” (A3). Aktywność ta była wyższa od aktywności typu LPAAT odnotowanej dla kontroli (frakcja mikrosomalna z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT) o około 15% i była statystycznie istotna. Aktywność typu LPAAT odnotowana dla

mikrosomów pochodzących z kolonii A1 i A2 drożdży *ΔALE1* transformowanych plazmidami pYES2/CT niosącymi gen *Phatr3\_J54709* była natomiast niższa niż aktywność odnotowana dla frakcji mikrosomalnej z drożdży kontrolnych. Różnice te również były statystycznie istotne (Rys. 7a).

W kolejnych testach jako akceptor kwasów tłuszczowych zastosowano lizofosfatydyloetanolaminę - testy na aktywność typu LPEAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina). Odnotowana aktywność typu LPEAT w testach z wykorzystaniem frakcji mikrosomalnej z drożdży kontrolnych była o ponad 99% niższa niż ich aktywność typu LPAAT. Wykorzystanie w testach frakcji mikrosomalnych z drożdży transformowanych genem *Phatr3\_J54709* nie zmieniło w sposób statystycznie istotny aktywności typu LPEAT odnotowanej dla kolonii A1 i A3 w odniesieniu do aktywności odnotowanej dla testów z mikrosomami kontrolnymi. Jednak aktywność typu LPEAT odnotowana dla kolonii A2 była już statystycznie istotna, ale niższa od aktywności kontrolnej (frakcja mikrosomalna z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT; Rys. 7b).

W testach w których jako akceptor kwasów tłuszczowych zastosowano lizofosfatydylocholinę (określanie aktywności typu LPCAT; acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) odnotowana aktywność dla frakcji mikrosomalnej z drożdży kontrolnych była na zbliżonym poziomie jak odnotowana uprzednio aktywność typu LPEAT. W testach, w których źródłem enzymów były frakcje mikrosomalne z drożdży transformowanych genem *Phatr3\_J54709* odnotowywane aktywności typu LPCAT nie różniły się statystycznie od aktywności tego typu odnotowanej dla mikrosomów kontrolnych (Rys. 7c).

Na podstawie uzyskanych wyników uznano, że gen *Phatr3\_J54709* nie koduje prawdopodobnie enzymów o aktywności typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid). Odnotowano wprawdzie nieco podwyższoną aktywność typu LPAAT (w porównaniu do kontroli) dla jednej z kolonii drożdży transformowanych tym genem, jednakże uzyskana aktywność wydawała się zbyt niska by uznać ją za aktywność LPAAT'ową enzymu kodowanego przez sklonowany gen szczególnie, że aktywności odnotowane dla pozostałych dwu kolonii transformowanych drożdży były poniżej aktywności odnotowanej dla kontroli.



**Rys. 7.** Aktywność typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu kodowanego przez gen *Phatr3\_J54709*, mierzona dla trzech różnych frakcji mikrosomalnych uzyskanych z drożdży pochodzących z pojedynczych kolonii komórkowych z transformowanych tym genem drożdży. Jako tło traktowano aktywność typu LPLAT mikrosomów uzyskanych z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. **a** – aktywność w testach z kwasem lizofosfatydowym i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA (typu LPAAT), **b** – aktywność w testach z lizofosfatydyloetanoloaminą i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA (typu LPEAT), **c** – aktywność w testach z lizofosfatydylocholiną i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA (typu LPCAT).

Wyniki przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT a aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J54709*. Przedstawiona aktywność kontrolna w stosunku do LPA i LPE jest średnią z dwóch frakcji mikrosomalnych (pYES2/CT.1 i pYES2/CT.3), a w stosunku do LPC średnią z trzech (pYES2/CT.1, pYES2/CT.2, pYES2/CT.3), wyizolowanych z oddzielnych kolonii drożdżowych. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\* -  $p \leq 0,01$ , \* -  $p \leq 0,05$ .

#### 4.1.2. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „B” kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916*

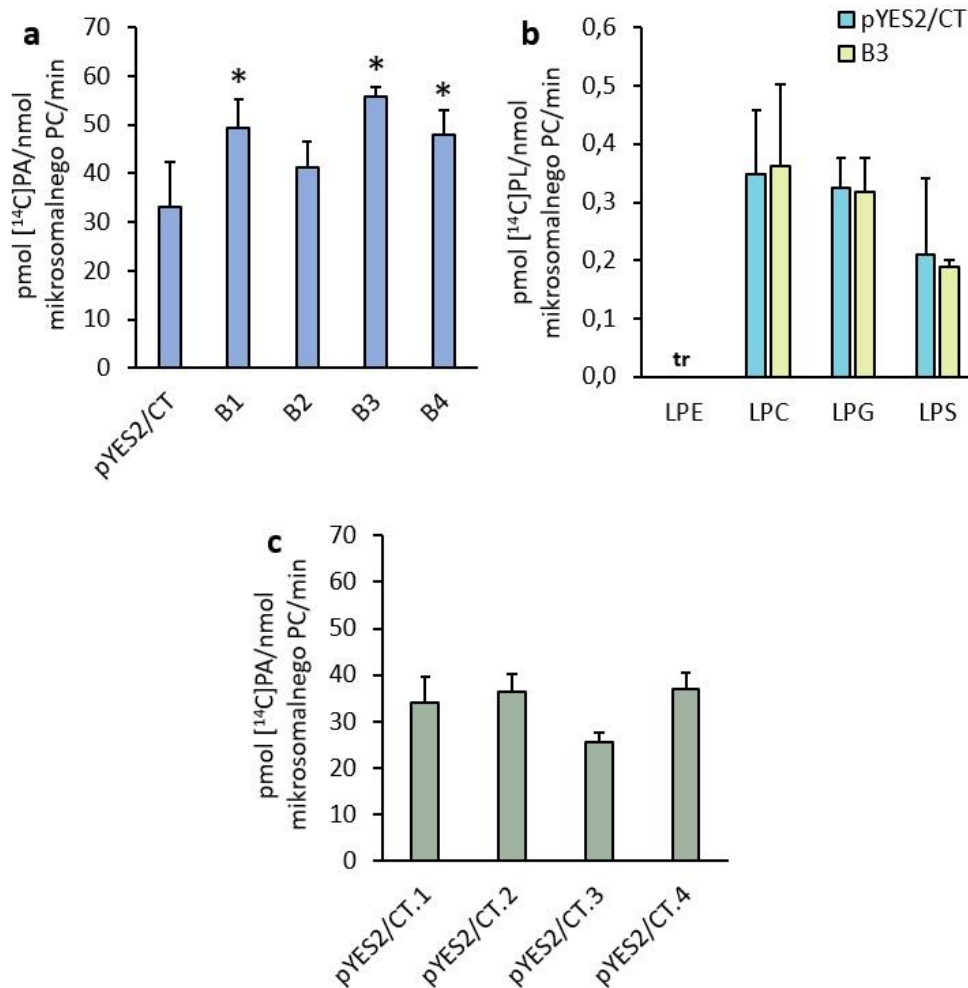
Testy enzymatyczne *in vitro* badające LPAAT'ową aktywność enzymu „B” kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916* wykazały podwyższoną aktywność tego enzymu w stosunku do LPA (kwasu lizofosfatydowego) dla wszystkich czterech badanych frakcji mikrosomalnych (uzyskanych z drożdży pochodzących z 4 różnych stransformowanych kolonii) w stosunku do aktywności odnotowanej dla kontroli (Rys. 8a). Kontrolną aktywność LPAAT'ową badano dla czterech frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z oddzielnych kolonii drożdżowych uzyskanych po transformacji drożdży  $\Delta ALE1$  pustym plazmidem pYES2/CT (Rys. 8c). Na Rys. 8a aktywność LPAAT'ową dla kontroli przedstawiono w postaci średniej z tych czterech powtórzeń (Rys. 8c). Aktywność LPAAT'owa (acylotransferazy typu acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy) badanego enzymu „B” była wyższa od aktywności odnotowanej dla kontroli o około 48% dla frakcji mikrosomalnej z kolonii B1, 24% dla frakcji mikrosomalnej z kolonii B2, 67% dla frakcji mikrosomalnej z kolonii B3 i 44% dla frakcji mikrosomalnej z kolonii B4. Natomiast statystycznie istotną aktywność LPAAT'ową wykazano dla enzymu „B” we frakcjach mikrosomalnych z następujących kolonii „1”, „3” i „4” (Rys. 8a).

Testy enzymatyczne sprawdzające aktywność enzymu „B” do pozostałych LPL (lizofosfolipidów; LPE - lizofosfatydyloetanolaminy, LPC - lizofosfatydylocholino, LPG - lizofosfatydyloglicerolu, LPS – lizofosfatydyloseryny) zostały przeprowadzone z wykorzystaniem mikrosomów izolowanych z kolonii B3, dla których wykazana aktywność LPAAT'owa była najwyższa. Testy te nie odnotowały, aby enzym „B” wykazywał aktywność typu LPEAT, LPCAT, LPGAT i LPSAT, ponieważ aktywność dla frakcji mikrosomalnych z kolonii B3 była na podobnym poziomie jak aktywność odnotowana dla mikrosomów kontrolnych.

Frakcja mikrosomalna z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT wykazała o wiele niższą aktywność enzymatyczną typu LPCAT, LPGAT i LPSAT (o około 99%) niż aktywność typu LPAAT dla mikrosomów kontrolnych. Natomiast aktywność LPEAT'owa zarówno dla mikrosomów kontrolnych jak i mikrosomów z kolonii B3 była wykryta tylko w śladowych ilościach (Rys. 8b). Aktywność LPEAT'owa dla mikrosomów kontrolnych widoczna na Rys. 8b różni się od tej na Rys. 7b; tym razem jest to aktywność śladowa. W testach badających aktywność LPLAT'ową enzymu A, w tym aktywność typu LPEAT (Rys. 7b), stosowano jednak większe ilości frakcji mikrosomalnej (1 nmol mikrosomalnego PC/test); zarówno w testach

z frakcją mikrosomów kontrolnych jak i zawierającymi badany enzym „A”. W testach omawianych obecnie (zarówno z mikrosomami kontrolnymi jak i mikrosomami zawierającymi badany enzym „B”) stosowano zaś tylko 0,5 nmol mikrosomalnego PC/test.

Odnotowanie znacząco wyższej (w trzech przypadkach statystycznie istotnej) aktywności typu LPAAT w testach z frakcjami mikrosomalnymi zawierającymi enzym „B” (kodowany przez gen *Phatr3\_J11916*) od aktywności typu LPAAT w testach z mikrosomami kontrolnymi (odpowiednio niższa aktywność LPAAT’owa została wykazana w czterech powtórzeniach biologicznych; Rys. 8c), wskazuje, że gen *Phatr3\_J11916* koduje enzym o aktywności LPAATowej. Enzym ten nazwano wstępnie *PtLPAAT1*.



**Rys. 8.** Aktywność typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916*, mierzona dla frakcji mikrosomalnych uzyskanych z drożdży pochodzących z pojedynczych kolonii komórkowych z transformowanych tym genem drożdży. Jako tło traktowano aktywność typu LPLAT mikrosomów uzyskanych z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. **a** – aktywność LPAAT’owa mierzona dla czterech różnych frakcji mikrosomalnych niosących enzym „B”; substraty reakcji to kwas lizofosfatydowy i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, **b** – aktywność LPLAT’owa mierzona dla frakcji mikrosomalnej „B3” w stosunku do pozostałych lizofosfolipidów (LPE - lizofosfatydyloetanolaminy, LPC - lizofosfatydylocholiny, LPG - lizofosfatydyloglicerolu, LPS - lizofosfatydyloseryny) i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA stanowiących substraty reakcji, **c** – aktywność LPAAT’owa mierzona dla czterech różnych frakcji mikrosomalnych z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT (aktywność kontrolna), substraty reakcji to kwas lizofosfatydowy i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA.

Wyniki przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT a aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J11916*. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \* -  $p \leq 0,05$ . tr – ślady (ang. *traces*).

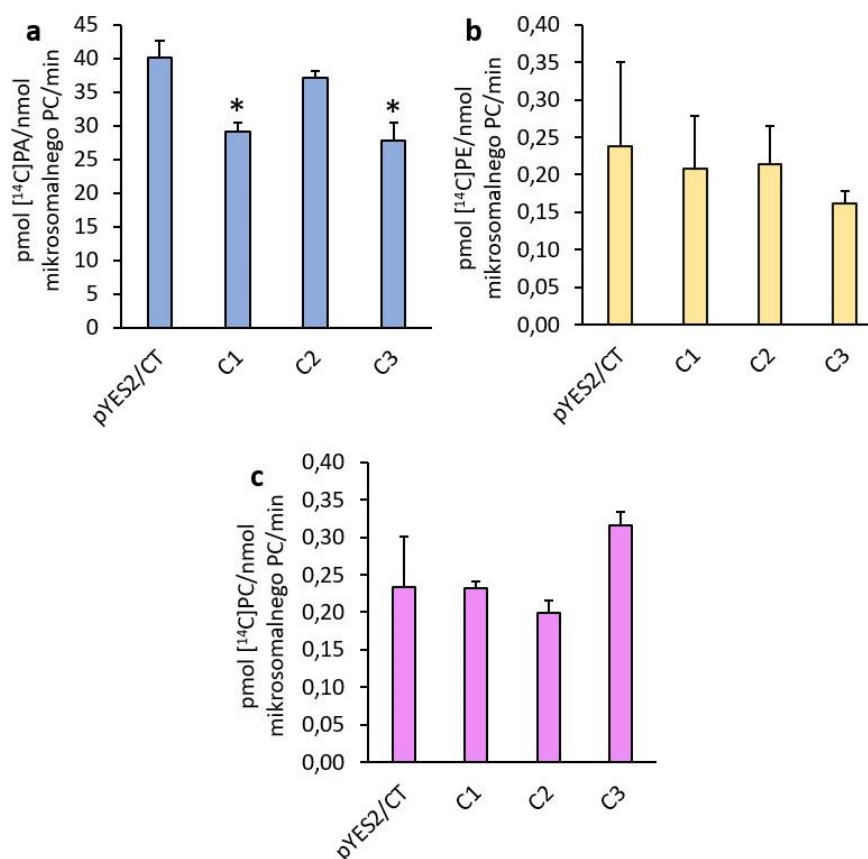
#### 4.1.3. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „C” kodowanego przez gen *Phatr3\_J40461*

Testy enzymatyczne *in vitro* badające LPLAT'ową aktywność enzymu „C” kodowanego przez gen *Phatr3\_J40461* wykazały nieco niższą aktywność typu LPAAT dla wszystkich powtórzeń biologicznych (C1, C2 i C3) w porównaniu do aktywności typu LPAAT odnotowanej dla frakcji mikrosomalnej z drożdży kontrolnych (transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT). Różnice te były statystycznie istotne w przypadku aktywności uzyskanej dla mikrosomów z kolonii C1 i C3 (Rys. 9a).

W kolejnych testach, w których akceptorem kwasów tłuszczowych była lizofosfatydyloetanolamina, podobnie jak w testach z kwasem lizofosfatydowym (aktywność typu LPAAT), również odnotowano niższą aktywność (typu LPEAT) od kontroli dla wszystkich trzech wariantów mikrosomów pochodzących z różnych kolonii drożdżowych uzyskanych po transformacji drożdży  $\Delta ALE1$  plazmidami pYES2/CT niosącymi gen *Phatr3\_J40461* (Rys. 9b). Różnice w odnotowanej aktywności były jednak statystycznie nieistotne. Aktywność LPEAT'owa uzyskana dla frakcji mikrosomalnych z drożdży transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT, była podobna do tej uzyskanej w testach określających aktywność LPLAT'ową enzymu „A” (Rys. 7b). W obu tych testach zastosowana była taka sama ilość frakcji mikrosomalnej; 1 nmol mikrosomalnego PC/test.

W testach badających aktywność LPCAT'ową, w których akceptorem kwasów tłuszczowych była lizofosfatydylocholina, mikrosomy kontrolne (z drożdży transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT) wykazywały podobną aktywność jak w testach badających aktywność LPEAT'ową. Aktywność LPCAT'owa enzymu „C” w testach z lizofosfatydylocholiną w przypadku frakcji mikrosomów z kolonii drożdżowych „1” i „2” nie odbiegała znacząco od aktywności kontrolnej. Jedynie frakcje mikrosomalne z kolonii „3” wykazały trochę wyższą aktywność od aktywności dla mikrosomów z drożdży transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT, jednak nie była ona statystycznie istotna.

Omówione powyżej badania wskazują, że gen *Phatr3\_J40461* nie koduje prawdopodobnie enzymów o aktywności typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid).



**Rys. 9.** Aktywność typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu kodowanego przez gen *Phatr3\_J40461*, mierzona dla trzech różnych frakcji mikrosomalnych uzyskanych z drożdży pochodzących z pojedynczych kolonii komórkowych z transformowanych tym genem drożdży. Jako tło traktowano aktywność typu LPLAT frakcji mikrosomalnych uzyskanych z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. **a** – aktywność (typu LPAAT) w testach z kwasem lizofosfatydowym i  $[^{14}\text{C}]18:1\text{-CoA}$ , **b** – aktywność (typu LPEAT) w testach z lizofosfatydyloetanoloaminą i  $[^{14}\text{C}]18:1\text{-CoA}$ , **c** – aktywność (typu LPCAT) w testach z lizofosfatydylocholiną i  $[^{14}\text{C}]18:1\text{-CoA}$ .

Wyniki przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT a aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J11916*. Przedstawiona aktywność kontrolna w stosunku do LPA i LPE jest średnią z dwóch frakcji mikrosomalnych (pYES2/CT.1, pYES2/CT.3), a w stosunku do LPC średnią z trzech (pYES2/CT.1, pYES2/CT.2, pYES2/CT.3), wyizolowanych z oddzielnych kolonii drożdżowych. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \* -  $p \leq 0,05$ .



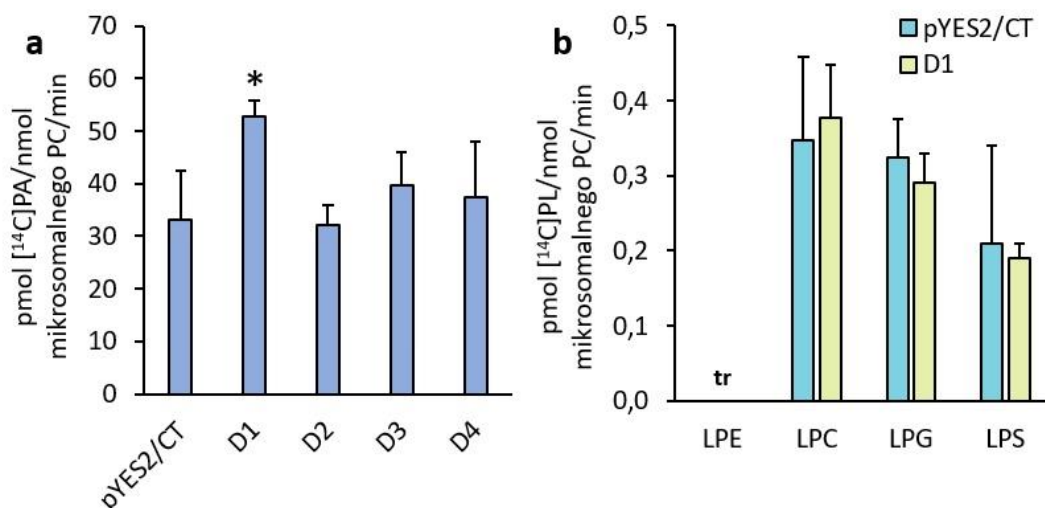
#### 4.1.4. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „D” kodowanego przez gen *Phatr3\_J43099*

Testy enzymatyczne *in vitro* badające LPLAT'ową aktywność enzymu „D” kodowanego przez gen *Phatr3\_J43099* wykazały statystycznie istotną aktywność LPAAT'ową (acylotransferazy typu acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy) dla enzymu kodowanego przez gen obecny we frakcji mikrosomalnej z kolonii „1” (D1). Aktywność ta była wyższa od aktywności typu LPAAT odnotowanej dla frakcji mikrosomalnej izolowanej z drożdży kontrolnych (wyizolowanych z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT) o około 58%. Aktywność LPAAT'owa odnotowana dla mikrosomów pochodzących z kolonii D3 i D4 z drożdży *ΔALE1* transformowanych plazmidami pYES2/CT niosącymi gen *Phatr3\_J43099* również była wyższa od kontroli (dla D3 o około 20%, dla D4 o około 11%), jednak nie na tyle aby różnice były statystycznie istotne. Aktywność typu LPAAT w testach z mikrosomami pochodzącymi z kolonii D2 była podobna do aktywności typu LPAAT odnotowanej w testach z mikrosomami kontrolnymi (Rys. 10a). Testy enzymatyczne *in vitro* badające aktywność LPAAT'ową mikrosomów kontrolnych z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT zostały przeprowadzone dla czterech frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z oddzielnych kolonii drożdżowych, których wyniki przedstawiono na Rys. 8c. Na Rys. 10a przedstawiono natomiast średnią z tych czterech powtórzeń.

Kolejne testy enzymatyczne dotyczyły badania aktywności enzymu „D” w stosunku do pozostałych lizofosfolipidów (LPE - lizofosfatydyloetanolaminy, LPC - lizofosfatydylocholiny, LPG - lizofosfatydyloglicerolu, LPS – lizofosfatydyloseryny). Testy te przeprowadzano poprzez dodawanie do mieszaniny reakcyjnej frakcji mikrosomalnej izolowanej z kolonii D1, którą wybrano ze względu na najwyższą z pośród testowanych frakcji mikrosomalnych aktywność LPAAT'ową. Wyniki tych testów nie wskazują, aby enzym „D” wykazywał aktywność do pozostałych badanych lizofosfolipidów (LPE, LPC, LPG i LPS). Aktywności uzyskane w testach z mikrosomami pochodzącymi z kolonii D1 były podobne do aktywności uzyskiwanych w testach z mikrosomami kontrolnymi. Aktywność enzymatyczna typu LPCAT, LPGAT i LPSAT dla mikrosomów kontrolnych była niższa o około 99% od aktywności typu LPAAT. Natomiast aktywność LPEAT'owa zarówno dla mikrosomów kontrolnych jak i mikrosomów z kolonii D1 była wykryta tylko w śladowych ilościach. Aktywność LPLAT'owa enzymu „D” była badana przy dodatku 0,5 nmol mikrosomalnego PC do mieszaniny reakcyjnej, tak samo jak w przypadku testów określających aktywność

LPLAT'ową enzymu „B”. W obu tych przypadkach aktywność LPEAT'owa była śladowa (Rys. 8b i Rys. 10b) w odróżnieniu od aktywności LPEAT'owej odnotowanej w testach badających aktywność enzymu „A” i „C”, gdzie do testów dodawano 1 nmol mikrosomalnego PC (Rys. 7a i Rys. 9a).

Uzyskane wyniki wskazują, że gen *Phatr3\_J43099* może kodować enzym o aktywności LPAAT'owej gdyż aktywność frakcji mikrosomalnej z kolonii drożdżowych D1 była wyższa od aktywności dla kontrolnej frakcji mikrosomalnej o ponad połowę i statystycznie istotna. W dodatku mikrosomy uzyskane z kolonii D2 i D4 również wykazywały aktywność typu LPAAT wyższą od aktywności wykazywanej przez mikrosomy kontrolne. W związku z tym podjęto decyzję o dalszym badaniu enzymu „D”, chociażby w kierunku jego aktywności do innych donorów kwasów tłuszczowych np. [<sup>14</sup>C]16:0-CoA.



**Rys. 10.** Aktywność typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu kodowanego przez gen *Phatr3\_J43099*, mierzona dla frakcji mikrosomalnych uzyskanych z drożdży pochodzących z pojedynczych kolonii komórkowych z transformowanych tych genem drożdży. Jako tło traktowano aktywność typu LPLAT mikrosomów uzyskanych z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. **a** – aktywność LPAAT’owa mierzona dla czterech różnych frakcji mikrosomalnych niosących enzym „D”; substraty reakcji to kwas lizofosfatydowy i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, **b** – aktywność enzymatyczna typu LPLAT frakcji mikrosomalnej „D1” w stosunku do pozostałych lizofosfolipidów (LPE - lizofosfatydyloetanolaminy, LPC - lizofosfatydylocholiny, LPG - lizofosfatydyloglicerolu, LPS - lizofosfatydyloseryny) i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA.

Wyniki przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT a aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J43099*. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \* -  $p \leq 0,05$ . tr – ślady (ang. *traces*).

#### 4.1.5. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „F” kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460*

Testy enzymatyczne *in vitro* badające LPLAT’ową aktywność enzymu „F” kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* wykazały podwyższoną aktywność LPAAT’ową (acylotransferazy typu acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy) jedynie dla enzymu obecnego we frakcji mikrosomalnej z kolonii „2” (F2). Aktywność ta była wyższa od aktywności typu LPAAT odnotowanej dla kontroli (frakcja mikrosomalna z drożdży  $\Delta ALE1$

transformowanych pustymi plazmidami pYES2/CT) o około 71% i była statystycznie istotna. Aktywność typu LPAAT odnotowana dla mikrosomów pochodzących z kolonii F1 drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J54709* była podobna do aktywności odnotowanej dla frakcji mikrosomalnej z drożdży kontrolnych. Natomiast aktywność LPAAT'owa dla mikrosomów pochodzących z kolonii F3 była niższa od aktywności uzyskanej dla mikrosomów kontrolnych o około 77%. Różnica ta była statystycznie istotna (Rys. 11a).

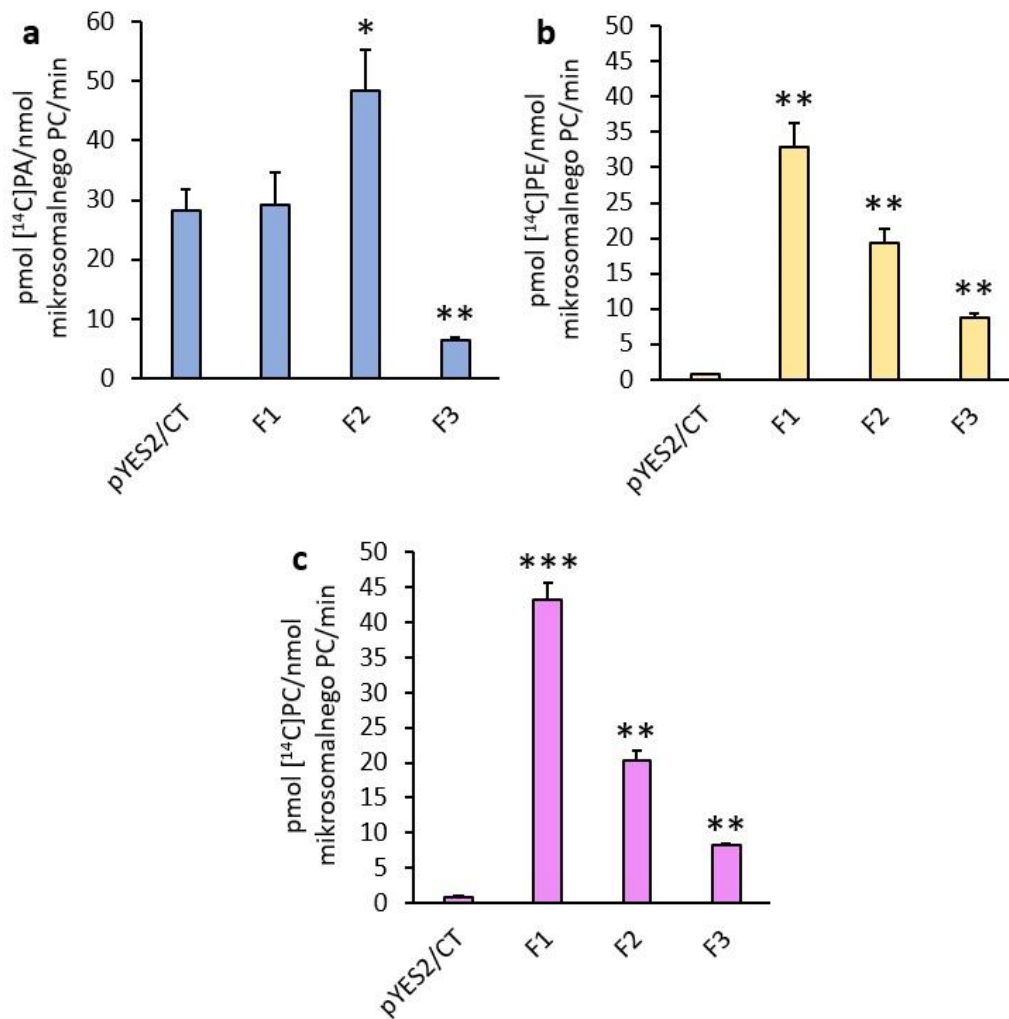
Kolejne testy dotyczące badań z zastosowaniem lizofosfatydyloetanolaminy, wykazały bardzo wysoką aktywność enzymu „F” do tego lizofosfatydylolipidu, dla wszystkich trzech badanych frakcji mikrosomalnych pochodzących z kolonii drożdżowych F1, F2 i F3. Najwyższą aktywność LPEAT'ową odnotowano dla frakcji mikrosomalnej wyizolowanej z kolonii F1, następnie z kolonii F2 i najniższą z kolonii F3. Pomimo, że uzyskana aktywność LPEAT'owa dla mikrosomów uzyskanych z poszczególnych kolonii drożdżowych różniła się dość znacząco to we wszystkich trzech przypadkach była ona statystycznie wysoko istotna w porównaniu do aktywności LPEAT'owej odnotowanej dla kontroli (frakcja mikrosomalna z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT). Odnotowana aktywność typu LPEAT w testach z wykorzystaniem frakcji mikrosomalnej z drożdży kontrolnych była o około 97% niższa od aktywności typu LPAAT (Rys. 11b).

Następne testy dotyczyły określenia aktywności typu LPCAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) dla enzymu „F”, która również okazała się być bardzo wysoka dla wszystkich trzech badanych frakcji mikrosomalnych (F1, F2 i F3). W testach, w których źródłem enzymów była frakcja mikrosomalna F1, aktywność LPCAT'owa była najwyższa i statystycznie bardzo wysoko istotna. Aktywność LPCAT'owa dla mikrosomów pochodzących z kolonii drożdżowych F2 i F3 była już niższa od tej uzyskanej dla F1, jednak w porównaniu do kontroli aktywności te były nadal bardzo wysokie i statystycznie wysoko istotne. W testach, w których jako akceptor kwasów tłuszczowych zastosowano lizofosfatydylocholinę odnotowana aktywność dla frakcji mikrosomalnej z drożdży kontrolnych była na zbliżonym poziomie jak odnotowana wcześniej aktywność typu LPEAT (Rys. 11c).

Ze względu na bardzo wysoką aktywność LPEAT'ową i LPCAT'ową badanego enzymu „F”, przeprowadzono kolejne badania mające na celu sprawdzenie preferencyjności tego enzymu do lizofosfatydylocholiny i lizofosfatydyloetanolaminy, dodawanych razem do jednej mieszaniny reakcyjnej. Testy te przeprowadzono

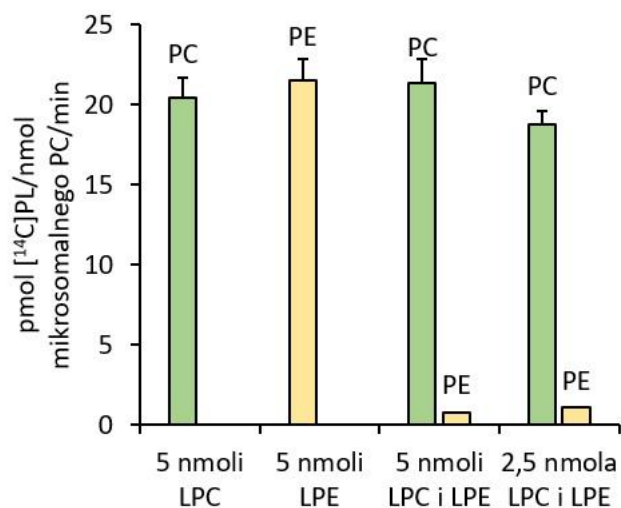
z wykorzystaniem frakcji mikrosomalnej uzyskanej z kolonii F3. W wyniku przeprowadzonych testów odnotowano, że enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* posiada znacznie wyższą preferencję do lizofosfatydylocholiny niż do lizofosfatydyloetanolaminy, zarówno w teście, w którym dodano do jednej mieszaniny reakcyjnej po 5 nmoli LPE i LPC jak i w teście w którym dodano po 2,5 nmola LPE i LPC. Aktywność enzymu „F” do lizofosfatydyloetanolaminy w tych testach stanowiła tylko około 4% aktywności odnotowanej dla lizofosfatydylocholiny, gdy dodano po 5 nmoli LPE i LPC do jednej mieszaniny reakcyjnej. W przypadku, gdy do mieszaniny reakcyjnej dodano 2,5 nmol LPE i LPC, aktywność uzyskana do lizofosfatydyloetanolaminy stanowiła około 6% aktywności odnotowanej dla lizofosfatydylocholiny (Rys. 12).

Uzyskane wyniki jasno wskazują, że gen *Phatr3\_J20460* koduje enzym o aktywności typu LPCAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina). Co prawda pierwsze testy sprawdzające aktywność enzymu „F” wykazały podobnie bardzo wysoką aktywność LPEAT’ową jak i LPCAT’ową, jednak kolejne testy badające preferencyjność tego enzymu, przy dodatku do jednej mieszaniny reakcyjnej zarówno LPE i LPC, odnotowały bardzo wysoką preferencję enzymu „F” do lizofosfatydylocholiny. W związku z tym enzym ten nazwano *PtLPCAT1* i poddano dalszym analizom takim jak optymalizacja warunków reakcji (stężenie mikrosomów, czas reakcji, wpływ jonów obecnych w mieszaninie reakcyjnej, wpływ pH) czy badania specyficzności substratowej w kierunku nie tylko akceptorów kwasów tłuszczowych, ale także donorów kwasów tłuszczowych (badania te będą prezentowane/omawiane w dalszej części pracy).



**Rys. 11.** Aktywność typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460*, mierzona dla trzech różnych frakcji mikrosomalnych uzyskanych z drożdży pochodzących z pojedynczych kolonii komórkowych z transformowanych tym genem drożdży. Jako tło traktowano aktywność typu LPLAT mikrosomów uzyskanych z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. **a** – aktywność w testach z kwasem lizofosfatydowym i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA (typu LPAAT), **b** – aktywność w testach z lizofosfatydyloetanolaminą i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA (typu LPEAT), **c** – aktywność w testach z lizofosfatydylocholiną i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA (typu LPCAT).

Wyniki przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT a aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460*. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\*\* -  $p \leq 0,001$ , \*\* -  $p \leq 0,01$ , \* -  $p \leq 0,05$ .



**Rys. 12.** Preferencja enzymu kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* do lizofosfatydyloetanolaminy i lizofosfatydylocholiny, mierzona w testach z frakcją mikrosomalną uzyskaną z kolonii drożdży F3 transformowanych tym genem. Pierwsze dwa słupki (od lewej) przedstawiają aktywność enzymu „F” do lizofosfatydylocholiny i lizofosfatydyloetanolaminy, dodawanych osobno do mieszanin reakcyjnych w stężeniu 5 nmoli/test. Kolejne dwa słupki przedstawiają preferencje/wykorzystywanie LPC i LPE przez enzym „F” w testach, w których w mieszaninie reakcyjnej były obecne zarówno cząsteczki lizofosfatydylocholiny (LPC) jak i lizofosfatydyloetanolaminy (LPE), w stężeniu 5 nmoli LPE i 5 nmoli LPC/test, lub 2,5 nmola LPE i 2,5 nmola LPC/test. Donorem kwasów tłuszczowych w reakcji był [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Nad słupkami umieszczono skróconą nazwę produktu reakcji (PC- fosfatydylocholina, PE-fosfatydyloetanolamina). Wyniki przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym.

#### 4.1.6. Aktywność typu LPLAT (charakterystyczna dla acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu „G” kodowanego przez gen *Phatr3\_J48640*

Testy enzymatyczne *in vitro* badające LPLAT’ową aktywność enzymu „G” kodowanego przez gen *Phatr3\_J48640* odnotowały nieco wyższą aktywność LPAAT’ową (acylotransferazy typu acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy) dla enzymu kodowanego przez ten gen obecnego we frakcji mikrosomalnej z kolonii „3” (G3). Aktywność ta była wyższa od aktywności typu LPAAT odnotowanej dla kontroli (frakcja mikrosomalna z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidami pYES2/CT) o około 6% i nie była statystycznie istotna. Pozostałe frakcje mikrosomalne (z kolonii G1 i G2) wykazały niższą aktywność LPAAT’ową od aktywności odnotowanej dla frakcji mikrosomalnej z drożdży kontrolnych. Różnice te były statystycznie istotne (Rys. 13a).

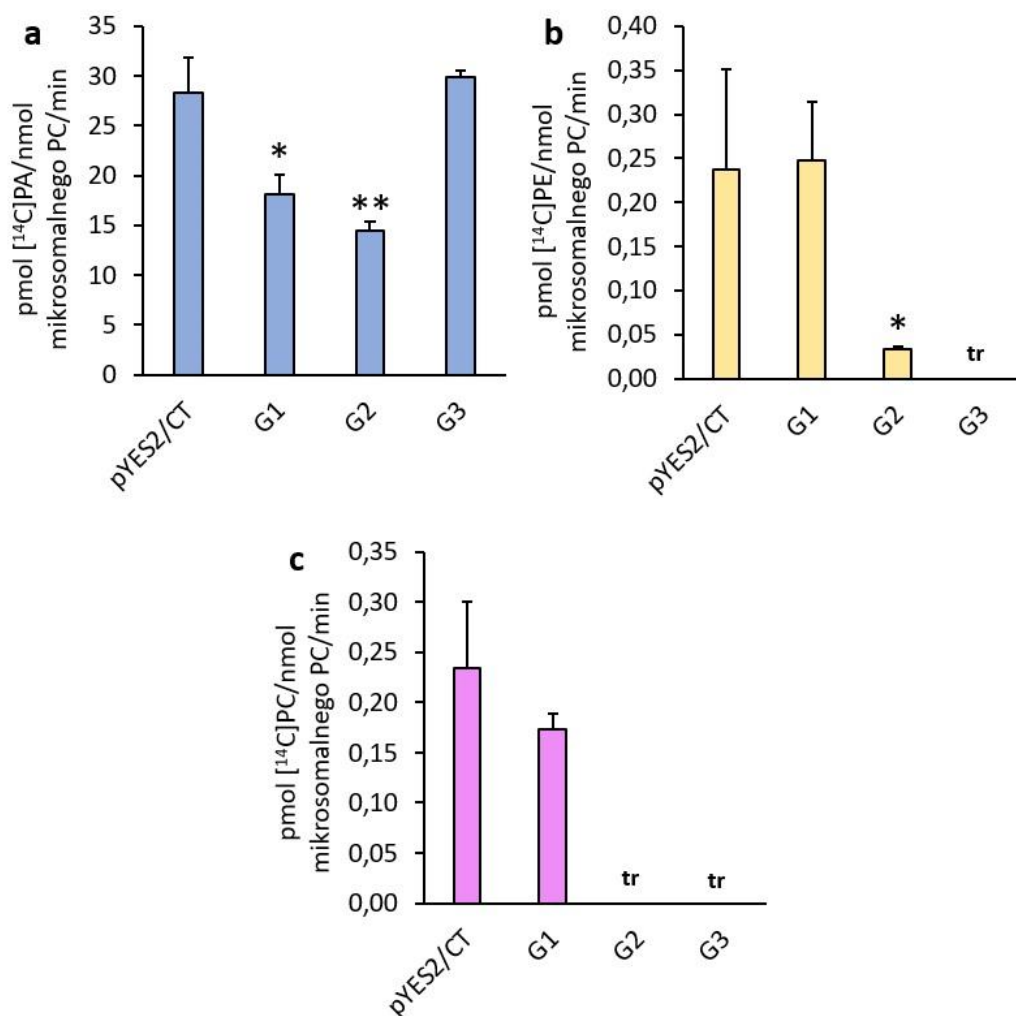
W testach, w których akceptorem kwasów tłuszczowych była lizofosfatydyloetanolamina, aktywność LPEAT'owa badanego enzymu „G” była niższa od aktywności kontrolnej dla dwóch frakcji mikrosomalnych; z kolonii G2 i G3. Odnotowana aktywność dla mikrosomów G2 była statystycznie istotna w stosunku do aktywności odnotowanej dla mikrosomów z kolonii drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. Z kolei dla mikrosomów G3 aktywność LPEAT'ową odnotowano tylko w śladowych ilościach. Natomiast aktywność odnotowana dla frakcji mikrosomalnych z kolonii G1 była na podobnym poziomie jak aktywność dla mikrosomów kontrolnych i nie była statystycznie istotna. Odnotowana aktywność typu LPEAT dla frakcji mikrosomalnych z drożdży kontrolnych była o około 99% niższa niż ich aktywność typu LPAAT (Rys. 13b).

W kolejnych testach określono aktywność typu LPCAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) enzymu „G” poprzez zastosowanie lizofosfatydylocholiny jako akceptora kwasów tłuszczowych. W testach tych enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J48640* wykazał niższą aktywność niż aktywność dla frakcji mikrosomalnych z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. Obniżona aktywność LPCAT'owa uzyskana w testach z frakcją mikrosomalną z kolonii G1 nie była jednak statystycznie istotna. Natomiast aktywność typu LPCAT dla frakcji mikrosomalnych z kolonii G2 i G3 odnotowano tylko w śladowych ilościach. Odnotowana aktywność typu LPCAT dla frakcji mikrosomalnych z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT była na podobnym poziomie jak ich aktywność typu LPEAT (Rys. 13c).

Uzyskane wyniki dają podstawę do stwierdzenia, że gen *Phatr3\_J48640* nie koduje prawdopodobnie enzymów o aktywności typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid), ponieważ odnotowane aktywności były niższe od aktywności wykazywanej przez mikrosomy z drożdży kontrolnych lub na podobnym poziomie.

Odnotowywanie obniżonych aktywności w testach z mikrosomami z transformowanych drożdży w porównaniu do tego typu testów z mikrosomami kontrolnymi może świadczyć, że przeprowadzona/przeprowadzone transformacje wpływały na endogenną acylotransferazę drożdżową - SLC - obecną w tych drożdżach. Sposób tego oddziaływania nie jest obecnie znany. Można jedynie rozważać możliwość takiego wpływu poprzez produkty wprowadzanych genów, obecnie jednak niezidentyfikowane.





**Rys. 13.** Aktywność typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu kodowanego przez gen *Phatr3\_J48640*, mierzona dla trzech różnych frakcji mikrosomalnych uzyskanych z drożdży pochodzących z pojedynczych kolonii komórkowych z transformowanych tym genem drożdży. Jako tło traktowano aktywność typu LPLAT mikrosomów uzyskanych z drożdży delecyjnych *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. **a** – aktywność w testach z kwasem lizofosfatydowym i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA (typu LPAAT), **b** – aktywność w testach z lizofosfatydyloetanolaminą i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA (typu LPEAT), **c** – aktywność w testach z lizofosfatydylocholiną i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA (typu LPCAT).

Wyniki przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością dla mikrosomów z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT a aktywnością dla mikrosomów z drożdży *ΔALE1* transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J48640*. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\* -  $p \leq 0,01$ , \* -  $p \leq 0,05$ . tr – ślady (ang. *traces*).

## **4.2. Charakterystyka reakcji enzymatycznych *in vitro* katalizowanych przez enzymy LPAAT (acylotransferaza acylo-CoA:kwasy lizofosfatydowy) kodowane przez geny *Phatr3\_J11916* oraz *Phatr3\_J43099* sklonowane z okrzemka *Phaeodactylum tricorutum***

W rozdziale 4.1.2. i 4.1.4. przedstawiono wstępne wyniki badań dotyczących aktywności dwóch enzymów wstępnie określonych jako enzymy typu LPLAT, kodowanych przez geny *Phatr3\_J11916* i *Phatr3\_J43099*. Reakcje enzymatyczne *in vitro*, które przeprowadzono w tych wstępnych badaniach dotyczyły aktywności tych enzymów w stosunku do różnych lizofosfolipidów (akceptorów kwasów tłuszczowych) w kombinacji z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA (donor kwasów tłuszczowych). Powyższe testy pozwoliły na scharakteryzowanie enzymu kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916* jako enzymu typu LPAAT (acylotransferaza acylo-CoA:kwasy lizofosfatydowy) oraz nadanie mu nazwy *PtLPAAT1*. Natomiast enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J43099* uznano za prawdopodobnie będący enzymem typu LPAAT (później nazywany w niniejszym rozdziale, jako *PtLPAAT2*), który wymaga przeprowadzenia dalszych badań pozwalających na dokładniejsze poznanie jego funkcji.

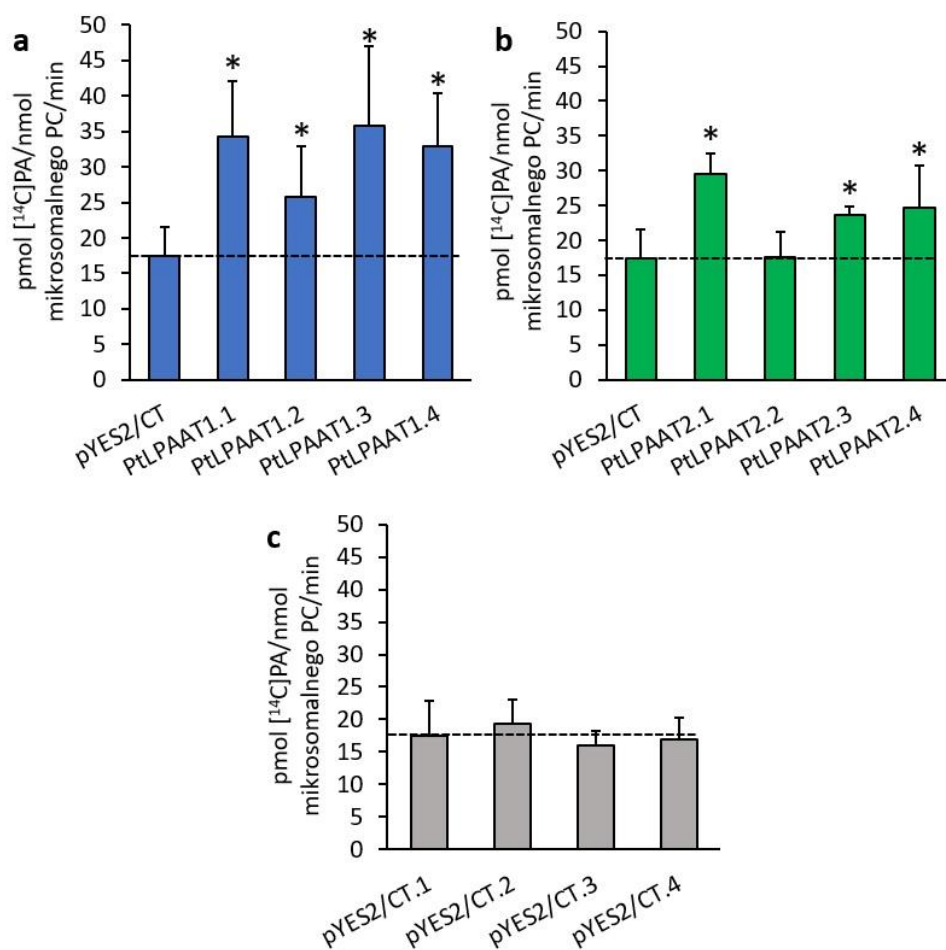
W niniejszym rozdziale przedstawiono kontynuację badań nad enzymami *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2*. Badania te dotyczyły specyficzności substratowej tych enzymów w testach z [<sup>14</sup>C]16:0-CoA (donor kwasów tłuszczowych) i różnymi akceptorami kwasów tłuszczowych, specyficzności substratowej w stosunku do różnych donorów kwasów tłuszczowych w testach z wykorzystaniem [<sup>14</sup>C]18:1-LPA jako akceptora kwasów tłuszczowych oraz wpływu różnych warunków reakcji (wpływ temperatury, pH buforu, stężenia jonów wapnia i magnezu) na ich aktywność.

### **4.2.1. Specyficzność substratowa enzymów typu LPAAT (acylotransferazy acylo-CoA:kwasy lizofosfatydowy) kodowanych przez geny *Phatr3\_J11916* oraz *Phatr3\_J43099* sklonowane z okrzemka *Phaeodactylum tricorutum***

Testy enzymatyczne *in vitro* badające aktywność oraz specyficzność substratową enzymów *PtLPAAT1* (kodowany przez gen *Phatr3\_J11916*) i *PtLPAAT2* (kodowany przez gen *Phatr3\_J43099*) w stosunku do [<sup>14</sup>C]16:0-CoA (donor kwasów tłuszczowych) i 18:1-LPA (akceptor kwasów tłuszczowych; Rys. 14) potwierdziły ich aktywność LPAAT'ową, wcześniej wykazaną w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA w kombinacji z 18:1-LPA (rozdział 4.1.2. i 4.1.4.). W obecnie prezentowanych wynikach testów, w których donorem kwasów tłuszczowych był [<sup>14</sup>C]16:0-CoA, odnotowano statystycznie istotną aktywność

LPAAT'ową dla enzymu *PtLPAAT1* kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916* w przypadku wszystkich czterech badanych frakcji mikrosomalnych (uzyskanych z transformowanych drożdży pochodzących z pojedynczych kolonii komórkowych) w stosunku do aktywności typu LPAAT odnotowanej dla kontroli (endogenna drożdżowa acylotransferaza *Slc1*). Aktywność LPAAT'owa (acylotransferazy typu acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy) wykazywana przez enzym *PtLPAAT1* była wyższa od aktywności odnotowanej dla kontroli o około 96% dla frakcji mikrosomalnej (uzyskanej z drożdży pochodzących) z kolonii „1”, o około 48% dla frakcji mikrosomalnej z kolonii „2”, o około 105% dla frakcji mikrosomalnej z kolonii „3” i o około „89% dla frakcji mikrosomalnej z kolonii „4”. (Rys. 14a). Kontrolna aktywność LPAAT'owa również została zbadana dla czterech frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z drożdży pochodzących z oddzielnych kolonii uzyskanych po transformacji drożdży *ΔALE1* pustym plazmidem pYES2/CT (Rys. 14c). Na Rys. 14a oraz 14b aktywność LPAAT'owa dla kontroli została przedstawiona w postaci średniej z tych czterech powtórzeń.

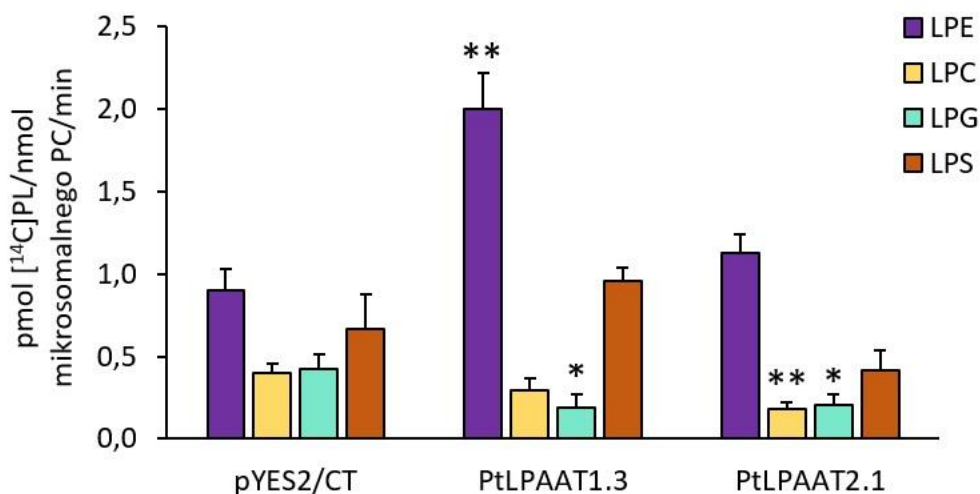
Testy enzymatyczne sprawdzające aktywność LPAAT'ową enzymu *PtLPAAT2* kodowanego przez gen *Phatr3\_J43099* przy zastosowaniu [<sup>14</sup>C]16:0-CoA jako donora kwasów tłuszczowych wykazały aktywność wyższą od kontrolnej (wykazywanej przez endogenny *Slc1*) dla trzech frakcji mikrosomalnych; pochodzących z drożdży uzyskanych z kolonii „1”, „3” i „4”, odpowiednio o około 70%, 36% i 41%. Aktywności te były statystycznie istotne dla wszystkich trzech wymienionych frakcji mikrosomalnych. Aktywność enzymu *PtLPAAT2* odnotowana dla frakcji mikrosomalnej wyizolowanej z drożdży pochodzących z kolonii „2” była natomiast na podobnym poziomie jak aktywność odnotowana dla kontroli (Rys. 14b).



**Rys. 14.** Aktywność typu LPAAT (acylotransferazy acylo-CoA:kwas fosfatydowy) enzymu kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916* (*PtLPAAT1*) oraz gen *Phatr3\_J43099* (*PtLPAAT2*), mierzona dla frakcji mikrosomalnych uzyskanych z drożdży pochodzących z pojedynczych kolonii komórkowych z transformowanych tych genem drożdży. Jako tło traktowano aktywność typu LPAAT mikrosomów uzyskanych z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. Substraty reakcji to: 18:1-LPA (kwas lizofosfatydowy) i  $[^{14}\text{C}]16:0\text{-CoA}$ . **a** – aktywność LPAAT’owa mierzona dla czterech różnych frakcji mikrosomalnych niosących enzym *PtLPAAT1*, **b** – aktywność LPAAT’owa mierzona dla czterech różnych frakcji mikrosomalnych niosących enzym *PtLPAAT2*, **c** – aktywność LPAAT’owa mierzona dla czterech różnych frakcji mikrosomalnych uzyskanych z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT (kontrola).

Wyniki przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT a aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J11916* lub gen *Phatr3\_J43099*. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \* -  $p \leq 0,05$ .

Analiza specyficzności substratowej enzymów *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* w stosunku do innych akceptorów kwasów tłuszczowych takich jak: *sn-1-18:1-LPE*, *sn-1-18:1-LPC*, *sn-1-18:1-LPG* i *sn-1-18:1-LPS* (dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno – jeden akceptor/jeden test) w kombinacji z [<sup>14</sup>C]16:0-CoA wykazała, że enzymy te charakteryzują się podwyższoną aktywnością nie tylko w testach z kwasem lizofosfatydowym (LPA) ale również w testach z lizofosfatydyloetanolaminą (LPE) czy w przypadku enzymu *PtLPAAT1* również w testach z lizofosfatydyloseryną (LPS). Jednakże aktywności uzyskiwane w tych testach były o wiele niższe (o ponad 90%) niż aktywności wykazywane przez te enzymy w testach z kwasem lizofosfatydowym, w związku z czym uznano, że główną funkcją enzymów *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* jest synteza kwasu fosfatydowego (PA). Porównując jednak aktywność LPEAT'ową czy LPSAT'ową enzymów *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* kodowanych przez geny pochodzące z *P. tricornutum* do aktywności uzyskanej w tego typu testach z mikrosomami kontrolnymi (aktywność w drożdżach  $\Delta ALE1$  endogennego enzymu Slc1) można odnotować, że enzym *PtLPAAT1* wykazał aktywność LPEAT'ową, wyższą od aktywności odnotowanej dla kontroli o około 122%, natomiast enzym *PtLPAAT2* wyższą o około 25%. Odnotowana podwyższona aktywność LPEAT'owa wykazywana przez *PtLPAAT1* była statystycznie istotna. Aktywność enzymatyczna typu LPSAT była wyższa (o około 43%) od aktywności tego typu uzyskanej dla kontroli jedynie w przypadku enzymu *PtLPAAT1* i nie była statystycznie istotna. Nie odnotowano natomiast, aby enzymy *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* wykazywały aktywność typu LPCAT czy LPGAT oraz aby enzym *PtLPAAT2* wykazywał aktywność typu LPSAT. Aktywności w tego typu testach były mniejsze od aktywności odnotowanych dla kontroli. Odnotowane aktywności typu LPCAT dla enzymów *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* były niższe od aktywności odnotowanej dla kontroli odpowiednio o około 28% i 55%; aktywności typu LPGAT odpowiednio o około 55% i 52%. Statystycznie istotna, była niższa aktywność typu LPGAT wykazywana przez mikrosomy niosące enzym *PtLPAAT1* oraz aktywność zarówno LPCAT jak i LPGAT wykazywana przez mikrosomy niosące enzym *PtLPAAT2*. Z kolei aktywność typu LPSAT odnotowana dla enzymu *PtLPAAT2* była niższa od aktywności odnotowanej dla kontroli o około 39% i nie była statystycznie istotna (Rys. 15). Wyniki te pokazują więc, że endogenna aktywność wykazywana przez Slc1 była modyfikowana przez przeprowadzone transformacje.



**Rys. 15.** Aktywność typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid) enzymu *PtLPAAT1* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916*) oraz enzymu *PtLPAAT2* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J43099*) w stosunku do czterech różnych lizofosfolipidów (akceptorów kwasów tłuszczowych; LPE-lizofosfatydyloetanolaminy, LPC-lizofosfatydylocholiny, LPG-lizofosfatydyloglicerolu, LPS-lizofosfatydyloseryny) dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno. Jako tło traktowano aktywność typu LPLAT enzymów obecnych w frakcjach mikrosomalnych uzyskanych z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. Jako donory reszt acylowych w omawianych testach, wykorzystano [ $^{14}\text{C}$ ]16:0-CoA.

Aktywność enzymu *PtLPAAT1* mierzono dla frakcji mikrosomalnej uzyskanej z drożdży pochodzących z pojedynczej kolonii komórkowej „3”, a enzymu *PtLPAAT2* z kolonii komórkowej „1”. Aktywność kontrolną zmierzono dla dwóch różnych frakcji mikrosomalnych (pYES2/CT.1 i pYES2/CT.3) i przedstawiono w postaci średniej. Wykres przedstawia uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT a aktywnością wykazywaną przez frakcje mikrosomalne z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowane plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J11916* lub *Phatr3\_J43099*. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\* -  $p \leq 0,01$ , \* -  $p \leq 0,05$ .

Kolejne badanie z zakresu specyficzności substratowej enzymów *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2*, dotyczyło przeanalizowania aktywności tych enzymów w stosunku do siedemnastu różnych donorów kwasów tłuszczowych, tj. tioestrów tych kwasów tłuszczowych z koenzymem A (acylo-CoA). Akceptorem kwasów tłuszczowych w tych testach był *sn-1*-[ $^{14}\text{C}$ ]18:1-LPA. Analiza ta wykazała znaczne różnice specyficzności, w stosunku do testowanych acylo-CoA, pomiędzy enzymem *PtLPAAT1* a *PtLPAAT2*. Dla lepszego zobrazowania faktycznej aktywności enzymatycznej wykazywanej przez

*PtLPAAT1* oraz *PtLPAAT2* w stosunku do poszczególnych acylo-CoA, dane przedstawiono na dwa sposoby. Rys. 16a przedstawia aktywność typu LPAAT we frakcjach mikrosomalnych pochodzących z drożdży transformowanych genami sklonowanymi z *P. tricornutum*, kodującymi badane enzymy, bez odjętej aktywności kontrolnej typu LPAAT (wykazywanej przez endogenną drożdżową acylotransferazę *Slc1*; na wykresie aktywność ta oznaczona jest, jako pYES2/CT). Natomiast Rys. 16b i Rys. 16c przedstawiają aktywności badanych enzymów (w stosunku do testowanych acylo-CoA) po odjęciu aktywności kontrolnej. Pomimo iż przeprowadzone transformacje mogły wpływać w pewien sposób również na aktywność typu LPAAT wykazywaną przez endogenne LPAAT – *Slc1*, wydaje się, że wyniki przedstawione na tych rysunkach oddają preferencje badanych enzymów w sposób najbardziej zbliżony do ich rzeczywistych preferencji w stosunku do różnych acylo-CoA.

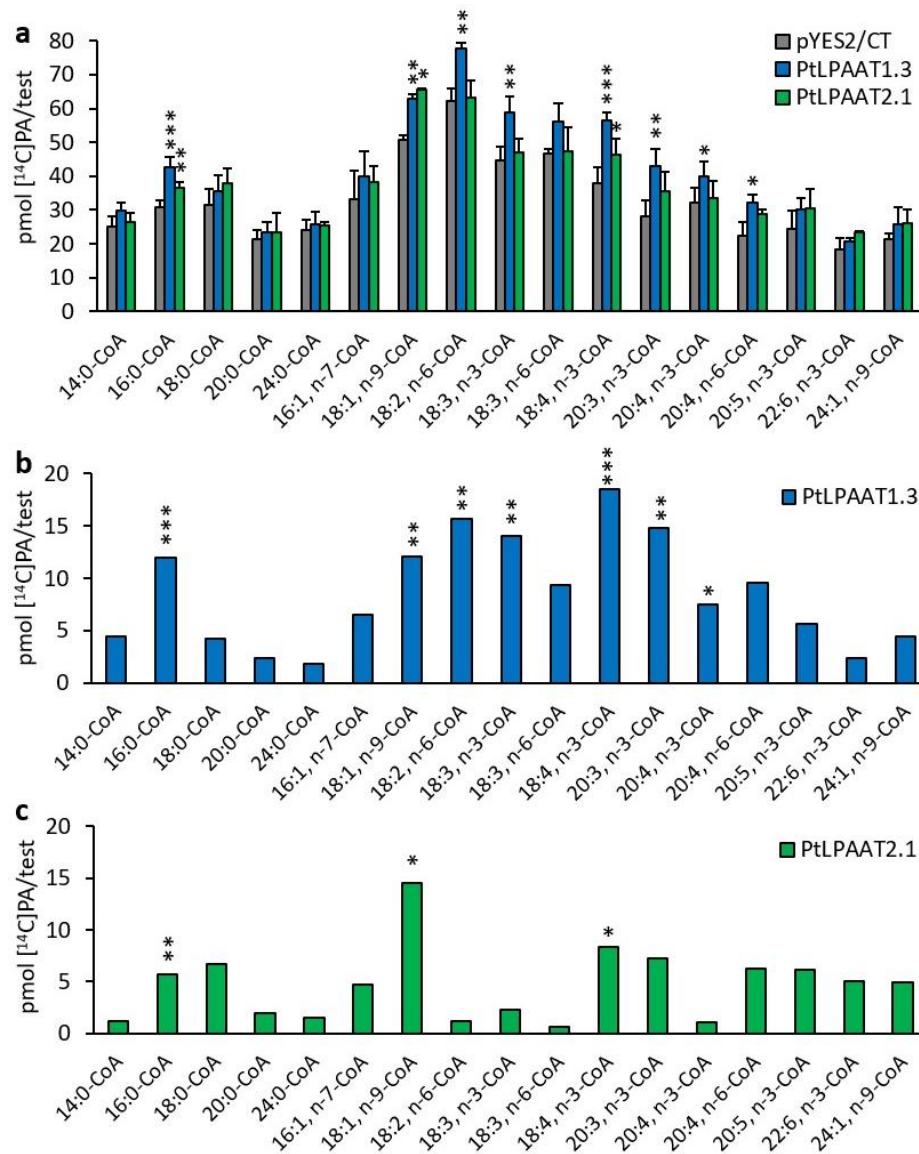
Po odjęciu aktywności kontrolnej typu LPAAT, enzym *PtLPAAT1* wykazywał najwyższą preferencję w stosunku do 18:4-CoA n-3. Preferencje *PtLPAAT1* w stosunku do pozostałych testowanych acylo-CoA, od najlepiej do najslabiej wykorzystywanych, przedstawiały się następująco: 18:2-CoA n-6, 20:3-CoA n-3, 18:3-CoA n-3, 18:1-CoA n-9, 16:0-CoA, 20:4-CoA n-6, 18:3-CoA n-6, 20:4-CoA n-3, 16:1-CoA n-7, 20:5-CoA n-3, 14:0-CoA, 24:1-CoA, 18:0-CoA, 22:6-CoA n-3, 20:0-CoA, 24:0-CoA. Aktywność badanego enzymu w stosunku do 18:2-CoA n-6, 20:3-CoA n-3, 18:3-CoA n-3 oscylowała pomiędzy 84% a 76% najwyższej aktywności odnotowanej w stosunku do 18:4-CoA n-3; zwiększona aktywność w porównaniu do kontroli wykazywana w testach z ich użyciem była we wszystkich trzech przypadkach statystycznie istotna. Z kolei aktywność *PtLPAAT1* wykazywana w testach z 18:1-CoA n-9, 16:0-CoA, 20:4-CoA n-6, 18:3-CoA n-6, 20:4-CoA n-3, 16:1-CoA n-7, 20:5-CoA n-3 wynosiła pomiędzy 65% a 30% aktywności odnotowanej do 18:4-CoA n-3; dla tej grupy donorów kwasów tłuszczowych aktywność enzymu *PtLPAAT1* była również statystycznie istotna oprócz testów z 16:1-CoA n-7 i 20:5-CoA n-3. Najniższą preferencję *PtLPAAT1* odnotowano w stosunku do 14:0-CoA, 24:1-CoA, 18:0-CoA, 22:6-CoA n-3, 20:0-CoA, 24:0-CoA. Aktywność typu LPAAT w testach z tymi acylo-CoA, wahała się pomiędzy 24% a 10% najwyższej aktywności odnotowanej w testach z 18:4-CoA n-3 i nie była statystycznie istotna (Rys. 16b).

Drugi badany enzym typu LPAAT (*PtLPAAT2*) wykazywał inne preferencje w stosunku do badanych donorów kwasów tłuszczowych. Najlepiej akceptowanym acylo-CoA był 18:1-CoA n-9, w stosunku do którego aktywność *PtLPAAT2* była statystycznie

istotna. Kolejnymi acylo-CoA (wymienione w kolejności malejącej, w stosunku do nich, preferencji enzymu *PtLPAAT2*) akceptowanymi przez enzym były: 18:4-CoA n-3, 20:3 n-3-CoA, 18:0-CoA, 20:4-CoA n-6, 20:5-CoA n-3, 16:0-CoA, 22:6-CoA n-3, 24:1-CoA, 16:1-CoA n-7, 18:3-CoA n-3, 20:0-CoA, 24:0-CoA, 18:2-CoA n-6, 14:0-CoA, 20:4-CoA n-3-CoA, 18:3-CoA n-6. Odnotowana aktywność *PtLPAAT2* w stosunku do 18:4-CoA n-3, 20:3 n-3-CoA, 18:0-CoA, 20:4-CoA n-6, 20:5-CoA n-3, 16:0-CoA, 22:6-CoA n-3, 24:1-CoA, 16:1-CoA n-7 oscylowała pomiędzy 57% a 33% najwyższej aktywności odnotowanej w testach z 18:1-CoA n-9; w tej grupie badanych acylo-CoA statystycznie istotną aktywność odnotowano jedynie w stosunku do 18:4-CoA n-3 i 16:0-CoA. Najniższą preferencję, *PtLPAAT2* wykazywał w stosunku do 18:3-CoA n-3, 20:0-CoA, 24:0-CoA, 18:2-CoA n-6, 14:0-CoA, 20:4-CoA n-3-CoA, 18:3-CoA n-6. Aktywność w testach z tymi acylo-CoA wahała się pomiędzy 16% a 5% aktywności odnotowanej w stosunku do 18:1-CoA n-9 i nie była statystycznie istotna (Rys. 16a i c).

Największe różnice w preferencjach w stosunku do donorów kwasów tłuszczowych (acylo-CoA) pomiędzy enzymami *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* dotyczyły takich acylo-CoA jak: 18:2-CoA n-6, 18:3-CoA n-3, 18:3-CoA n-6 i 20:4-CoA n-6. Aktywność enzymu *PtLPAAT2* w stosunku do tych donorów kwasów tłuszczowych stanowiła tylko około 7-17% aktywności enzymu *PtLPAAT1*. Aktywność tych dwóch enzymów była natomiast podobna w stosunku do 20:5-CoA n-3, 24:1-CoA n-9, 20:0-CoA, 24:0-CoA (wymienione w kolejności od najbardziej do najmniej preferowanych).





**Rys. 16.** Aktywność typu LPAAT enzymu *PtLPAAT1* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916*) oraz *PtLPAAT2* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J43099*) w stosunku do *sn-1*-[<sup>14</sup>C]18:1-LPA oraz siedemnastu różnych donorów kwasów tłuszczowych (acylo-CoA). Jako „tło” traktowano aktywność typu LPAAT mikrosomów uzyskanych z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. **a** – wykres przedstawiający specyficzność substratową badanych enzymów typu LPAAT bez odjętej aktywności „tła”, którą przedstawiono w postaci szarego słupka, **b** – wykres przedstawiający specyficzność substratową enzymu *PtLPAAT1* po odjęciu aktywności „tła”, **c** – wykres przedstawiający specyficzność substratową enzymu typu *PtLPAAT2* po odjęciu aktywności „tła”.

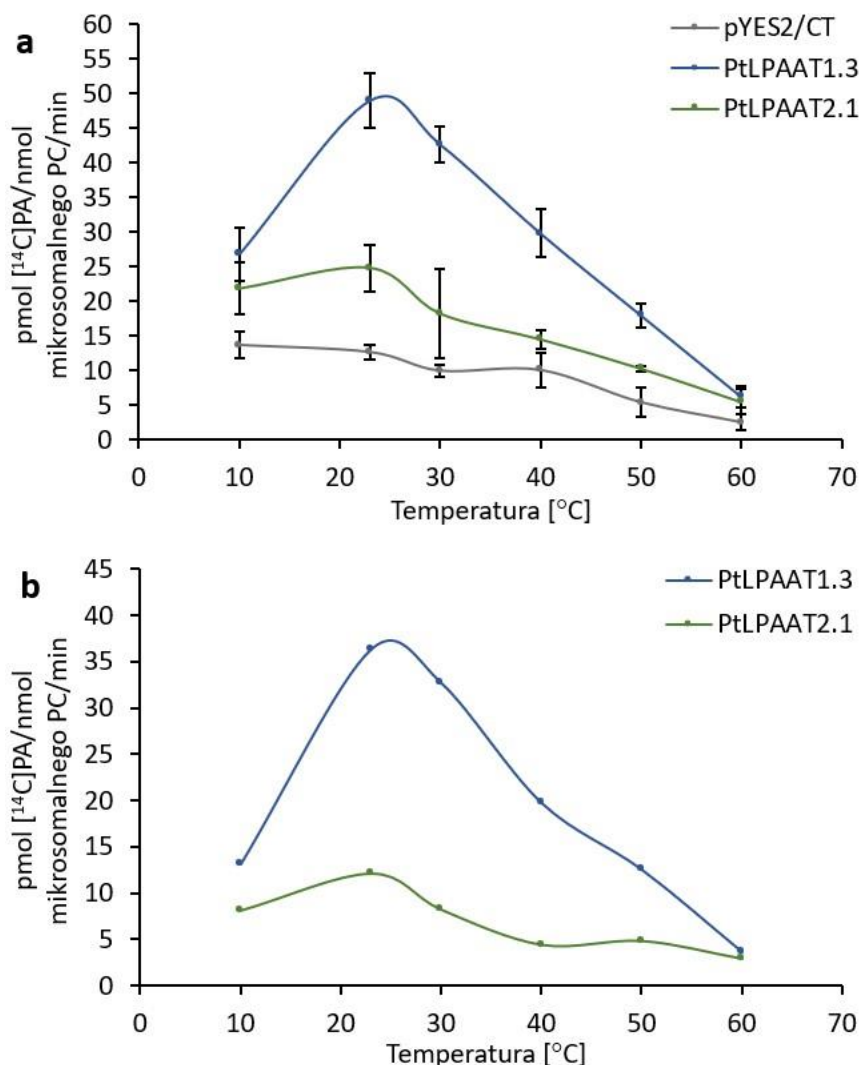
Aktywność enzymu *PtLPAAT1* mierzono dla frakcji mikrosomalnej uzyskanej z drożdży pochodzących z pojedynczej kolonii komórkowej „3”, a enzymu *PtLPAAT2* z kolonii komórkowej „1” (60 min reakcje przeprowadzane w 23°C). Aktywność kontrolną zmierzono dla frakcji mikrosomalnej pYES2/CT.4. Wyniki

przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością dla mikrosomów z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT a aktywnością dla mikrosomów z drożdży *ΔALE1* transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J11916* lub *Phatr3\_J43099*, w stosunku do konkretnego acylo-CoA. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\*\* -  $p \leq 0,001$ , \*\* -  $p \leq 0,01$ , \* -  $p \leq 0,05$ . Oprócz powyższego rysunku, aktywność enzymów z tych testów przedstawiono w pmol [<sup>14</sup>C]PA/nmol mikrosomalnego PC/min na Rys. A1.

#### **4.2.2. Wpływ różnych parametrów reakcji na aktywność enzymów LPAAT (acylotransferaza acylo-CoA:kwasy lizofosfatydowy) kodowanych przez geny *Phatr3\_J11916* oraz *Phatr3\_J43099* sklonowane z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum***

Do badanych czynników zewnętrznych mogących mieć wpływ na aktywność typu LPAAT enzymów *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* należała temperatura. W przeprowadzonych testach badano jej wpływ na aktywność tych enzymów w zakresie od 10 do 60 °C. Odnotowane wyniki wykazały, że enzymy te różnią się między sobą w odpowiedzi na zmianę temperatury reakcji. Dodatkowo zmiany w aktywności badanych enzymów typu LPAAT pochodzących z *P. tricornutum* różniły się od zmian w aktywności kontrolnej *Slc1* (testy z frakcją mikrosomalną z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT) w swojej odpowiedzi na zmiany temperatury reakcji. Mikrosomy kontrolne wykazywały najwyższą aktywność w temperaturze 10 °C. Podwyższenie tej temperatury do 23 °C powodowało jednak tylko nieznaczny spadek ich aktywności typu LPAAT; odnotowano około 7% jej spadek. Dalsze zwiększenie temperatury reakcji do 30 °C wywoływało już mocniejszy spadek ich aktywności – o około 27% w stosunku do najwyższej aktywności odnotowanej w 10 °C. Kolejne podniesienie temperatury reakcji do 40 °C nie wpłynęło na aktywność endogennej *Slc1*; aktywność ta utrzymywała się na podobnym poziomie jak w temperaturze 30 °C. W temperaturze 50 i 60 °C aktywność kontrolna intensywnie spadała odpowiednio o około 60 i 82% w porównaniu do najwyższej aktywności odnotowanej dla 10 °C. Zśród trzech badanych enzymów typu LPAAT, enzym *PtLPAAT1* wykazał najmocniejszą odpowiedź na zmianę temperatury reakcji. Jego aktywność podwoiła się przy zmianie temperatury z 10 °C na 23 °C i osiągnęła w tej temperaturze maksymalną wartość. Dalsze podwyższanie temperatury do 30 °C, 40 °C, 50 °C i 60 °C powodowało stopniowe zmniejszanie się aktywności *PtLPAAT1* odpowiednio o około 13, 39, 63 i 87% najwyższej aktywności odnotowanej w temperaturze 23 °C. Aktywność enzymu *PtLPAAT2* zmieniała się w zakresie

temperatury od 10 °C do 60 °C w nieco podobny sposób jak aktywność enzymu *PtLPAAT1*. Główna różnica polegała na mniej drastycznym wzroście aktywności enzymu *PtLPAAT2* w zakresie temperatury 10 °C a 23 °C (wzrost aktywności wynosił tylko 12%). Omówione powyżej wyniki przedstawione zostały na Rys. 17a i 17b. Pierwszy z nich przedstawia wpływ temperatury na aktywność typu LPAAT enzymów zawartych w badanych frakcjach mikrosomalnych tj. uzyskanych z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT (aktywność „tła”) oraz transformowanych plazmidami pYES2/CT niosącymi gen kodujący *PtLPAAT1* lub *PtLPAAT2*. Drugi zaś wpływ temperatury na aktywność *PtLPAAT1* oraz *PtLPAAT2* (od aktywności uzyskanej w testach z mikrosomami z drożdży transformowanych genami kodującymi te enzymy odejmowano aktywność „tła”).



**Rys. 17.** Wpływ temperatury na aktywność LPAAT’ową enzymów *PtLPAAT1* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916*) oraz *PtLPAAT2* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J43099*). Jako tło traktowano aktywność typu LPAAT mikrosomów uzyskanych z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. Substraty reakcji to kwas lizofosfatydowy i  $[^{14}\text{C}]16:0\text{-CoA}$ . **a** – wykres przedstawiający wpływ temperatury na aktywność typu LPAAT enzymów zawartych w badanych frakcjach mikrosomalnych bez odjętej aktywności „tła”, **b** – wykres przedstawiający wpływ temperatury na aktywność *PtLPAAT1* oraz *PtLPAAT2* po odjęciu aktywności „tła”.

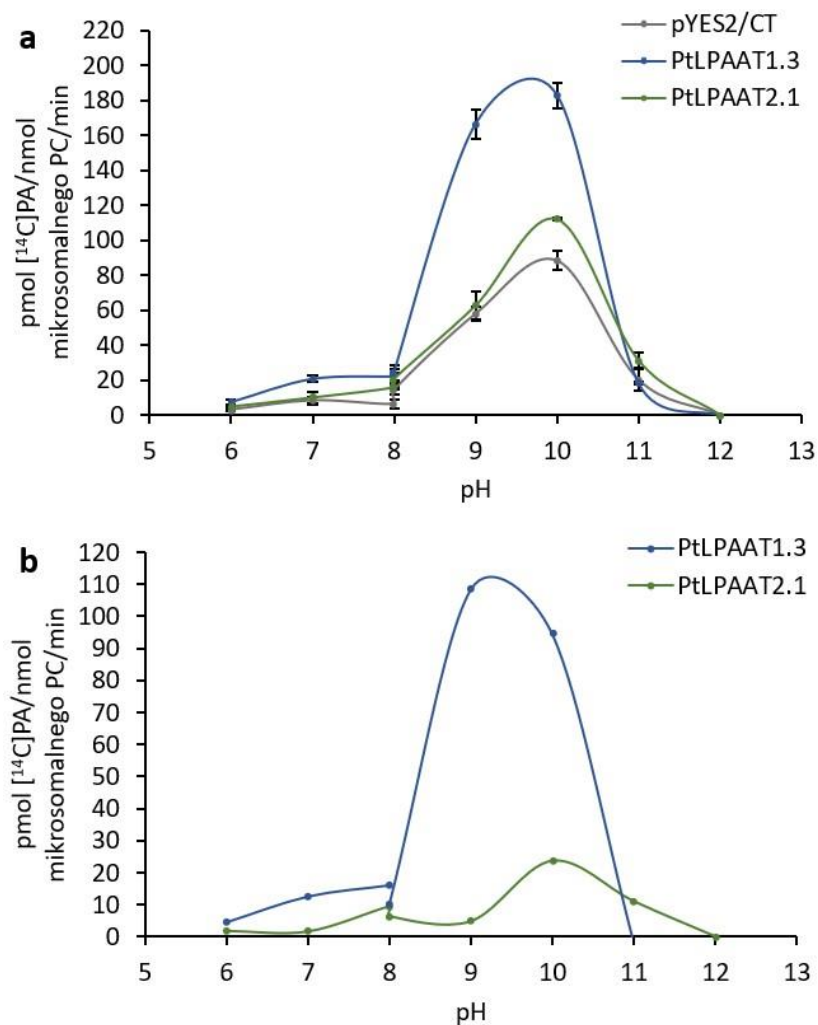
Aktywność enzymu *PtLPAAT1* mierzono dla frakcji mikrosomalnej uzyskanej z drożdży pochodzących z pojedynczej kolonii komórkowej „3”, a enzymu *PtLPAAT2* z kolonii komórkowej „1” (60 min reakcje). Aktywność kontrolną zmierzono dla dwóch różnych frakcji mikrosomalnych (pYES2/CT.1 i pYES2/CT.3) i przedstawiono w postaci średniej. Wykres „a” przedstawia uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowym, a wykres „b” różnice w średniej aktywności uzyskanej w testach z mikrosomami niosącymi badane enzymy i średniej aktywności kontrolnej.

Kolejnym z testowanych czynników zewnętrznych mogących mieć wpływ na aktywność typu LPAAT badanych enzymów było pH buforów inkubacyjnych. Testy enzymatyczne dotyczące wpływu pH na aktywność badanych enzymów: Slc1 (kontrola; drożdżowa acylotransferaza typu acylo-CoA:kw. lizofosfatydowy), *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2*, przeprowadzono z wykorzystaniem następujących buforów: 0,1 M bufor fosforanowy (pH 6,0-7,0); 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0 – 10,0); 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH (pH 11,0) i 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH (pH 12,0). Badane enzymy typu LPAAT pochodzące z *Phaeodactylum tricornutum* reagowały w odmienny sposób na zmianę pH buforu inkubacyjnego. Enzym *PtLPAAT1* wykazał bardzo niską aktywność przy pH 6,0. Wraz ze wzrostem pH buforu fosforanowego (inkubacyjnego) aktywność tego enzymu zaczęła powoli wrastać i przy pH 8,0 była około 3,5 razy wyższa od tej odnotowanej przy pH 6,0. Przy zmianie buforu fosforanowego o pH 8,0 na bufor Tris-HCl o pH 8,0, aktywność enzymu *PtLPAAT1* obniżyła się o około 35%. Podwyższenie pH buforu Tris-HCl do 9,0 spowodowało gwałtowny skok aktywności *PtLPAAT1*. Badany enzym wykazywał wtedy maksymalną aktywność, która była około 10 razy wyższa niż aktywność uzyskana przy pH 8,0 w buforze Tris-HCl. Dalszy wzrost pH buforu Tris-HCl spowodował spadek aktywności *PtLPAAT1*. W przypadku pH 10,0 spadek był nieduży i wynosił około 13% maksymalnej aktywności przy pH 9,0. Następnie *PtLPAAT1* zaczął gwałtownie tracić swoją aktywność tak, że przy pH 11,0 (NaHCO<sub>3</sub>-NaOH) i 12,0 (bufor Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH) enzym stracił całkowicie swoją aktywność typu LPAAT.

Drugi badany enzym, *PtLPAAT2*, również miał bardzo niską aktywność przy pH 6,0. Aktywność tego enzymu pozostała na bardzo niskim poziomie także przy pH 7,0. Dopiero przy pH 8,0 aktywność *PtLPAAT2* była około 5,5 razy wyższa niż aktywność przy pH 6,0. Zmiana buforu fosforanowego o pH 8,0 na bufor Tris-HCl o tym samym pH, spowodowała spadek aktywności o około 32%. Wzrost pH buforu Tris-HCl do 9,0 wywołał kolejne obniżenie aktywności *PtLPAAT2*, która spadła do około połowy aktywności odnotowanej przy pH 8,0 w buforze fosforanowym. Enzym *PtLPAAT2* wykazywał najwyższą aktywność przy pH 10,0 (bufor Tris-HCl), która była około 5 razy wyższa niż aktywność przy pH 9,0 (i o około 2,5 razy wyższa niż aktywność przy pH 8,0 w buforze fosforanowym). Gdy do testów wykorzystano bufor NaHCO<sub>3</sub>-NaOH o pH 11,0, aktywność enzymu *PtLPAAT2* zmniejszyła się około dwa razy. Natomiast przy wykorzystaniu buforu Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH o pH 12,0, enzym *PtLPAAT2* nie wykazywał aktywności typu LPAAT. Enzym *PtLPAAT1* w większości przypadków wykazywał

wyższą aktywność niż *PtLPAAT2*. Porównując ze sobą maksymalne aktywności tych dwóch enzymów, aktywność *PtLPAAT1* była około 4,5 razy wyższa (Rys. 18b).

Aktywność typu LPAAT drożdżowej acylotransferazy *Slc1* przy pH 6,0 była niska, podobnie jak w przypadku LPAAT-ów pochodzących z *Phaeodactylum tricornutum*. Następnie, kontrolna aktywność *Slc1* wzrosła przy pH 7,0 i wynosiła około 180% aktywności odnotowanej dla tego enzymu przy pH 6,0. Przy pH 8,0 aktywność drożdżowej acylotransferazy *Slc1* spadła o około 23% w porównaniu do aktywności przy pH 7,0. Zmiana buforu fosforanowego o pH 8,0 na bufor Tris-HCl o pH 8,0 spowodowała podwojenie się aktywności *Slc1*. Dalsza alkalizacja środowiska reakcji do pH 10,0 wywołała dość nagły wzrost aktywności enzymu *Slc1*, który osiągnął maksymalną wartość w tym pH, podobnie jak enzym *PtLPAAT2*. Aktywność enzymu *Slc1* była wtedy około 6 razy wyższa niż jego aktywność przy pH 8,0 (bufor Tris-HCl). W kolejnym buforze  $\text{NaHCO}_3\text{-NaOH}$  o pH 11,0 aktywność *Slc1* zaczęła raptownie spadać; wynosiła około 79% maksymalnej aktywności tego enzymu. Z kolei bufor  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$  o pH 12,0 wywołał zanik aktywności drożdżowej acylotransferazy *Slc1* (Rys. 18a).



**Rys. 18.** Wpływ pH buforu inkubacyjnego na aktywność LPAAT’ową enzymów *PtLPAAT1* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916*) oraz *PtLPAAT2* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J43099*). Jako tło traktowano aktywność typu LPAAT mikrosomów uzyskanych z drożdży delecyjnych *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. Substraty reakcji to kwas lizofosfatydowy i [<sup>14</sup>C]16:0-CoA. **a** – wykres przedstawiający wpływ pH na aktywność typu LPAAT enzymów zawartych w badanych frakcjach mikrosomalnych bez odjętej aktywności „tła”, **b** – wykres przedstawiający wpływ pH na aktywność *PtLPAAT1* oraz *PtLPAAT2* po odjęciu aktywności „tła”.

Do przeprowadzenia testu użyto cztery bufony o różnym pH: 0,1 M bufor fosforanowy (pH 6,0-7,0); 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0 – 10,0); 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH (pH 11,0) i 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH (pH 12,0). Aktywność enzymu *PtLPAAT1* mierzono dla frakcji mikrosomalnej uzyskanej z drożdży pochodzących z pojedynczej kolonii komórkowej „3”, a enzymu *PtLPAAT2* z kolonii komórkowej „1” (60 min reakcje przeprowadzane w 23°C). Aktywność kontrolną zmierzono dla dwóch różnych frakcji mikrosomalnych (pYES2/CT.3 i pYES2/CT.4) i przedstawiono w postaci średniej. Na wykresie „a” zaprezentowano uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowym, a na wykresie „b” różnice w średniej aktywności uzyskanej w testach z mikrosomami niosącymi badane enzymy i średniej aktywności kontrolnej.

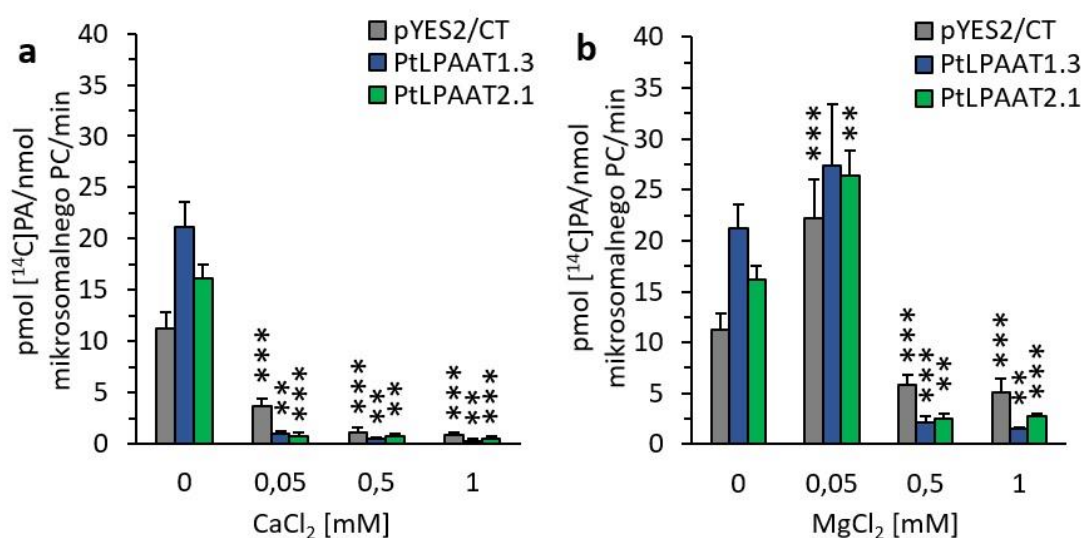
Ostatnim z badanych czynników zewnętrznych mogących modyfikować aktywność badanych enzymów (Slc1, *PtLPAAT1* oraz *PtLPAAT2*) było określenie wpływu jonów wapnia oraz magnezu na tą aktywność. Do tego typu testów enzymatycznych użyto 0,1 M bufor HEPES (pH 7,2) ze względu na słabą rozpuszczalność jonów magnezowych oraz wapniowych w buforze fosforanowym. Oprócz reakcji, w których wykorzystywano bufor HEPES z dodatkiem odpowiednich jonów w różnych stężeniach (0,05 mM; 0,5 mM; 1 mM), dodatkowo przeprowadzono reakcje enzymatyczne w środowisku buforu HEPES bez dodatku jonów. Wyniki tych testów traktowano, jako kontrolę.

Przeprowadzone testy wykazały, że obecność jonów wapnia w mieszaninie reakcyjnej wpływała hamująco na aktywność zarówno enzymów LPAAT pochodzących z *P. tricornutum*, jak i endogennego enzymu Slc1 obecnego we frakcjach mikrosomalnych z drożdży kontrolnych (drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT). Dodatek jonów wapnia już w niewielkim stężeniu wynoszącym 0,05 mM, powodował mocny spadek aktywności badanych enzymów, przy czym spadek aktywności *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* był bardziej drastyczny (wynosił około 95%) niż spadek aktywności drożdżowego enzymu Slc1 (którego aktywność obniżyła się o około 68%). Zwiększanie stężenia jonów wapnia do 0,5 oraz 1 mM prowadziło do pogłębienia inhibicji aktywności endogennego enzymu Slc1 (obecnego w kontrolnych frakcjach mikrosomalnych) do około 10% aktywności kontrolnej (bez dodatku jonów wapnia), z kolei aktywność enzymów typu LPAAT pochodzących z *P. tricornutum* utrzymywała się na podobnie niskim poziomie. Hamujący wpływ jonów wapnia na aktywność badanych enzymów typu LPAAT był statystycznie wysoko istotny lub statystycznie bardzo wysoko istotny przy wszystkich trzech badanych stężeniach tych jonów (Rys. 19a).

Wpływ jonów magnezu na aktywność badanych enzymów typu LPAAT był już nieco inny, gdyż dodanie tych jonów w stężeniu 0,05 mM do mieszaniny reakcyjnej stymulowało aktywność wszystkich tych enzymów. Przy tym stężeniu jonów magnezu aktywność endogennego enzymu Slc1 drożdży była około dwa razy większa w porównaniu do jego aktywności odnotowanej w testach bez dodatku jonów. Podwyższenie aktywności enzymów *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* przy tym stężeniu jonów magnezu (0,05 mM) było natomiast nieco niższe i wynosiło około 30% i około 63% odpowiednio. Przy wyższych stężeniach (0,5 mM; 1 mM) jony magnezu wywoływały już jednak hamujący wpływ na aktywność badanych enzymów (Slc1 -endogenna drożdżowa acylotransferaza typu acylo-CoA:kwask lizofosfatydowy, *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2*). Spadek



aktywności tych enzymów wynosił odpowiednio około 48%, 90% i 85% przy stężeniu 0,5 mM jonów magnezu. Zwiększenie stężenia jonów magnezu do 1 mM nie spowodowało znacniejszego pogłębienia inhibicji aktywności badanych enzymów; aktywności te plasowały się raczej na tym samym poziomie jak aktywności badanych enzymów przy stężeniu 0,5 mM jonów magnezu. Wpływ jonów magnezu na aktywność badanych enzymów typu LPAAT był statystycznie wysoko istotny bądź statystycznie bardzo wysoko istotny we wszystkich badanych przypadkach z wyjątkiem wpływu tych jonów w stężeniu 0,05 mM na enzym *PtLPAATT1*, przy którym odnotowano podwyższoną aktywność tego enzymu, lecz nie była to statycznie istotna zmiana (Rys. 19b).



**Rys. 19.** Wpływ jonów wapnia oraz magnezu na aktywność typu LPAAT enzymów *PtLPAAT1* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916*) oraz *PtLPAAT2* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J43099*) oraz aktywność *Slc1* – endogennego drożdżowego enzymu typu LPAAT (testy z mikrosomami z drożdży delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT). **a** – wpływ jonów wapnia, **b** – wpływ jonów magnezu. Substraty reakcji to kwas lizofosfatydowy i  $[^{14}\text{C}]16:0\text{-CoA}$ .

Aktywność enzymu *PtLPAAT1* mierzono dla frakcji mikrosomalnej uzyskanej z drożdży pochodzących z pojedynczej kolonii komórkowej „3”, a enzymu *PtLPAAT2* z kolonii komórkowej „1” (60 min reakcje przeprowadzane w 23°C). Aktywność kontrolną zmierzono dla dwóch różnych frakcji mikrosomalnych (pYES2/CT.3 i pYES2/CT.4) i przedstawiono w postaci średniej. Na wykresie zaprezentowano uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością w testach bez dodatku jonów (kontrola), a aktywnością w testach z dodatkiem badanego stężenia jonów. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\*\* -  $p \leq 0,001$ , \*\* -  $p \leq 0,01$ .

### **4.3. Charakterystyka reakcji enzymatycznych *in vitro* typu *forward* katalizowanych przez enzym LPCAT (acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum***

Wstępne badania opisane w rozdziale 4.1.5., dotyczące enzymu „F” kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* pozwoliły na jasne określenie charakteru jego aktywności i zaliczenie go do enzymów typu LPCAT (acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) co było dalej podstawą do nadania mu nazwy *PtLPCAT1*. Natomiast wyniki badań zawartych w niniejszym rozdziale przedstawiają aktywność enzymu *PtLPCAT1* przy zmieniających się parametrach reakcji oraz aktywność i specyficzność substratową tego enzymu w stosunku do różnych donorów i akceptorów kwasów tłuszczowych jak i preferencję w stosunku do pozycji *sn-1* i *sn-2* lizofosfatydylocholina w reakcjach typu *forward*. Dodatkowo zbadano specyficzność substratową enzymów typu LPCAT z nasion *C. sativa* w stosunku do różnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, w celu porównania ze sobą roślinnych i okrzemkowych enzymów typu LPCAT w zakresie wykazywanych przez nie specyficzności substratowych.

#### **4.3.1. Optymalizacja reakcji enzymatycznych *in vitro* katalizowanych przez enzym LPCAT (acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum***

Pierwsze testy z zakresu badań nad optymalnymi parametrami reakcji enzymatycznych *in vitro* katalizowanych przez *PtLPCAT1* rozpoczęto od ustalenia optymalnego stężenia frakcji mikrosomalnej będącej źródłem badanego enzymu. Badany enzym wykazywał najwyższą aktywność w testach, do których dodawano porcje frakcji mikrosomalnej zawierające 0,05 nmol mikrosomalnego PC. W związku z tym kolejne reakcje enzymatyczne typu *forward* katalizowane przez *PtLPCAT1* przeprowadzano z dodatkiem porcji mikrosomów zawierających 0,05 nmol endogennego PC. Zmniejszenie ilości mikrosomów do 0,02 nmol mikrosomalnego PC powodowało nieznaczny spadek aktywności enzymu; o około 5%. Podobnie, nieduży spadek aktywności miał miejsce, gdy zwiększono ilość mikrosomów do 0,1 nmol mikrosomalnego PC. Spadek aktywności (wyliczanej, jako ilość syntetyzowanego *de novo* PC/min/nmol mikrosomalnego PC) w tym przypadku wynosił około 7%. Dalsze zwiększanie ilości frakcji mikrosomalnej do 0,5 nmol, 1 nmol i 2 nmol endogennego PC/ test, powodowało postępujące obniżanie się aktywności do odpowiednio 41%, 20% i 10% maksymalnego jej poziomu odnotowanego

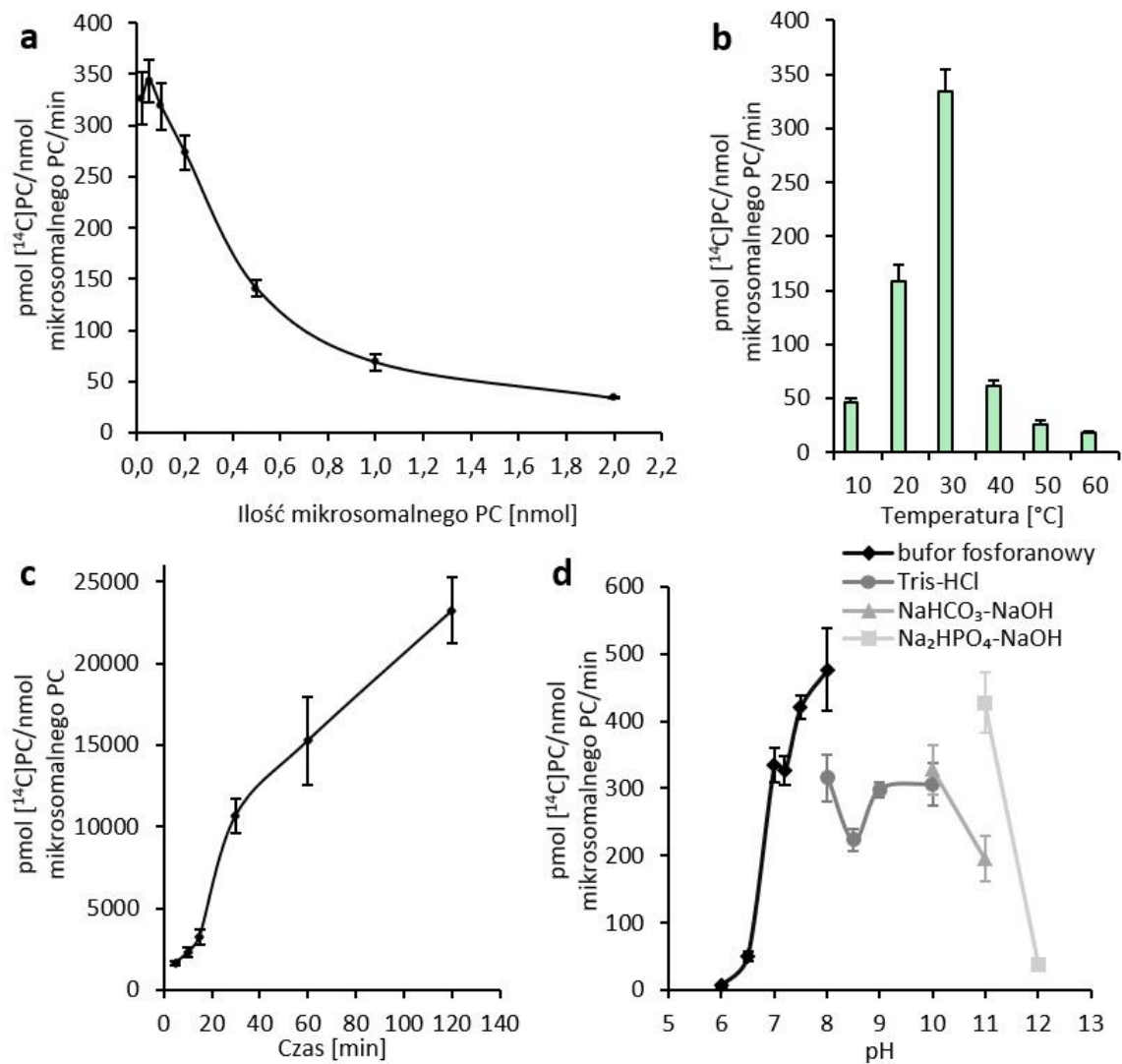
w testach z porcjami frakcji mikrosomalnej zawierającymi 0,05 nmol mikrosomalnego PC (Rys. 20a).

Następne badania miały na celu zweryfikowanie wpływu czasu reakcji na aktywność enzymu *PtLPCAT1*. Reakcja katalizowana przez ten enzym przebiegała bardzo szybko w pierwszych 5 minutach inkubacji, następnie w kolejnych 10 minutach inkubacji ulegała spowolnieniu i wracała do aktywności zbliżonej do tej z pierwszych 5 min w kolejnych 15 min inkubacji (pomiędzy 15 a 30 minutą inkubacji). Po 30 minutach inkubacji aktywność testowanego *PtLPCAT1* znowu zmniejszała się do aktywności zbliżonej do tej odnotowanej pomiędzy 5 a 15 min reakcji. Pomiędzy 30 a 120 minutą inkubacji reakcja przebiegała jednakże prawie liniowo. Wahania szybkości reakcji w pierwszych 30 minutach inkubacji mogły być skutkiem zmian w dostępności substratu i/lub zmian w strukturze membran wykorzystywanych frakcji mikrosomalnych. Sumarycznie, aktywność *PtLPCAT1* w tym okresie czasu była jednak najwyższa, dlatego też w kolejnych testach dotyczących zarówno optymalizacji reakcji i określania specyficzności substratowej *PtLPCAT1*, reakcje prowadzono przez okres 30 minut (Rys. 20c).

Kolejnym badanym parametrem reakcji była temperatura. Zmiana temperatury reakcji w zakresie 10-60 °C miała znaczący wpływ na aktywność enzymu *PtLPCAT1*. Najwyższą aktywność odnotowano w 30 °C, w związku z czym uznano ją jako optymalną do dalszych badań. Obniżenie temperatury do 20 °C spowodowało spadek aktywności do około 47% jej maksymalnego poziomu. Jeszcze znaczniejszy spadek aktywności miał miejsce gdy podwyższono temperaturę reakcji do 40 °C. W tej temperaturze reakcji aktywność *PtLPCAT1*, zmniejszyła się o około 82% w porównaniu do aktywności maksymalnej odnotowanej w temperaturze w 30 °C. Aktywność w testach przeprowadzonych w 10 °C wynosiła około 12% aktywności maksymalnej, z kolei w temperaturze 50 °C i 60 °C wynosiła już tylko kilka procent tej aktywności (Rys. 20b).

Do badania wpływu pH na aktywność enzymu *PtLPCAT1* użyto cztery bufony o różnym zakresie pH: 0,1 M bufor fosforanowy (pH 6,0 – 8,0); 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0 – 10,0); 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH (pH 10,0 – 11,0) i 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH (pH 11,0 – 12,0). Enzym *PtLPCAT1* wykazywał bardzo niską, wręcz śladową aktywność przy pH 6,0. Niedużo wyższą aktywność odnotowano przy pH 6,5. Podwyższenie pH do 7,0 powodowało natomiast silny skok aktywności, która była około 7 razy wyższa od tej odnotowanej dla pH 6,5. Najwyższą aktywność uzyskano przy pH 8,0 przy zastosowaniu buforu fosforanowego. Zamiana buforu fosforanowego na Tris-HCl o pH 8,0, powodowała

zaś obniżenie aktywności o około 34%. Z kolei dalsze podwyższenie pH do 8,5 powodowało spadek aktywności; o około 30% w porównaniu do aktywności uzyskanej przy zastosowaniu buforu Tris-HCl o pH 8,0. Dalszy wzrost pH do 9,0 powodował ponowny wzrost aktywności enzymu *PtLPCAT1* do wartości uzyskanej przy pH 8,0. Aktywność ta utrzymywała się na tym samym poziomie również przy pH 10,0. Zamiana buforu Tris-HCl na NaHCO<sub>3</sub>-NaOH o pH 10,0 nie powodowała zmiany w aktywności badanego enzymu *PtLPCAT1*. Podwyższenie pH do 11,0 przy zastosowaniu tego buforu, powodowało zaś obniżenie aktywności enzymu *PtLPCAT1* do około 41% aktywności maksymalnej uzyskanej przy pH 8,0 (przy zastosowaniu buforu fosforanowego). Zamiana buforu NaHCO<sub>3</sub>-NaOH o pH 11 na bufor Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH również o pH 11,0 wywoływała wzrost aktywności *PtLPCAT1*; do około 90% maksymalnej aktywności. Należy, więc tu rozważać inny niż sama wartość pH wpływ zastosowanych buforów na aktywność badanego enzymu. Dalsza alkalizacja środowiska reakcji (pH 12,0; bufor Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH) powodowała drastyczny spadek aktywności testowanego enzymu (do poziomu nawet niższego niż odnotowywanego przy pH 6,5). Pomimo tego, że enzym *PtLPCAT1* wykazał najwyższą aktywność przy pH 8,0, do dalszych testów wybraliśmy pH 7,2 jako optymalne, ponieważ jest ono najbliższe temu, które istnieje w komórkach okrzemkowych (Rys. 20d).

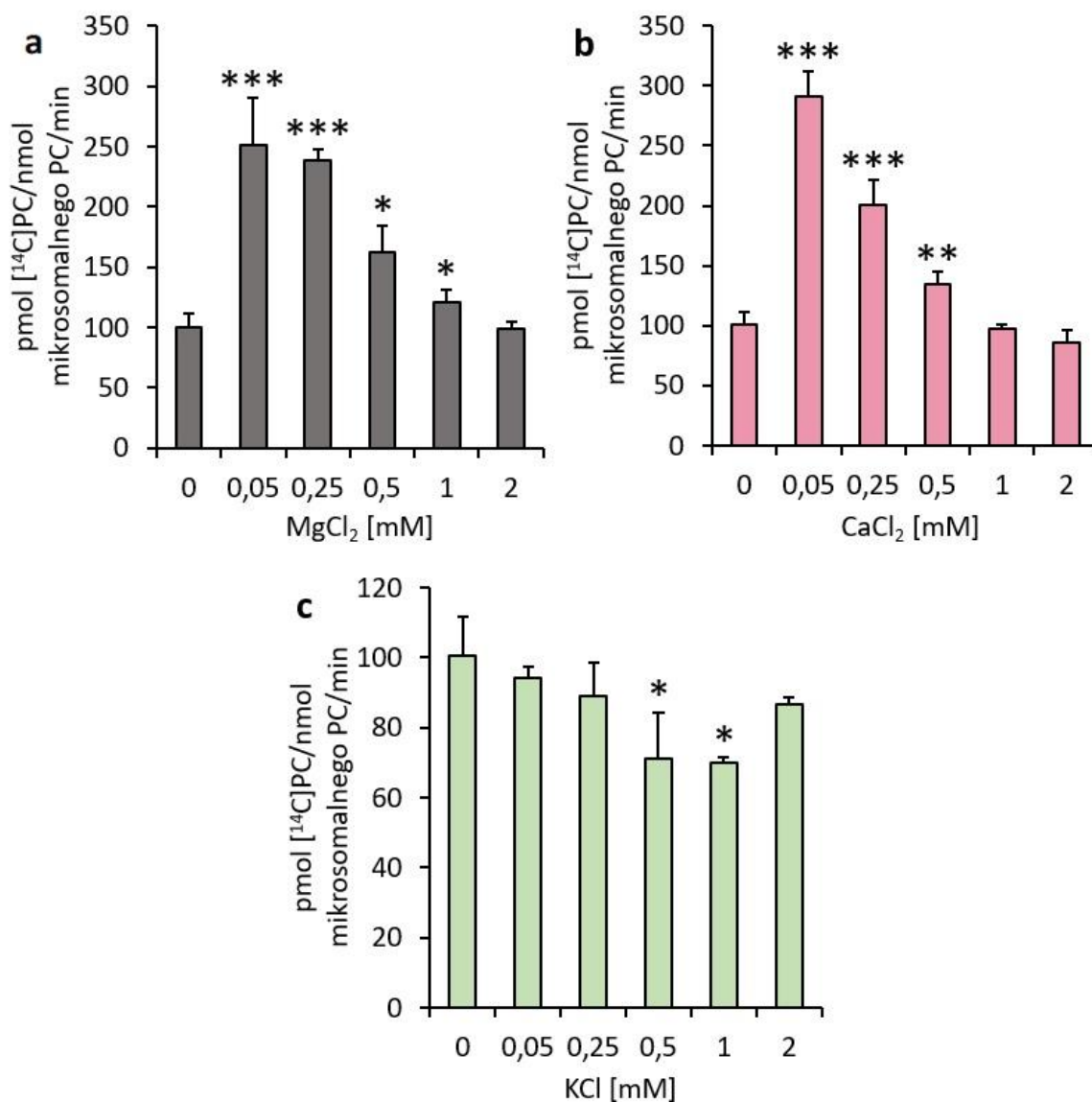


**Rys. 20.** Wpływ różnych parametrów reakcji na aktywność enzymu *PtLPCAT1* kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*; **a** –zależność od zawartości frakcji mikrosomalnej, **b** –zależność od temperatury reakcji, **c** – zależność od czasu reakcji, **d** –zależność od pH buforu inkubacyjnego.

Źródłem enzymu w testach były porcje frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z komórek drożdżowych *ALE1* transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460*. Oprócz testów których wyniki przedstawiono na panelu „a” w pozostałych testach wykorzystywano porcje frakcji mikrosomalnych zawierające 0,05 nmol endogennego PC. Na wykresach przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym.

Aktywność enzymu *PtLPCAT1* była również regulowana przez jony  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  i  $K^+$  (Rys. 21). Do testów sprawdzających wpływ badanych jonów wykorzystywany był jako bufor inkubacyjny 0,1 M bufor HEPES (pH 7,2), który pozwalał na dobre

rozpuszczenie soli magnezowych oraz wapniowych; sole te w buforze fosforanowym wytrącają się. Obecność jonów magnezu oraz jonów wapnia w buforze inkubacyjnym w stężeniu 0,05 mM powodowała silny wzrost aktywności badanego enzymu; odpowiednio o 151% i 191%, w porównaniu do testów bez dodatku jonów. Stopniowe zwiększanie stężenia jonów magnezu i wapnia w mieszaninie reakcyjnej w zakresie 0,25-2,0 mM wywoływało postępujące osłabienie stymulującego efektu tych jonów na aktywność enzymu *PtLPCAT1*. Podwyższenie stężenia jonów magnezu do 0,25 mM zmniejszyło tylko o 5% ich efekt stymulujący zaobserwowany przy najniższym badanym stężeniu. Natomiast w przypadku jonów wapnia podwyższenie ich stężenia do 0,25 mM wywierało już mocniejszy spadek aktywności wynoszący 31%, w porównaniu do aktywności uzyskiwanej przy stężeniu 0,05 mM. Dodanie jonów magnezu do testów w najwyższym badanym stężeniu wynoszącym 2,0 mM powodowało zanik ich stymulującego wpływu na aktywność *PtLPCAT1*, występującego przy niższych stężeniach tego jonu. W przypadku jonów wapnia ich dodatek do mieszaniny reakcyjnej już w stężeniu 1,0 mM powodował zanik ich stymulującego wpływu obserwowanego przy niższych stężeniach. Dalsze zwiększenie stężenia jonów wapnia do 2 mM wywoływało już hamujący wpływ na aktywność *PtLPCAT1*, (o około 14% w porównaniu do aktywności uzyskanej w testach bez dodatku jonów) jednakże statystycznie nieistotny (Rys. 21a, b). W testach w których badano wpływ jonów potasu, aktywność *PtLPCAT1* była lekko hamowana przy wszystkich badanych stężeniach tych jonów. Statystycznie istotny efekt hamowania aktywności odnotowano jednakże tylko dla dwu stężeń tego jonu: 0,5 mM (gdzie efekt hamowania był najwyższy i wynosił około 29% w porównaniu do kontroli) i 1,0 mM. Podwyższenie stężenia jonów potasu do 2 mM zmniejszało obserwowany efekt hamowania występujący przy dwu poprzednich stężeniach (Rys. 21c).



**Rys. 21.** Wpływ różnych jonów na aktywność enzymu *PtLPCAT1* kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricorutum*; **a** – wpływ jonów magnezu, **b** – wpływ jonów wapnia, **c** – wpływ jonów potasu.

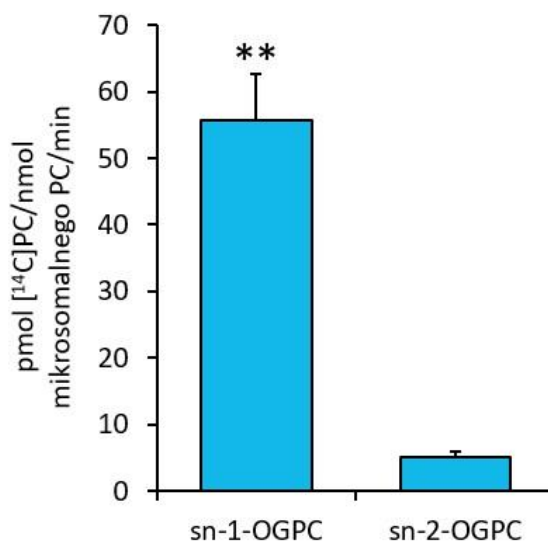
Źródłem enzymu w testach były porcje frakcji mikrosomalnych (zawierające 0,05 nmol endogenego PC) wyizolowanych z komórek drożdżowych *ΔALE1* transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460*. Na wykresach przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością w testach bez dodatku jonów (kontrola), a aktywnością w testach z dodatkiem badanego stężenia jonów. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\*\* -  $p \leq 0,001$ , \*\* -  $p \leq 0,01$ , \* -  $p \leq 0,05$ .

#### **4.3.2. Specyficzność substratowa enzymu LPCAT (acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornerutum***

Kolejne badanie dotyczyło specyficzności enzymu *PtLPCAT1* w stosunku do pozycji *sn-1* i *sn-2* lizofosfatydylocholiny. Do testów tych wykorzystano eterowy analog *sn-1-18:1-LPC* (*sn-1-18:1-O-GPC*) oraz eterowy analog *sn-2-18:1-LPC* (*sn-2-18:1-O-GPC*). Donorem grup acylowych w tych testach był zaś [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Testy te nie mogły być wykonane z wykorzystaniem izomerów lizofosfatydylocholiny (LPC) z estrowo przyłączonym kwasem tłuszczowym, jako że izomer *sn-2-LPC* jest niestabilny i kwas tłuszczowy z tej pozycji spontanicznie migruje do pozycji *sn-1*, dając w rezultacie mieszaninę *sn-1-LPC* i *sn-2-LPC*. Tego problemu nie ma z eterowymi analogami LPC, dlatego przy ich użyciu możliwe było badanie specyficzności testowanego *PtLPCAT1* w stosunku do obu izomerów LPC. Wykorzystywanie eterowych analogów lizofosfatydylocholiny do określenia specyficzności enzymów typu LPCAT w stosunku do pozycji *sn-1-LPC* i *sn-2-LPC* było wykorzystywane także w badaniach innych zespołów (Lager i wsp., 2013).

Przeprowadzone badania wykazały, że badany enzym *PtLPCAT1* ma zdolność do acylacji zarówno pozycji *sn-1* jak i *sn-2* eterowych analogów lizofosfatydylocholiny, jednakże wydajność katalizowanej przez niego reakcji była około 11 razy wyższa w testach z eterowymi analogami *sn-1-LPC* (acylowana jest pozycja *sn-2*) w porównaniu do aktywności w testach z eterowymi analogami *sn-2-LPC* gdzie acylowana była pozycja *sn-1* (Rys. 22). Zakładamy więc, że podobne preferencje enzym ten wykazuje również w stosunku do estrowych odpowiedników *sn-1-LPC* i *sn-2-LPC*.



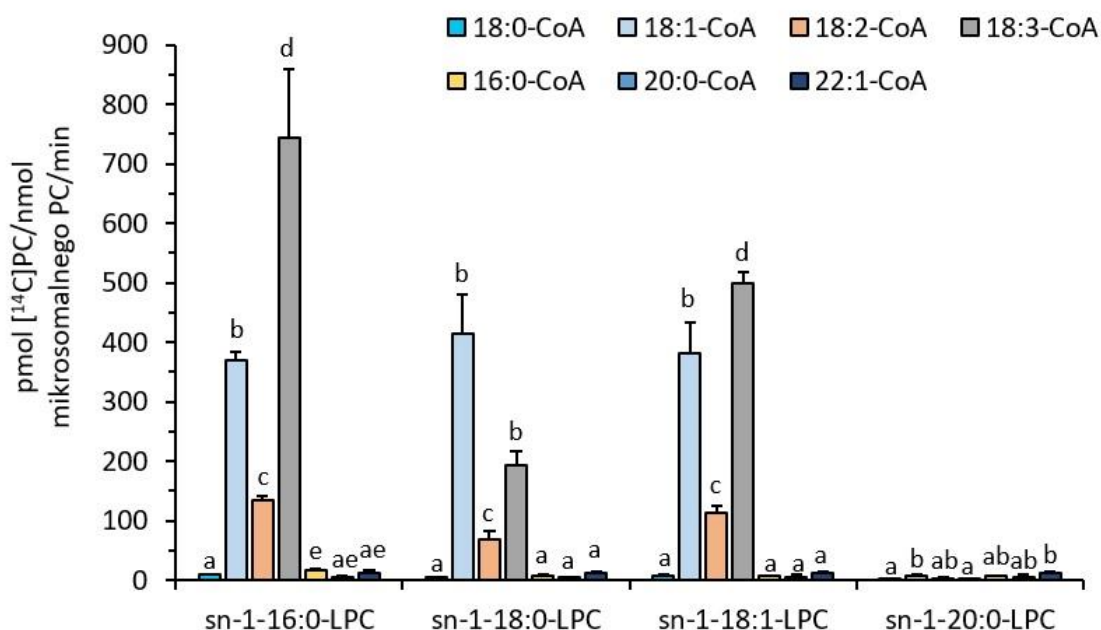


**Rys. 22.** Aktywność enzymu *PtLPCAT* kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* w stosunku do dwóch eterowych analogów akceptorów kwasów tłuszczowych: *sn-1-18:1-O-GPC* (analog lizofosfatydylocholiny–*sn-1-18:1-LPC*) oraz *sn-2-18:1-O-GPC* (analog lizofosfatydylocholiny–*sn-2-18:1-LPC*).

Źródłem enzymu w testach były porcje frakcji mikrosomalnych (zawierające 0,05 nmol endogennego PC) wyizolowanych z komórek drożdżowych  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460*. Na wykresach przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością wykazywaną w testach z *sn-1-O-GPC* i [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA, a aktywnością wykazywaną w testach z *sn-2-O-GPC* i [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\* -  $p \leq 0,01$ .

Kolejny etap badań dotyczył określenia preferencji w wykorzystywaniu przez enzym *PtLPCAT1* różnych „gatunków” lizofosfatydylocholiny (LPC), tj. LPC z różnymi kwasami tłuszczowymi w pozycji *sn-1*. W testach wykorzystano cztery „gatunki” lizofosfatydylocholiny: *sn-1-16:0-LPC*, *sn-1-18:0-LPC*, *sn-1-18:1-LPC* i *sn-1-20:0-LPC*. W badaniach wykorzystywano kombinacje każdego z testowanych „gatunków” LPC z siedmioma różnymi acylo-CoA tj. z: [ $^{14}\text{C}$ ]18:0-CoA, [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA, [ $^{14}\text{C}$ ]18:2-CoA, [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA, [ $^{14}\text{C}$ ]16:0-CoA, [ $^{14}\text{C}$ ]20:0-CoA oraz [ $^{14}\text{C}$ ]22:1-CoA. Z pośród czterech testowanych „gatunków” LPC tylko *sn-1-20:0-LPC* praktycznie nie było akceptowane przez badany enzym. Aktywność w testach z wykorzystaniem tego „gatunku” LPC z wszystkimi siedmioma testowanymi acylo-CoA była na bardzo niskim poziomie (Rys. 23). Aktywność typu LPCAT w testach z pozostałymi trzema „gatunkami” LPC zależała

od zastosowanego w teście acylo-CoA. Stosunkowo wysoką aktywność (zależną jednak w pewnym stopniu od wykorzystywanego LPC) uzyskiwano w testach z acylo-CoA zawierającymi nienasycony kwas tłuszczowy tj. 18:1-CoA, 18:2-CoA i 18:3-CoA. W testach z pozostałymi acylo-CoA tj z 18:0-CoA, 16:0-CoA, 20:0-CoA i 22:1-CoA aktywność ta była stosunkowo niska, porównywalna do tej uzyskiwanej w testach wykorzystujących *sn-1-20:0-LPC* jako akceptor kwasów tłuszczowych. Aktywność w testach z 18:1-CoA była najmniej zależna od zastosowanego LPC; jej poziom nie różnił się statystycznie pomiędzy trzema wspomnianymi wcześniej „gatunkami” LPC wykorzystywanymi w testach. Wykorzystywanie 18:3-CoA było zaś najbardziej zależne od zastosowanego „gatunku” LPC. W testach z *sn-1-16:0-LPC* było najwyższe (około 200% aktywności w porównaniu do testów z 18:1-CoA), a w testach z *sn-1-18:0-LPC* najniższe (około 50% aktywności w porównaniu do testów z 18:1-CoA). W testach z *sn-1-18:1-LPC*, 18:3-CoA wykorzystywany był o około 25% lepiej niż 18:1-CoA (Rys. 23). 18:2-CoA wykorzystywany był podobnie w testach z *sn-1-16:0-LPC* i *sn-1-18:1-LPC*. Aktywność w tych testach wynosiła około 32-35% aktywności odnotowywanej w testach z wykorzystaniem 18:1-CoA. Aktywność w testach z wykorzystaniem *sn-1-18:0-LPC* i 18:2-CoA wynosiła zaś około 17% aktywności odnotowywanej w testach z wykorzystaniem 18:1-CoA (Rys. 23).

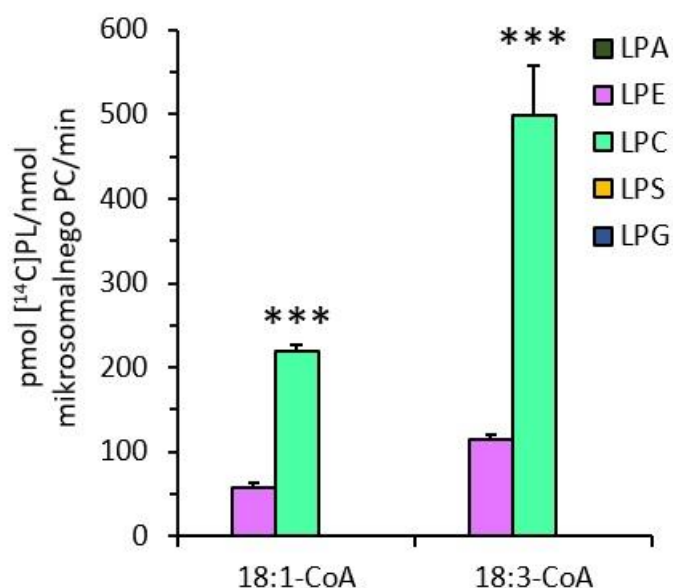


**Rys. 23.** Aktywność enzymu *PtLPCAT1* kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* w testach z czterema różnymi cząsteczkami lizofosfatydylocholiny w kombinacji z siedmioma różnymi [<sup>14</sup>C]acylo-CoA.

Źródłem enzymu w testach były porcje frakcji mikrosomalnych (zawierające 0,05 nmol endogenego PC) wyizolowanych z komórek drożdżowych *ΔALE1* transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460*. Na wykresach przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu post-hoc (test Tukeya). Różne litery oznaczają istotność statystyczną ( $p \leq 0,05$ ) pomiędzy przeprowadzonymi testami.

Kolejnym rodzajem testów charakteryzujących badany enzym były analizy dotyczące specyficzności substratowej *PtLPCAT1* w stosunku do różnych akceptorów kwasów tłuszczowych (*sn-1-18:1-LPA*, *sn-1-18:1-LPE*, *sn-1-18:1-LPC*, *sn-1-18:1-LPG* i *sn-1-18:1-LPS*), dodawanych do mieszanin reakcyjnych oddzielnie (jeden akceptor/jeden test). Testy te potwierdziły, że enzym *PtLPCAT1* wykazuje najwyższą preferencję w stosunku do lizofosfatydylocholiny zarówno gdy zastosowanym w testach donorem kwasów tłuszczowych był [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, jak i [<sup>14</sup>C]18:3-CoA. Przy czym aktywność *PtLPCAT1* w testach z [<sup>14</sup>C]18:3-CoA była o około 2,5 razy większa niż aktywność odnotowana w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Aktywność badanego enzymu *PtLPCAT1* w stosunku do lizofosfatydyloetanoloaminy była również stosunkowo wysoka i wynosiła około 24%-25% aktywności odnotowanej w testach z udziałem lizofosfatydylocholiny; zarówno w testach z wykorzystaniem [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, jak i [<sup>14</sup>C]18:3-CoA. Aktywność

*PtLPCAT1* w testach z pozostałymi lizofosfolipidami (LPA – kwas lizofosfatydowy, LPG – lizofosfatydyloglicerol i LPS – lizofosfatydyloseryny) była natomiast śladowa (Rys. 24).

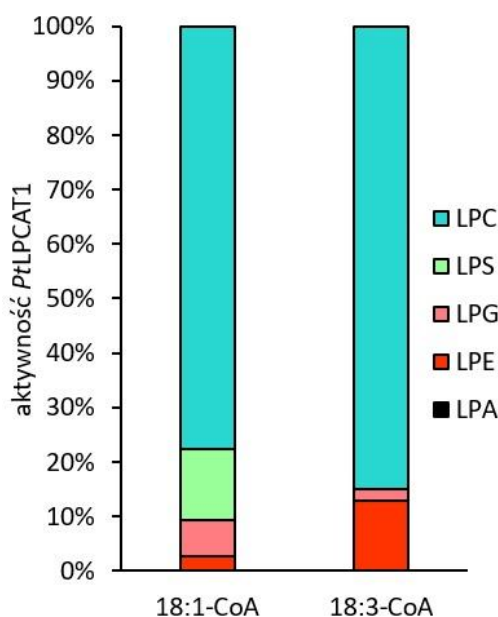


**Rys. 24.** Aktywność enzymu *PtLPCAT1* kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* w stosunku do pięciu różnych lizofosfolipidów (akceptorów kwasów tłuszczowych) w testach, w których dodawane były do mieszanin reakcyjnych osobno. Zastosowanym donorem grup acylowych był [<sup>14</sup>C]18:1-CoA lub [<sup>14</sup>C]18:3-CoA.

Źródłem enzymu w testach były porcje frakcji mikrosomalnych (zawierające 0,05 nmol endogenego PC) wyizolowanych z komórek drożdżowych *ΔALE1* transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460*. Na wykresach przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością w stosunku do LPE a LPC w testach dla konkretnego donora kwasów tłuszczowych ([<sup>14</sup>C]18:1-CoA lub [<sup>14</sup>C]18:3-CoA). Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\*\* -  $p \leq 0,001$ .

Kontynuacją powyżej opisanych analiz były testy selektywności substratowej w stosunku do lizofosfolipidów wykorzystywanych w powyżej opisanych badaniach. W testach tych do każdej z mieszanin reakcyjnych dodawano wszystkie pięć badanych lizofosfolipidów: LPA, LPE, LPG, LPC, LPS (każdy wymieniony lizofosfolipid posiadał przyłączoną resztę acylową - 18:1 - w pozycji *sn*-1), w ilościach 5-cio krotnie niższych niż w powyżej opisanych testach określających preferencje *PtLPCAT1* w testach z osobnym zastosowaniem każdego z nich. W ten sposób zostało zachowane całkowite stężenie

lizofosfolipidów/test. Zastosowanymi w tych testach donorami acyli były [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA bądź [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA (tak jak w testach opisanych powyżej). Wyniki tych testów wykazały, że *PtLPCAT1* najefektywniej przyłączał reszty kwasów tłuszczowych do lizofosfatydylocholiny, niezależnie od tego który z dwóch zastosowanych acylo-CoA był obecny w mieszaninie reakcyjnej (Rys. 25). Wyniki te były więc podobne do tych uzyskanych we wcześniejszych eksperymentach dotyczących specyficzności substratowej *PtLPCAT1* w stosunku do różnych lizofosfolipidów (akceptorów kwasów tłuszczowych) dodawanych osobno do mieszaniny reakcyjnej (Rys. 24). Ilość wyprodukowanej *de novo* [ $^{14}\text{C}$ ]PC wynosiła około 73% wszystkich zsyntetyzowanych *de novo* fosfolipidów w testach z [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA, natomiast w testach z [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA ilość ta oscylowała w granicach 85%. Wykorzystanie pozostałych LPL przez badany enzym do syntezy odpowiednich [ $^{14}\text{C}$ ]PL zależało w pewnym stopniu od rodzaju dodanego acylo-CoA do testów. Gdy w mieszaninie reakcyjnej był obecny [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA, enzym *PtLPCAT1* syntetyzował [ $^{14}\text{C}$ ]PE i [ $^{14}\text{C}$ ]PG odpowiednio w ilości około 13% i 2% wszystkich zsyntetyzowanych *de novo* [ $^{14}\text{C}$ ]PL. Z kolei w testach z dodatkiem [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA następowała produkcja [ $^{14}\text{C}$ ]PS, [ $^{14}\text{C}$ ]PE i [ $^{14}\text{C}$ ]PG odpowiednio w ilości 13, 9 i 5%. Produkcja [ $^{14}\text{C}$ ]PA była natomiast na tym samym poziomie, zarówno w testach z wykorzystaniem [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA jak i [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA, co produkcja tego fosfolipidu w testach z wykorzystaniem kontrolnych frakcji mikrosomalnych (wyizolowanych z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT; Rys. 25).

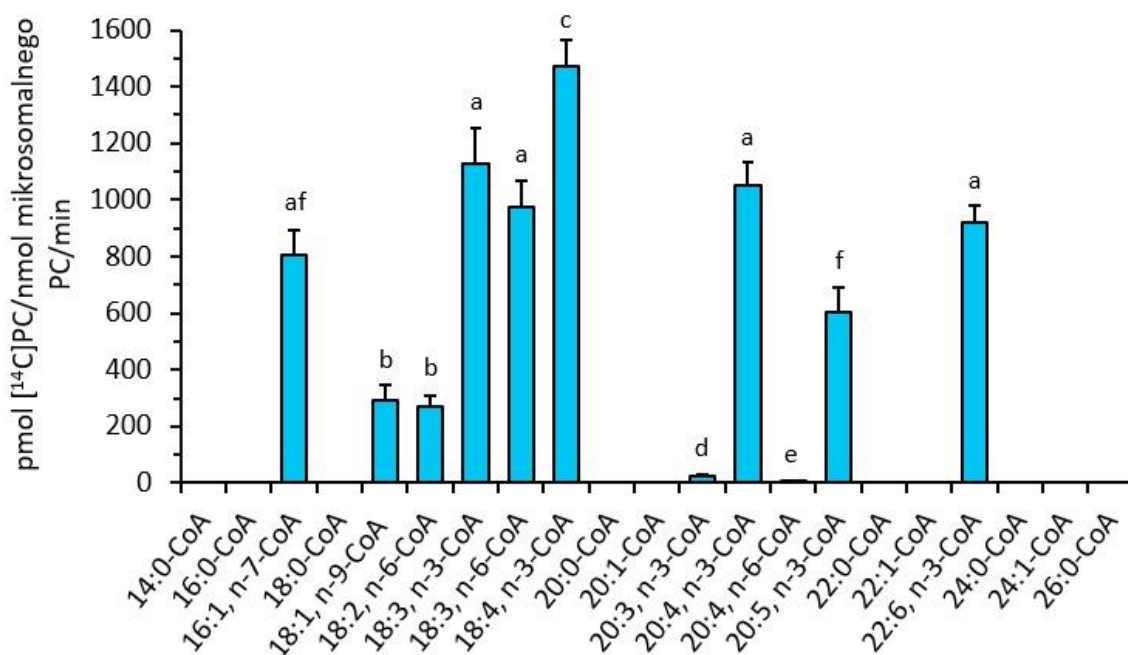


**Rys. 25.** Aktywność enzymu *PtLPCAT1* kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornerutum* w stosunku do pięciu różnych lizofosfolipidów (akceptorów kwasów tłuszczowych) dodawanych razem do mieszaniny reakcyjnej w równo molowym stężeniu w połączeniu z [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA lub [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA (donory kwasów tłuszczowych).

Źródłem enzymu w testach były porcje frakcji mikrosomalnych (zawierające 0,05 nmol endogennego PC) wyizolowanych z komórek drożdżowych  $\Delta\text{ALE1}$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460*. Na wykresach przedstawiono wartości średnie z co najmniej trzech powtórzeń.

Po ustaleniu preferencji badanego enzymu w stosunku do lizofosfolipidów, w kolejnych testach analizowano jego specyficzność w stosunku do różnych acylo-CoA. W testach tych, jako akceptor kwasów tłuszczowych wykorzystywano *sn*-1-[ $^{14}\text{C}$ ]18:1-LPC, a jako donory kwasów tłuszczowych dwadzieścia jeden nie znakowanych acylo-CoA. Uzyskane wyniki wykazały wysoką aktywność badanego enzymu *PtLPCAT1* w szczególności do nienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 ze szlaku biosyntezy kwasu dokozaheksaenowego (DHA, 22:6<sup>A4,7,10,13,16,19</sup>). Najlepiej wykorzystywanym donorem kwasów tłuszczowych przez *PtLPCAT1* był 18:4-CoA n-3. Kolejne acylo-CoA wymienione w kolejności odpowiadającej malejącej aktywności to: 18:3-CoA n-3, 20:4-CoA n-3, 18:3-CoA n-6, 22:6-CoA n-3, 16:1-CoA n-7, 20:5-CoA n-3, 18:1-CoA n-9, 18:2-CoA n-6. Aktywność badanego enzymu w stosunku do 18:3-CoA n-3, 20:4-CoA n-3, 18:3-CoA n-6, 22:6-CoA n-3 i 16:1-CoA n-7 oscylowała pomiędzy 55% a 77% najwyższej aktywności odnotowanej w stosunku do 18:4-CoA n-3. Z kolei aktywność *PtLPCAT1*

w stosunku do 20:5-CoA n-3, 18:1-CoA n-9, 18:2-CoA n-6 wahała się pomiędzy 18% i 41% aktywności odnotowanej w stosunku do 18:4-CoA n-3. Badany enzym wykazywał natomiast bardzo niską aktywność w stosunku do 20:3-CoA n-3 i 20:4-CoA n-6. Enzym *PtLPCAT1* wykazał śladową aktywność, wręcz równą zero w stosunku do nasyconych kwasów tłuszczowych (14:0-CoA, 16:0-CoA, 18:0-CoA, 20:0-CoA, 22:0-CoA, 24:0-CoA, 26:0-CoA) oraz 20:1-CoA, 22:1-CoA i 24:1-CoA (Rys. 26).

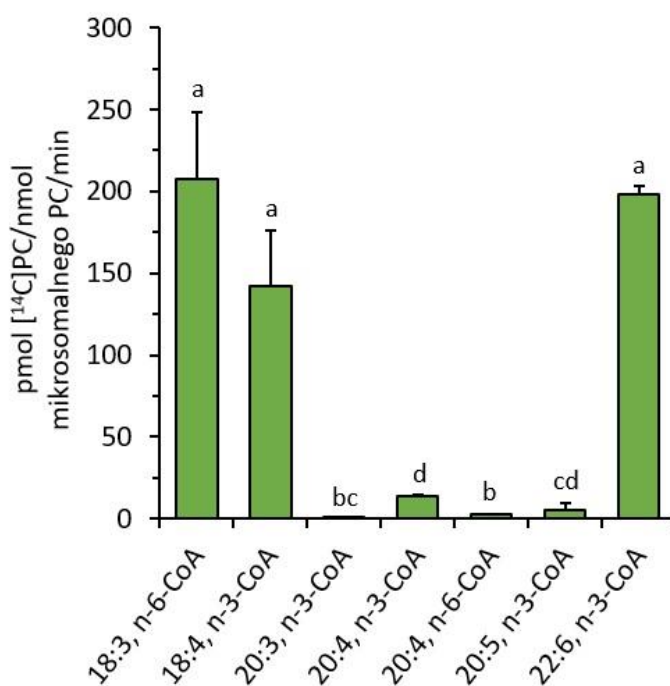


**Rys. 26.** Aktywność enzymu *PtLPCAT1* kodowanego przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum* w stosunku do *sn-1*-[<sup>14</sup>C]18:1-LPC oraz dwudziestu jeden różnych donorów kwasów tłuszczowych (acylo-CoA).

Źródłem enzymu w testach były porcje frakcji mikrosomalnych (zawierające 0,05 nmol endogenego PC) wyizolowanych z komórek drożdżowych *ΔALE1* transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460*. Na wykresach przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu post-hoc (test Tukeya). Różne litery oznaczają istotność statystyczną ( $p \leq 0,05$ ) pomiędzy przeprowadzonymi testami.

Aby porównać specyficzność substratową badanego enzymu LPCAT pochodzącego z *P. tricornutum* z enzymami typu LPCAT pochodzącymi z roślin przeprowadzono analizę specyficzności substratowej enzymów typu LPCAT obecnych we frakcji mikrosomalnej z nasion *C. sativa*. Jako substraty reakcji użyto: *sn-1*-[<sup>14</sup>C]18:1-LPC (akceptor kwasów tłuszczowych) oraz jednego z siedmiu różnych acylo-CoA (donor kwasów tłuszczowych) zawierających wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Wyniki testów

enzymatycznych *in vitro* wykazały, że enzymy typu LPCAT zawarte we frakcjach mikrosomalnych z nasion *C. sativa* dobrze akceptują acylo-CoA zawierające kwasy tłuszczowe takie jak: 18:3 n-6, 18:4 n-3 oraz 22:6 n-3. Wymienione powyżej acylo-CoA były akceptowane przez enzymy typu LPCAT z nasion *C. sativa* z podobną efektywnością jak 18:1-CoA n-9, 18:2-CoA n-6 i 18:3-CoA n-3 w testach przeprowadzonych przez dr Sylwię Klińską (Klińska i wsp., 2019) na tych samych mikrosomach co testy przeprowadzone w niniejszej pracy. Z drugiej strony aktywność LPCAT’owa dla mikrosomów z nasion *C. sativa* była już bardzo niska w stosunku do acylo-CoA zawierających 20-węglowe kwasy tłuszczowe (20:3 n-3, 20:4 n-3, 20:4 n-6, 20:5 n-3; Rys. 27).



**Rys. 27.** Aktywność enzymów typu LPCAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) obecnych we frakcji mikrosomalnej z nasion *C. sativa* w stosunku do *sn*-1-[<sup>14</sup>C]18:1-LPC oraz różnych donorów nienasyconych kwasów tłuszczowych (acylo-CoA).

Źródłem enzymu w testach były porcje frakcji mikrosomalnych (zawierające 0,2 nmol endogenego PC) wyizolowanych z rozwijających się nasion *C. sativa* w 24 dniu od rozpoczęcia kwitnienia. Na wykresach przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu post-hoc (test Tukeya). Różne litery oznaczają istotność statystyczną ( $p \leq 0,05$ ) pomiędzy przeprowadzonymi testami.



#### **4.4. Remodelowania *in vitro* fosfolipidów, w tym głównie fosfatydylocholiny, badanych frakcji mikrosomalnych w reakcjach katalizowanych przez enzym *PtLPCAT* - acylotransferazę acylo-CoA:lizofosfatydylocholina kodowaną przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum***

Po scharakteryzowaniu reakcji typu *forward* katalizowanych przez enzym *PtLPCAT1* przystąpiono do badania aktywności oraz specyficzności substratowej tego enzymu w reakcjach typu *backward*. Reakcja typu *backward* to reakcja, w której acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT) odłącza resztę acylową od fosfolipidu, którą następnie przenosi na koenzym A. W wyniku tej reakcji tworzy się cytoplazmatyczne acylo-CoA oraz odpowiedni lizofosfolipid. Mieszanki reakcyjne wykorzystywane do badania reakcji *backward* nie zawierają egzogennych lizofosfolipidów, tak więc w reakcjach *forward* zachodzących w czasie trwania tych testów wykorzystywane są jedynie endogenne lizofosfolipidy, głównie te powstające w czasie przeprowadzanych inkubacji. Reakcje enzymatyczne *in vitro* mające na celu zbadanie aktywności enzymów *PtLPCAT* w reakcjach typu *backward* prowadzono w niniejszej pracy w dwóch wariantach: bez dodatku DTNB i z jego dodatkiem. W testach bez dodatku DTNB, zapewnione były warunki dla zachodzenia reakcji *backward* katalizowanej przez badany enzym *PtLPCAT1*. W wyniku tej reakcji powstawała lizofosfatydylocholina (w mniejszym stopniu mogły powstawać również inne lizo-fosfolipidy np. LPA lub LPE). Ze względu na to, że enzymy typu LPLAT katalizują reakcje w obu kierunkach, enzym *PtLPCAT1* wykorzystywał następnie lizofosfolipidy obecne/powstałe w czasie trwania testu (w tym te powstałe w reakcji *backward* katalizowanej przez mikrosomalne LPLATy) oraz dodawane do mieszaniny reakcyjnej [<sup>14</sup>C]acylo-CoA do katalizowania reakcji *forward*. W drugim wariantcie testu, dodany DTNB hamował reakcje *backward* katalizowane głównie przez *PtLPCAT1* poprzez „blokowanie” grupy tiolowej (-SH) koenzymu A w wyniku tworzenia z nią wiązania kowalencyjnego. W testach z dodatkiem DTNB, powstający produkt - [<sup>14</sup>C]PC - był więc wynikiem katalizowania reakcji *forward* przez *PtLPCAT1* przy wykorzystaniu innych LPC niż tych powstałych w wyniku reakcji *backward* katalizowanej przez enzymy typu LPLAT obecne w badanych frakcjach mikrosomalnych. W testach tych, cząsteczki LPC mogły powstawać w wyniku reakcji katalizowanych przez fosfolipazy czy enzym PDAT jak również w wyniku lipazowej aktywności wykazywanej przez LPLATy obecne w badanych frakcjach mikrosomalnych, w tym głównie enzym *PtLPCAT1* (Jasieniecka-Gazarkiewicz i wsp., 2023). W obecnej pracy przyjęto, zgodnie z tym co było sugerowane wcześniej (Lager i wsp., 2013, Jasieniecka-Gazarkiewicz i wsp.,

2016), że reakcje prowadzące do syntezy LPL w testach z DTNB zachodziły z podobną intensywnością również w testach bez DTNB. Odejmując, więc ilości produktu reakcji w testach z DTNB od ilości produktu powstałego w testach bez DTNB, założyliśmy, że uzyskujemy w ten sposób aktywność enzymów typu LPLAT w reakcji *backward*. Dokładna procedura przeprowadzania reakcji *in vitro* omawianych w niniejszym rozdziale została opisana w rozdziale 3.17.

#### **4.4.1. Remodelowanie fosfolipidów zawierających kwasy tłuszczowe naturalnie występujące we frakcjach mikrosomalnych z drożdży przez enzym LPCAT (acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina) kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum***

W celu zbadania aktywności enzymu *PtLPCAT1* w procesie remodelowania endogennych PL (PC, PE i PA) występujących w badanych frakcjach mikrosomalnych (wyizolowanych z komórek drożdżowych  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460*) przeprowadzono testy enzymatyczne w warunkach promujących zachodzenie reakcji *backward*. W testach wykorzystywano pięć egzogennych donorów kwasów tłuszczowych ( $[^{14}\text{C}]16:0\text{-CoA}$ ,  $[^{14}\text{C}]18:0\text{-CoA}$ ,  $[^{14}\text{C}]18:1\text{-CoA}$ ,  $[^{14}\text{C}]18:2\text{-CoA}$ ,  $[^{14}\text{C}]18:3\text{-CoA}$ ) dodawanych do przeprowadzanych reakcji oddzielnie (jeden acylo-CoA/jeden test). Reakcje te prowadzono z dodatkiem i bez dodatku DTNB, w trzech różnych okresach czasu. Na Rys. 28 zostały przedstawione wyniki uzyskane po odjęciu powstałego  $[^{14}\text{C}]$ PL w testach z dodatkiem DTNB od powstałego  $[^{14}\text{C}]$ PL w testach bez dodatku DTNB w wyniku aktywności *PtLPCAT1* (najpierw od aktywności uzyskanej w obu rodzajach testów przeprowadzanych z mikrosomami uzyskanymi z drożdży nadeksprymujacymi *PtLPCAT1* odejmowano aktywności uzyskane w testach z mikrosomami kontrolnymi – uzyskanymi z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanymi pustym plazmidem pYES2/CT). Wyniki te określają aktywność enzymu *PtLPCAT1* w reakcjach *backward*. Zdarzało się jednak, że po wykonaniu powyższego obliczenia, uzyskany wynik był ujemny, co oznacza, że reakcja *backward* katalizowana przez *PtLPCAT1* nie zachodziła. Dodatkowo oznacza to, że w testach prowadzonych z dodatkiem DTNB zachodziły inne reakcje (niebędące reakcjami *backward* katalizowanymi przez *PtLPCAT1*) generujące nowe cząsteczki LPL, dostępne dla badanego enzymu *PtLPCAT1* do przeprowadzania reakcji *forward*, intensywniej niż w testach bez dodatku DTNB. Wyniki z poszczególnych testów z dodatkiem oraz bez dodatku DTNB wraz z odchyleniem standardowym przedstawiono w Tabelach S1-5.

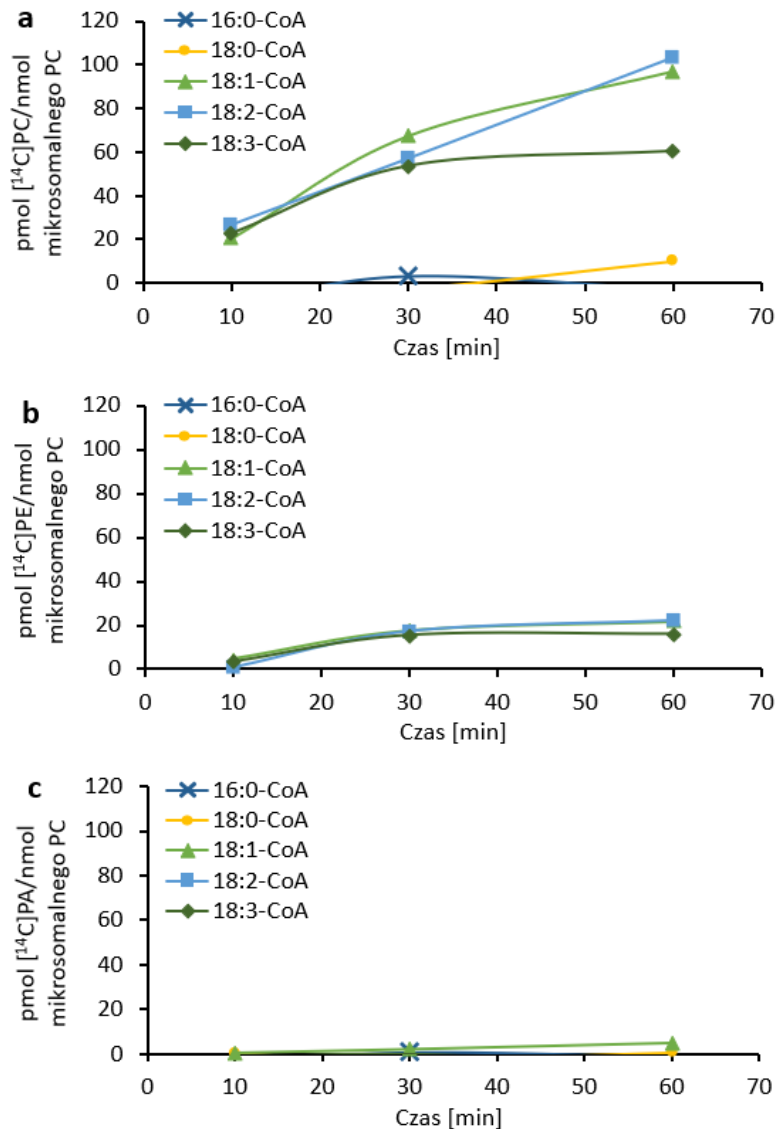
Remodelowanie endogennej PC w reakcjach *backward* przez enzym *PtLPCAT1* zachodziło najintensywniej w testach z dodatkiem [<sup>14</sup>C]acylo-CoA zawierających nienasycone osiemnastowęglowe kwasy tłuszczowe. Stopień wymiany endogennych kwasów tłuszczowych w PC na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]18:2-CoA i [<sup>14</sup>C]18:3-CoA był na podobnym poziomie przy 10 min czasu trwania reakcji. Wraz ze wzrostem czasu trwania reakcji różnice w ilości wymienianych kwasów tłuszczowych pomiędzy PC a poszczególnymi dodawanymi do mieszanin reakcyjnych wspomnianymi egzogennymi acylo-CoA ulegały zwiększeniu. Reakcja remodelowania mikrosomalnego PC zachodziła w sposób prawie liniowy przez 60 minut, gdy donorem kwasów tłuszczowych w mieszaninach reakcyjnych promujących reakcje *backward* był [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. Z pośród badanych [<sup>14</sup>C]acylo-CoA, to właśnie [<sup>14</sup>C]18:2-CoA okazał się też być najintensywniej wykorzystywanym donorem [<sup>14</sup>C]grup acylowych w procesie remodelowania endogennego PC w czasie 60 min inkubacji. Proces remodelowania PC (katalizowany przez enzym *PtLPCAT1*) w reakcji trwającej 30 minut, zachodził najszybciej przy wykorzystaniu [<sup>14</sup>C]18:1-CoA jako donora kwasów tłuszczowych; [<sup>14</sup>C]18:2-CoA czy [<sup>14</sup>C]18:3-CoA były w tym czasie wykorzystywane z mniejszą intensywnością. Jednak w przypadku [<sup>14</sup>C]18:1-CoA liniowość reakcji nie utrzymywała się do 60 min tak jak w przypadku reakcji z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA i w kolejnych 30 minutach inkubacji szybkość reakcji, w której był wykorzystywany [<sup>14</sup>C]18:1-CoA zaczęła spadać; aktywność enzymu *PtLPCAT1* w reakcji *backward* przy 60 minutach inkubacji, gdy donorem kwasów tłuszczowych był [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, osiągnęła wartość nieco niższą niż przy wykorzystaniu [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. Z kolei intensywność remodelowania PC przy udziale [<sup>14</sup>C]18:3-CoA była podobna jak przy [<sup>14</sup>C]18:2-CoA w czasie trwania reakcji 30 minut. W kolejnych 30 minutach inkubacji szybkość reakcji remodelowania PC przy udziale [<sup>14</sup>C]18:3-CoA uległa zmniejszeniu; wymiana przy 60 minutach inkubacji zwiększyła się o około 13% i stanowiła około 58% odnotowanej w tym samym czasie wymiany kwasów tłuszczowych w PC przy udziale [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. Remodelowanie PC katalizowane przez badany enzym *PtLPCAT1* w testach promujących zachodzenie reakcji *backward* z wykorzystaniem [<sup>14</sup>C]18:0-CoA nie zachodziło do 30 minuty reakcji. W czasie inkubacji 60 minutowej można było już jednak zaobserwować remodelowanie PC przy wykorzystaniu [<sup>14</sup>C]18:0-CoA, które wynosiło około 10% najefektywniejszego remodelowania PC zachodzącego przy udziale [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. Wymiana endogennych kwasów tłuszczowych w PC na nasycone kwasy tłuszczowe pochodzące z [<sup>14</sup>C]16:0-CoA nie następowała, gdy reakcja była prowadzona przez 10 minut. Następnie przy czasie

inkubacji 30 minut reakcja wymiany tych kwasów tłuszczowych w PC mogła być już odnotowana, była to jednak bardzo niska wartość. Po 60 min inkubacji nie odnotowano jednak nawet tej aktywności zaobserwowanej w testach trwających 30 minut. Należy więc przyjąć, że remodelowanie mikrosomalnego PC w wyniku reakcji *backward*, w testach z dodatkiem [<sup>14</sup>C]16:0-CoA, było na granicy detekcji (Rys. 28a).

Reakcja *backward* katalizowana przez enzym *PtLPCAT1* zachodziła stanowczo mniej efektywnie w stosunku do PE niż do PC. Enzym *PtLPCAT1* katalizował reakcję wymiany kwasów tłuszczowych w PE na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA i [<sup>14</sup>C]18:2-CoA w wyniku reakcji *backward*, a następnie *forward*, z podobną intensywnością. Remodelowanie PE z udziałem [<sup>14</sup>C]18:3-CoA przebiegało trochę wolniej niż remodelowanie z udziałem [<sup>14</sup>C]18:1-CoA i [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. W czasie 60 min reakcji, efektywność reakcji *backward* w tym przypadku była o około 27% mniejsza. Powyższe reakcje remodelowania PE (z udziałem [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]18:2-CoA i [<sup>14</sup>C]18:3-CoA) nie były reakcjami liniowymi. Szybkość tych reakcji po 30 min inkubacji mocno się obniżyła. Przy czym w 60 min inkubacji ilość syntetyzowanego produktu ([<sup>14</sup>C]PE) w wyniku reakcji *backward*, a następnie *forward*, wzrosła o około 26% w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA i [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. Natomiast w testach z dodatkiem [<sup>14</sup>C]18:3-CoA ilość *de novo* syntetyzowanego [<sup>14</sup>C]PE w wyniku reakcji *backward*, a następnie *forward*, była taka sama po 60 minut reakcji jak ta po 30 min. W przypadku zastosowanych w testach [<sup>14</sup>C]acylo-CoA zawierających nasycone kwasy tłuszczowe (16:0 i 18:0) reakcja *backward* katalizowana przez enzym *PtLPCAT1* nie zachodziła (Rys. 28b).

Badany enzym *PtLPCAT1* nie przeprowadzał natomiast reakcji *backward* w stosunku do PA (lub przeprowadzał na tyle nieefektywnie, że wynik był na poziomie detekcji) przy większości zastosowanych donorów kwasów tłuszczowych. Wykazano jedynie, że enzym *PtLPCAT1* jest zdolny do wymiany kwasów tłuszczowych w PA na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA w wyniku katalizowania reakcji *backward*, a następnie *forward*, oraz, że reakcja ta zachodziła w sposób prawie liniowy do 60 min trwania inkubacji. Efektywność tej wymiany w ilościach bezwzględnych nie była znacząca, ponieważ wynosiła tylko od około 5,2% do 9% wymiany odnotowanej w przypadku PC oraz od 23% do 32% wymiany odnotowanej w przypadku PE (Rys. 28c). Należy jednak zaznaczyć, że zawartość endogennego PA stanowiła tylko około 10% zawartości endogennego PC czy około 18% endogennego PE tak, więc procent wymiany kwasów tłuszczowych w tym fosfolipidzie, był tylko o około połowy mniej intensywny niż

wymiana kwasów tłuszczowych w PC i nawet bardziej efektywny niż wymiana kwasów tłuszczowych w PE.



**Rys. 28.** Aktywność typu *backward* *Pt*LPCAT1 w procesie remodelowania mikrosomanych fosfolipidów [PC (a), PE (b) i PA (c)], zawierających kwasy tłuszczowe naturalnie występujące w komórkach drożdżowych. Reakcje prowadzono z udziałem pięciu różnych [<sup>14</sup>C]acylo-CoA (donorów [<sup>14</sup>C]kwasów tłuszczowych; dodawanych do mieszaniny reakcyjnej osobno).

Na wykresach przedstawiono wyniki uzyskane po odjęciu ilości produktu reakcji powstałego w testach z dodatkiem DTNB od ilości produktu reakcji powstałego w testach bez dodatku DTNB w wyniku aktywności *Pt*LPCAT1 (najpierw od aktywności uzyskanej w obu rodzajach testów przeprowadzanych z mikrosomami uzyskanymi z drożdży nadekspresyjujących *Pt*LPCAT1 - transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* - odejmowano aktywności uzyskane w testach z mikrosomami kontrolnymi – uzyskanymi z drożdży  $\Delta$ *ALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT). Uśrednione wyniki przeprowadzonych testów (wraz z odchyleniem standardowym) przedstawiono w Tabelach S1-5.

Znając ilość endogennego PA, PE i PC w porcjach frakcji mikrosomalnych wykorzystywanych w testach (zawartość powyższych klas lipidów w porcjach frakcji mikrosomalnych wykorzystywanych w testach podano w Tabeli 9) obliczono procent wymiany kwasów tłuszczowych zawartych w tych fosfolipidach na kwasy tłuszczowe pochodzące z [<sup>14</sup>C]acylo-CoA, w procesie remodelowania generującym LPL w wyniku reakcji *backward* katalizowanej przez *Pl*LPCAT1. Wyliczono również całkowity procent wymiany kwasów tłuszczowych w badanych fosfolipidach (od ilości [<sup>14</sup>C]-kwasów tłuszczowych inkorporowanych do poszczególnych fosfolipidów w testach bez dodatku DTNB z mikrosomami z drożdży nadekspymującymi *Pl*LPCAT1 odejmowano ilości [<sup>14</sup>C]-kwasów tłuszczowych inkorporowanych do tychże fosfolipidów w odpowiednich testach z mikrosomami z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT). Procent wymienionych kwasów tłuszczowych w wyniku reakcji *backward* w mikrosomalnym PC drożdży nadekspymujących *Pl*LPCAT1 na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA, [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]18:3-CoA i [<sup>14</sup>C]18:0-CoA wynosił odpowiednio około 10,3%, 9,7%, 6,0% i 1,0% w ciągu godziny. Całkowity procent wymiany kwasów tłuszczowych w mikrosomalnym PC na pochodzące z wymienionych acylo-CoA wynosił zaś 16,8%, 12,9%, 12,9% i 3,15% odpowiednio. Dodatkowo wymiana następowała również w obecności 16:0-CoA i wynosiła około 3,19% w ciągu godziny. Z kolei, procent wymiany kwasów tłuszczowych w mikrosomalnym PE w wyniku reakcji *backward* na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]18:2-CoA i [<sup>14</sup>C]18:3-CoA wynosił odpowiednio około 3,9%, 4,0% i 3,2%. Całkowity procent tej wymiany wynosił zaś 5,7%, 8,8% i 6,3% odpowiednio, zaś w testach 16:0-CoA i 18:0-CoA 0,6% i 0,3% w ciągu jednogodzinnej reakcji. Wymiana kwasów tłuszczowych w PA w wyniku reakcji *backward* zachodziła tylko na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:0-CoA i [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, a procent wymiany wynosił odpowiednio około 0,5% i 5,2% (Tabela 9). Wymiana całkowita (w wyniku generowania LPA w reakcji *backward* i wyniku innych reakcji) wynosiła zaś w obecności tych acylo-CoA 3,4% i 6,9% odpowiednio. Dodatkowo taką wymianę obserwowano również w testach z 16:0-CoA (10,2%), 18:2-CoA (6,6%) i 18:3-CoA (8,6%). Należy jednak pamiętać, że enzymy typu LPCAT są bardziej specyficzne w stosunku do kwasów tłuszczowych występujących w pozycji sn-2 w porównaniu do tych występujących w pozycji sn-1. Rzeczywista wymiana kwasów tłuszczowych w pozycji sn-2 omawianych lipidów mogła, więc być nawet o 1,9 razy wyższa, a tych z pozycji sn-1 wynosić tylko około 10% średniej wymiany przedstawionej powyżej (Lager i wsp., 2013).

**Tabela 9.** Procent wymiany kwasów tłuszczowych w fosfolipidach (zawierających kwasy tłuszczowe naturalnie występujące w komórkach drożdżowych *ΔALE1* transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460*), na kwasy tłuszczowe pochodzące z różnych cząsteczek [<sup>14</sup>C]acylo-CoA, w ciągu godziny w wyniku katalizowania reakcji *backward*, a następnie *forward*, przez enzym *PtLPCAT1* oraz procent całkowitej wymiany.

Endogenny PL	Całkowita zawartość PL/test [nmol]	Średni procent wymiany kwasów tłuszczowych występujących w badanych fosfolipidach frakcji mikrosomalnych na kwasy tłuszczowe pochodzące z odpowiedniego [ <sup>14</sup> C]acylo-CoA w ciągu godziny w wyniku reakcji <i>backward</i> (A) oraz procent całkowitej wymiany (B)									
		[ <sup>14</sup> C]acylo-CoA									
		16:0-CoA		18:0-CoA		18:1-CoA		18:2-CoA		18:3-CoA	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
PC	5	0	3,19	1,0	3,15	9,7	12,9	10,3	16,8	6,0	12,9
PE	2,8	0	0,63	0	0,30	3,9	5,69	4,0	8,81	3,2	6,25
PA	0,5	0	10,2	0,6	3,4	5,2	6,9	0	6,6	0	8,6

PL - fosfolipid; PC - fosfatydylocholina; PE - fosfatydyloetanolamina; PA - kwas fosfatydowy; LPL - lizofosfolipid

Do wyliczenia % wymiany kwasów tłuszczowych w poszczególnych fosfolipidach na te pochodzące z acylo-CoA w **wyniku reakcji *backward*** katalizowanej przez *PtLPCAT1* wykorzystano różnice w ilości inkorporowanych do poszczególnych fosfolipidów [<sup>14</sup>C]-kwasów tłuszczowych w reakcjach *backward* w testach z frakcjami mikrosomalnymi z drożdży nadekspymujacymi *PtLPCAT1* i w testach z frakcjami mikrosomalnymi z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT – wyniki ujemne z tych ostatnich testów traktowano jako 0 (dane w Tabelach S1-5).

Do wyliczenia % **całkowitej wymiany kwasów tłuszczowych** (w reakcjach *backward* oraz innych reakcjach produkujących LPL a następnie reakcji *forward* katalizowanej przez *PtLPCAT1*) wykorzystano ilości inkorporowanych do poszczególnych fosfolipidów [<sup>14</sup>C]-kwasów tłuszczowych w testach bez dodatku DTNB z mikrosomami z drożdży nadekspymujacymi *PtLPCAT1* pomniejszonymi o ilość [<sup>14</sup>C]-kwasów tłuszczowych inkorporowanych do tychże fosfolipidów w odpowiednich testach z mikrosomami z drożdży *ΔALE1* transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT.

W niektórych przypadkach w testach z dodatkiem DTNB wymiana kwasów tłuszczowych w PC była wyższa niż w testach bez dodatku DTNB (dane w Tabelach S1-5). Danych tych nie uwzględniono w niniejszej Tabeli.

#### 4.4.2. Remodelowanie fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży o zmodyfikowanym *in vitro* składzie kwasów tłuszczowych przez PtLPCAT (enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricorutum*)

Uzupełnieniem badań omówionych powyżej, dotyczących aktywności enzymu PtLPCAT1 w reakcjach *backward* było przeprowadzenie testów enzymatycznych, w których w pierwszym etapie modyfikowano zawartość oraz skład kwasów tłuszczowych fosfatydylocholiny (PC) badanych frakcji mikrosomalnych (uzyskanych z wykorzystywanych do badań drożdży). W etapie tym uzyskiwano, frakcje mikrosomalne posiadające PC o składzie kwasów tłuszczowych innym niż ten występujący naturalnie w PC drożdży. W celu przeprowadzenia tego typu modyfikacji frakcje mikrosomalne (przeznaczone do tych modyfikacji) wykorzystywane były najpierw w testach promujących reakcje *forward*, w wyniku których biosyntetyzowano „nowe” cząsteczki PC. W testach tych akceptorem kwasów tłuszczowych były głównie cząsteczki egzogennej lizofosfatydylocholiny (*sn*-1-18:1-LPC; zawartość endogennej LPC we frakcjach mikrosomalnych jest stosunkowo niska) a donorami estry, głównie długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ze szlaku biosyntezy kwasu eikozapentaenowego (EPA) z CoA, tj.: 18:3(n-3)-CoA, 18:3(n-6)-CoA, 18:4(n-3)-CoA, 20:4(n-3)-CoA oraz 20:5(n-3)-CoA. W reakcjach tych źródłem enzymów typu LPCAT, przeprowadzających reakcje syntezy „nowych” cząsteczek PC, były wykorzystywane do badań frakcje mikrosomalne. Zsyntetyzowane *de novo* PC, zawierające „nowe” kwasy tłuszczowe głównie w pozycji *sn*-2, wbudowywane były do membran modyfikowanych frakcji mikrosomalnych. Po zakończeniu syntezy „nowych” cząsteczek PC, mieszaniny reakcyjne były odwirowywane, a uzyskane osady frakcji mikrosomalnych o zmodyfikowanym składzie PC, były zawieszane w mieszaninie reakcyjnej promującej reakcje typu *backward*. Dokładną metodykę przeprowadzania zarówno modyfikacji PC badanych frakcji mikrosomalnych jak i metodykę późniejszych testów badających remodelowanie PC tych frakcji opisano szczegółowo w rozdziale 3.17. Główne badania dotyczące remodelowania zmodyfikowanych „PC” wykonano na frakcjach mikrosomalnych z drożdży nadekspymujących PtLPCAT, a badania dodatkowe na frakcjach mikrosomalnych z drożdży nadekspymujących drożdżową acylotransferazę ALE1 oraz na frakcjach mikrosomalnych z drożdży nadekspymujących acylotransferazę *Arabidopsis AtLPCAT2*. Określenie aktywności enzymu PtLPCAT1 w reakcjach *backward* w stosunku do cząsteczek fosfatydylocholiny zawierających długołańcuchowe

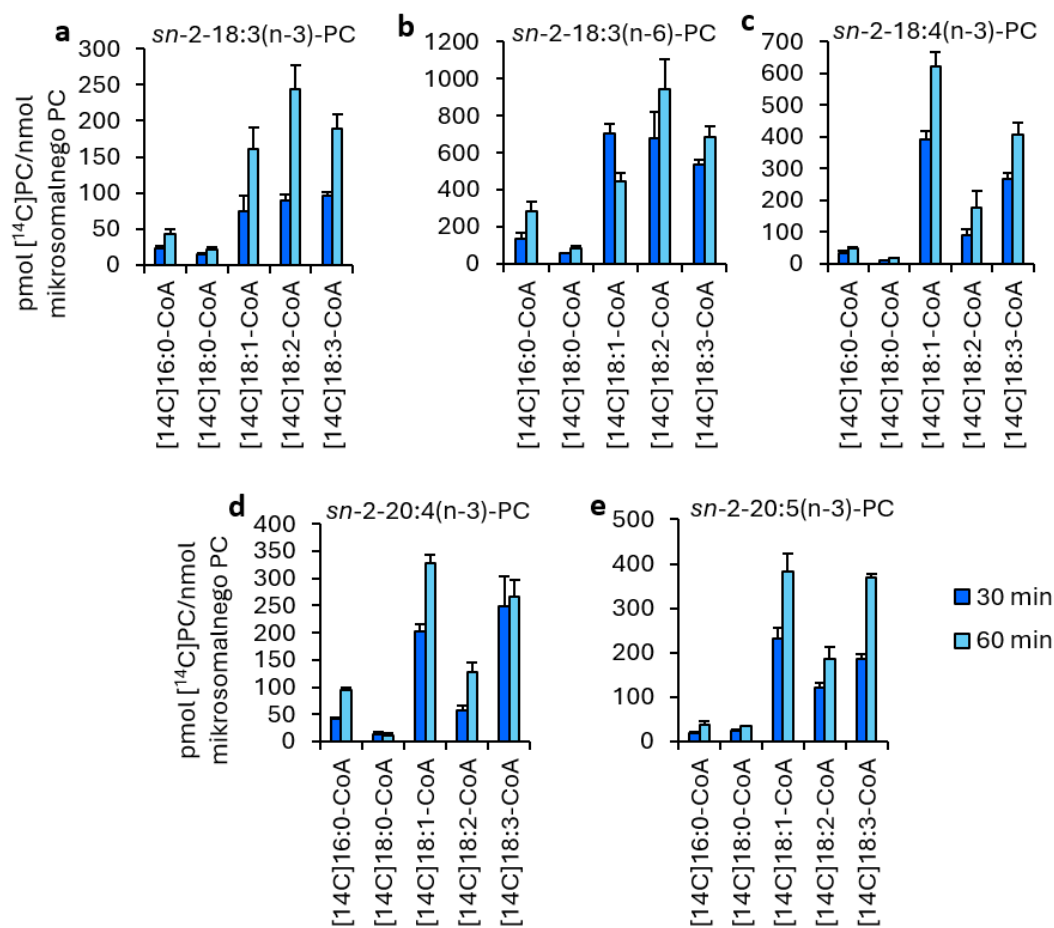


wielonienasycone kwasy tłuszczowe (VLC-PUFA) ze szlaku biosyntezy kwasu eikozapentaenowego (EPA), uznano za istotne w uzyskiwaniu odpowiedzi dotyczącej roli, jaką mogą wykazywać te enzymy w biosyntezie kwasu tłuszczowego EPA. Określenie zaś tego typu aktywności wykazywanej przez inne LPCATy uznano za istotne dla uzyskania odpowiedzi czy specyficzność *PtLPCAT* różni się od specyficzności innych LPCATów.

#### **4.4.2.1. Wpływ acylo-CoA i wprowadzonych modyfikacji frakcji mikrosomalnych (izolowanych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* - enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*) na całkowitą intensywność remodelowania zawartych w nich cząsteczek PC**

Całkowitą intensywność remodelowania PC można było obserwować w testach bez dodatku DTNB. W testach tych LPC powstawało zarówno w reakcjach typu *backward* katalizowanych przez *PtLPCAT1* jak i w innego typu reakcjach katalizowanych np. przez fosfolipazy, enzymy typu PDAT, czy poprzez lipazową aktywność LPLATów. Niezależnie od sposobu wytwarzania, powstałe cząsteczki LPC były dalej wykorzystywane przez *PtLPCAT1* do reakcji *forward* syntetyzującej zmodyfikowane cząsteczki PC. Z pośród wykorzystywanych frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o różne „nowe” rodzaje PC, to jest: *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC*; *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC*; *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC*; *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC* i *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC*, najefektywniej remodelowane było PC frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC*. W czasie inkubacji 30 minutowej, remodelowanie PC tak zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych zachodziło najintensywniej gdy donorem kwasów tłuszczowych był [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. Efektywność remodelowania w obecności pozostałych acylo-CoA zmniejszała się w następujący sposób: [<sup>14</sup>C]18:3-CoA > [<sup>14</sup>C]18:1-CoA > [<sup>14</sup>C]16:0-CoA > [<sup>14</sup>C]18:0-CoA. Względna intensywność remodelowania PC omawianej frakcji mikrosomalnej w testach z wymienionymi wyżej 5-cioma różnymi acylo-CoA była podobna również podczas 60 minutowej inkubacji. Efektywność remodelowania pomiędzy 30 a 60 minutami inkubacji była jednak o wiele niższa niż w pierwszych 30 minutach (Rys. 29b). Całkowita intensywność remodelowania pozostałych zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych była niższa niż tej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC*. Biorąc pod uwagę najwyższą odnotowaną intensywność remodelowania PC w ciągu 60 min przedstawiała się ona następująco: frakcja wzbogacona o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* (około 66% najwyższej intensywności odnotowanej dla frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC*) > frakcja wzbogacona o *sn-1-18:1-sn-2-*

20:5(n-3)-PC (około 40%) > frakcja wzbogacona o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)*-PC (około 35%) > frakcja wzbogacona o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)*-PC (około 26%). Podczas remodelowania PC frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)*-PC, o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)*-PC i o *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)*-PC proces remodelowania zachodził najintensywniej gdy w środowisku reakcji znajdował się [<sup>14</sup>C]18:1-CoA a następnie [<sup>14</sup>C]18:3-CoA > [<sup>14</sup>C]18:2-CoA > [<sup>14</sup>C]16:0-CoA > [<sup>14</sup>C]18:0-CoA. Wpływ badanych acylo-CoA na intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)*-PC był zaś podobny jak ten odnotowany dla frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)*-PC ([<sup>14</sup>C]18:2-CoA > [<sup>14</sup>C]18:3-CoA > [<sup>14</sup>C]18:1-CoA > [<sup>14</sup>C]16:0-CoA > [<sup>14</sup>C]18:0-CoA). Intensywność remodelowania PC omawianych obecnie frakcji mikrosomalnych była w pierwszych 30 minutach inkubacji zazwyczaj wyższa (często jednak w sposób mniej widoczny niż w przypadku frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)*-PC) niż w kolejnych 30 minutach inkubacji. W niektórych przypadkach, jak np. w testach z mikrosomami wzbogaconymi o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)*-PC, intensywność remodelowania w pierwszych 30 minutach inkubacji była podobna jak w kolejnych 30 minutach, a czasami nawet niższa (Rys. 29).



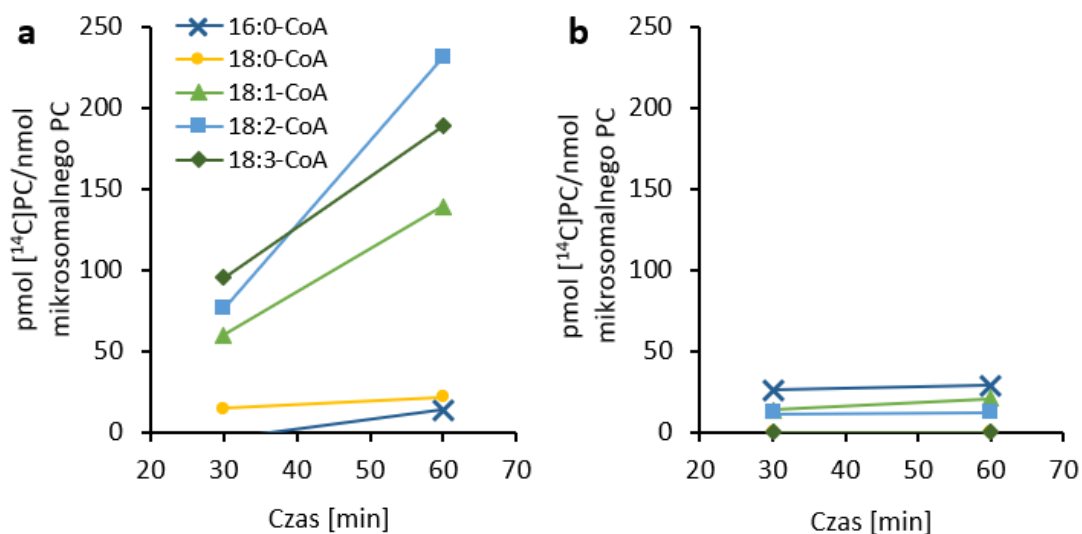
**Rys. 29.** Intensywność remodelowania PC, w testach bez dodatku DTNB, frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogaconych o nowe „gatunki” PC w zależności od różnych donorów [<sup>14</sup>C]kwasów tłuszczowych - [<sup>14</sup>C]acylo-CoA dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno. **a** – frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC*; **b** – frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC*; **c** – frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC*; **d** – frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC*; **e** – frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC*.

Wykorzystywane w badaniach frakcje mikrosomalne izolowane były z drożdży  $\Delta ALE1$  z wstawionym plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricornutum*. Wzbogacanie PC tych frakcji mikrosomalnych o nowe „gatunki” PC następowało w wyniku syntezy danego „gatunku” PC *in vitro* w testach promujących reakcje *forward* przy wykorzystaniu wymienionych frakcji mikrosomalnych (źródło enzymu *PtLPCAT1*), 18:1-LPC (akceptor kwasów tłuszczowych) oraz odpowiedniego acylo-CoA (donor kwasów tłuszczowych; 18:3(n-3)-CoA, 18:3(n-6)-CoA, 18:4(n-3)-CoA, 20:4(n-3)-CoA, 20:5(n-3)-CoA). Syntetyzowane *de novo* PC wbudowywane było do wykorzystanych w testach frakcji mikrosomalnych. Po zakończeniu testów promujących reakcje *forward*, tak zmodyfikowane frakcje mikrosomalne odzyskiwano metodą wirowania i wykorzystywano do badania intensywności remodelowania zawartego w nich PC. Oprócz powyższego rysunku, wyniki tych testów (wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym) podane są w Tabeli S7.

#### 4.4.2.2. Udział reakcji typu *backward* oraz udział innego typu reakcji w remodelowaniu fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* (enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*) wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC*

Wymiana kwasów tłuszczowych będąca wynikiem katalizowania reakcji *backward*, a następnie *forward*, przez *PtLPCAT1* w fosfatydylocholinie frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o cząsteczki PC zawierające kwas tłuszczowy 18:3(n-3) w pozycji *sn-2* (stanowiły one około 51% wszystkich cząsteczek PC obecnych w tych mikrosomach) zachodziła najszybciej gdy mieszanina reakcyjna zawierała [<sup>14</sup>C]18:2-CoA, a w następnej kolejności gdy zawierała [<sup>14</sup>C]18:3-CoA lub [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Wymiana kwasów tłuszczowych w PC badanej zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej na wspomniane [<sup>14</sup>C]18:3 i [<sup>14</sup>C]18:1 była wolniejsza o około 18% i 41% (odpowiednio) niż ich wymiana na [<sup>14</sup>C]18:2, podczas inkubacji trwającej 60 minut. Remodelowanie składu kwasów tłuszczowych PC omawianej zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej (w wyniku reakcji typu *backward*) w testach z [<sup>14</sup>C]16:0-CoA i [<sup>14</sup>C]18:0-CoA zachodziło jeszcze mniej efektywnie. Wynosiło ono odpowiednio około 6% i 10% intensywności remodelowania odnotowanego w testach z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA podczas 60 minutowej inkubacji. Ponadto, wymiana grup acylowych w PC badanych frakcji mikrosomalnych na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]16:0-CoA była poniżej poziomu detekcji podczas inkubacji trwającej 30 minut; można ją było zaobserwować dopiero gdy czas inkubacji wynosił 60 minut (Rys. 30a). Wyniki przedstawione na Rys. 30a to różnica w intensywności remodelowania PC badanych frakcji mikrosomalnych odnotowana w testach bez dodatku DTNB (Rys. 29a; Tabela S7) i w testach z dodatkiem tego inhibitora reakcji typu *backward* (Rys. 30b; Tabela S7), czyli remodelowanie składu kwasów tłuszczowych całkowicie zależne od aktywności typu *backward* wykazywanej przez enzymy typu LPLAT obecne w badanych frakcjach mikrosomalnych, praktycznie jednak zależne prawie wyłącznie od aktywności *PtLPCAT1* (intensywność reakcji typu *backward* katalizowanych przez endogenny SLC1 była na bardzo niskim poziomie; Tabele S1-S5). Remodelowanie składu kwasów tłuszczowych PC badanych frakcji mikrosomalnych zachodzące w wyniku współdziałania LPLATów i innych enzymów dostarczających LPC do reakcji typu *forward* katalizowanej przez enzymy typu LPLAT, przedstawiono na Rys. 30b (wyniki testów przeprowadzonych z dodatkiem DTNB). Do enzymów, które mogą współdziałać z enzymami LPLAT w remodelowaniu fosfolipidów należą np. fosfolipazy czy enzymy

typu PDAT. Produkcja cząsteczek LPC może następować również w wyniku działalności lipazowej enzymów typu LPLAT (Jasieniecka-Gazarkiewicz i wsp., 2023). Intensywność remodelowania PC badanej (wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-[<sup>14</sup>C]18:3(n3)-PC) frakcji mikrosomalnej w testach z DTNB była stosunkowo niska (Rys. 30b). W testach z [<sup>14</sup>C]16:0-CoA, [<sup>14</sup>C]18:1-CoA lub [<sup>14</sup>C]18:2-CoA – intensywność tego typu remodelowania wynosiła od około 5 do około 13% najwyższej intensywności remodelowania (odnotowanego w reakcjach *backward* i następujących po nich reakcjach *forward* katalizowanych przez *Pt*LPCAT1 (w testach z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA). W testach z udziałem [<sup>14</sup>C]18:0-CoA lub [<sup>14</sup>C]18:3-CoA (w obecności DTNB) nie odnotowano żadnego włączania kwasów tłuszczowych obecnych w tych acylo-CoA do puli PC (brak syntezy *de novo* cząsteczek fofatydylocholiny). O ile [<sup>14</sup>C]18:0-CoA jest bardzo słabo akceptowany przez *Pt*LPCAT1 to [<sup>14</sup>C]18:3-CoA jest stosunkowo dobrze wykorzystywany przez ten enzym w reakcji typu *forward* (Połomska i wsp., 2022). Należałoby więc przypuszczać, że w testach z udziałem przynajmniej tego ostatniego acylo-CoA produkcja LPC nie następuje.



**Rys. 30.** Intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC* w zależności od różnych donorów [ $^{14}\text{C}$ ]kwasów tłuszczowych - [ $^{14}\text{C}$ ]acylo-CoA dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno. **a** – remodelowanie będące wynikiem aktywności *PtLPCAT1* w reakcji *backward* (od intensywności remodelowania PC w testach bez dodatku DTNB odejmowano intensywność remodelowania PC w testach z dodatkiem tego inhibitora reakcji *backward*); **b** – intensywność remodelowania PC w testach z dodatkiem DTNB.

Wykorzystywane w badaniach frakcje mikrosomalne izolowane były z drożdży  $\Delta ALE1$  z wstawionym plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricornutum*. Wzbogacanie PC tych frakcji mikrosomalnych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC* następowało w wyniku syntezy tego „gatunku” PC *in vitro* w testach promujących reakcje *forward* przy wykorzystaniu wymienionych frakcji mikrosomalnych (źródło enzymu *PtLPCAT1*), 18:1-LPC (akceptor kwasów tłuszczowych) oraz 18:3(n-3)-CoA (donor kwasów tłuszczowych). Syntetyzowane *de novo* PC wbudowywane było do wykorzystanych w testach frakcji mikrosomalnych. Po zakończeniu testów promujących reakcje *forward*, tak zmodyfikowane frakcje mikrosomalne odzyskiwano metodą wirowania i wykorzystywano do badania intensywności remodelowania zawartego w nich PC. Oprócz powyższego rysunku, wyniki tych testów (wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym) podane są w Tabeli S7.

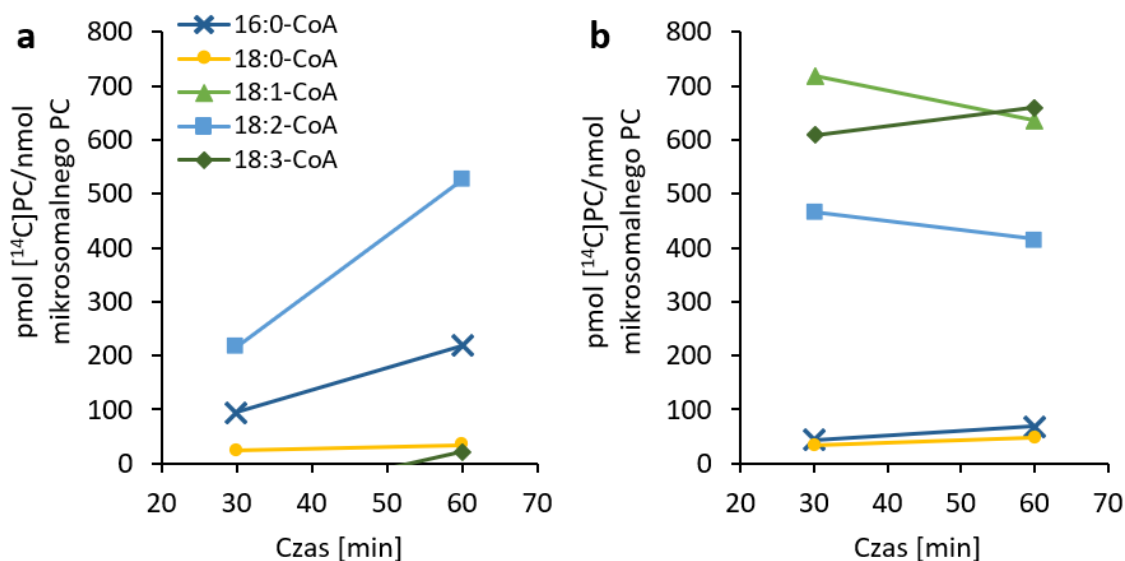
#### 4.4.2.3. Udział reakcji typu *backward* oraz udział innego typu reakcji w remodelowaniu fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* (enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*) wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC*

Kolejnym wariantem modyfikacji badanych frakcji mikrosomalnych były mikrosomy wzbogacone o cząsteczki *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC* (stanowiły one około 57% wszystkich cząsteczek PC obecnych w tych mikrosomach). Wymiana kwasów tłuszczowych w PC tak zmodyfikowanych mikrosomów na kwasy tłuszczowe pochodzące z [<sup>14</sup>C]acylo-CoA dodawane do mieszanin reakcyjnych, zachodziła już całkiem inaczej niż w przypadku podobnych testów wykonywanych z udziałem frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC* (omówionej powyżej). Co prawda remodelowanie tak zmodyfikowanego PC (w wyniku reakcji *backward* a następnie *forward* katalizowanych przez *PtLPCAT1*) było najintensywniejsze gdy donorem kwasów tłuszczowych był [<sup>14</sup>C]18:2-CoA, co miało miejsce również gdy remodelowane było PC mikrosomów wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC*, jednak wymiana kwasów tłuszczowych w tym przypadku była bardziej efektywna. W odróżnieniu jednak od sytuacji opisanej powyżej dla mikrosomów wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC*, remodelowanie PC obecnie omawianej zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA i w testach [<sup>14</sup>C]18:3-CoA w wyniku reakcji *backward* a następnie *forward* katalizowanych przez *PtLPCAT1*, było bardzo mało efektywne. W testach z udziałem [<sup>14</sup>C]18:1-CoA tego typu remodelowania nie obserwowano w ogóle, a w testach [<sup>14</sup>C]18:3-CoA bardzo niską jego intensywność można było zaobserwować dopiero po 60 minutach inkubacji (Rys. 31a; Tabela S7). W odróżnieniu również od poprzednio omówionej zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej, w testach z obecnie omawianą frakcją mikrosomalną tego typu remodelowanie PC zachodziło stosunkowo efektywnie gdy donorem kwasów tłuszczowych był [<sup>14</sup>C]16:0-CoA. Intensywność remodelowania PC w testach z jego udziałem wynosiła około 41% szybkości remodelowania odnotowanej w testach z udziałem [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. Względna efektywność wymiany kwasów tłuszczowych w testach z [<sup>14</sup>C]18:0-CoA była podobna jak w przypadku testów z mikrosomami wzbogaconymi o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC* i wynosiła około 6% intensywności odnotowanej w testach z udziałem [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. W wartościach bezwzględnych była to jednak około 2 razy intensywniejsza wymiana (Rys. 30a i 31a; Tabela S7).

Remodelowanie składu kwasów tłuszczowych PC obecnie omawianej zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej w testach z udziałem DTNB było wielokrotnie bardziej intensywne niż to odnotowane dla zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej omówionej powyżej (Rys. 30b i Rys. 31b). W testach z dodatkiem DTNB, cząsteczki LPC (wykorzystywane dalej przez enzym *PtLPCAT1* w reakcji *forward*) są syntetyzowane w innych reakcjach niż reakcja *backward* katalizowana przez *PtLPCAT1*. Na intensywność tych reakcji wpływa ewidentnie (jak wynika z zaprezentowanych wyników; Rys. 30b i 31b, Tabela S6) rodzaj przeprowadzonej modyfikacji badanych frakcji mikrosomalnych. Ponadto, na intensywność tych reakcji wpływa również rodzaj acylo-CoA wykorzystywanego w testach. W obecnie omawianych testach, gdy w środowisku reakcyjnym był obecny [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]18:2-CoA lub [<sup>14</sup>C]18:3-CoA, remodelowanie PC badanych, zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych zachodziło intensywniej lub na podobnym poziomie jak w wyniku produkcji endogennego LPC w wyniku reakcji *backward* katalizowanej przez *PtLPCAT1* przy obecności w mieszaninie reakcyjnej [<sup>14</sup>C]18:2-CoA (Rys. 31a). Po 30 min inkubacji było to około 332%, 215% i 281% a po 60 min inkubacji około 137%, 80% i 126% dla testów z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]18:2-CoA i [<sup>14</sup>C]18:3-CoA odpowiednio. W testach z DTNB, intensywność remodelowania PC badanej frakcji mikrosomalnej z udziałem [<sup>14</sup>C]16:0-CoA i [<sup>14</sup>C]18:0-CoA była kilkakrotnie niższa niż w testach z powyżej omawianymi acylo-CoA, jednakże wyższa niż w analogicznych testach z mikrosomami wzbogaconymi w *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC* (Rys. 30b i 31b). Porównując intensywność remodelowania PC obecnie omawianej frakcji mikrosomalnej w testach z [<sup>14</sup>C]18:0-CoA w reakcjach w których LPC generowane było w wyniku reakcji *backward* katalizowanej przez *PtLPCAT1* z intensywnością remodelowania w którym LPC generowane było w innych reakcjach (testy z DTNB) intensywność remodelowania z udziałem tych ostatnich reakcji była nieznacznie wyższa, a w przypadku testów udziałem [<sup>14</sup>C]16:0-CoA stanowiła około 1/3 aktywności odnotowanej w stosunku do tych pierwszych. W testach, w których donorem kwasów tłuszczowych były [<sup>14</sup>C]18:1-CoA lub [<sup>14</sup>C]18:3-CoA wymiana kwasów tłuszczowych w PC badanej frakcji mikrosomalnej zachodziła praktycznie tylko poprzez reakcje inne niż reakcja *backward* katalizowana przez *PtLPCAT1* (porównanie intensywności obu typów reakcji w przypadku testów z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA omówiono powyżej), (Rys. 31 i Tabela S7). Intensywność remodelowania PC badanej frakcji mikrosomalnej w testach z DTNB, przebiegała o wiele intensywniej w pierwszych 30 minutach inkubacji niż w kolejnych 30 minutach. W przypadku testów z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA i testów z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA ilość



[<sup>14</sup>C]PC po 60 minutach reakcji była nawet niższa niż ilość [<sup>14</sup>C]PC odnotowana po 30 minutach inkubacji (Rys. 31b).



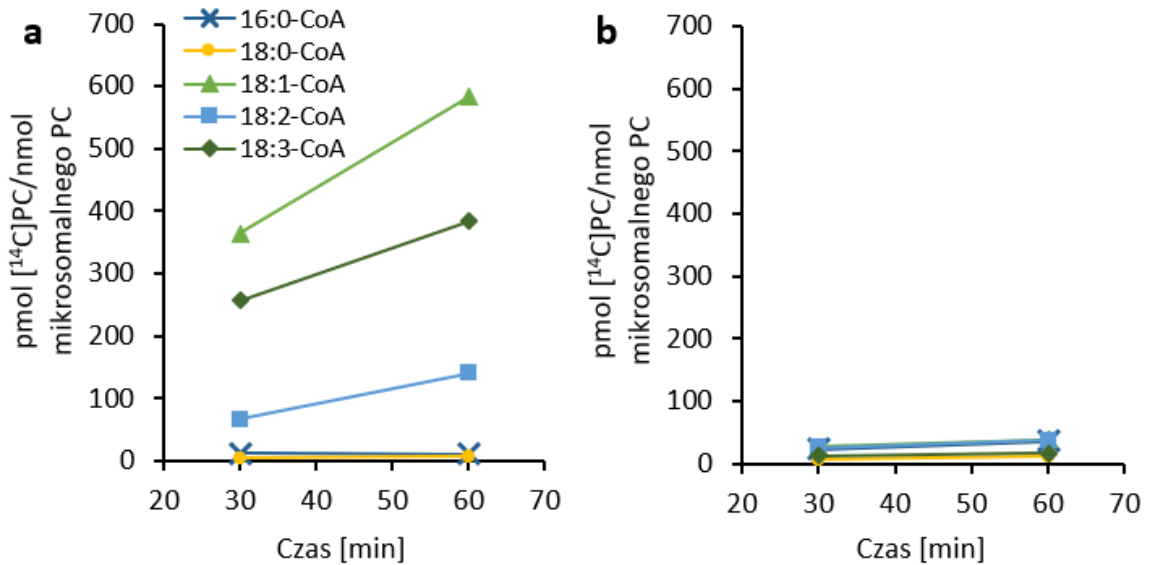
**Rys. 31.** Intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)*-PC w zależności od różnych donorów [<sup>14</sup>C]kwasów tłuszczowych - [<sup>14</sup>C]acylo-CoA dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno. **a** – remodelowanie będące wynikiem aktywności *PtLPCAT1* w reakcji *backward* (od intensywności remodelowania PC w testach bez dodatku DTNB odejmowano intensywność remodelowania PC w testach z dodatkiem tego inhibitora reakcji *backward*); **b** – intensywność remodelowania PC w testach z dodatkiem DTNB.

Wykorzystywane w badaniach frakcje mikrosomalne izolowane były z drożdży *ΔALE1* z wstawionym plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricorutum*. Wzbogacanie PC tych frakcji mikrosomalnych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)*-PC następowało w wyniku syntezy tego „gatunku” PC *in vitro* w testach promujących reakcje *forward* przy wykorzystaniu wymienionych frakcji mikrosomalnych (źródło enzymu *PtLPCAT1*), 18:1-LPC (akceptor kwasów tłuszczowych) oraz 18:3(n-6)-CoA (donor kwasów tłuszczowych). Syntetyzowane *de novo* PC wbudowywane było do wykorzystanych w testach frakcji mikrosomalnych. Po zakończeniu testów promujących reakcje *forward*, tak zmodyfikowane frakcje mikrosomalne odzyskiwano metodą wirowania i wykorzystywano do badania intensywności remodelowania zawartego w nich PC. Oprócz powyższego rysunku, wyniki tych testów (wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym) podane są w Tabeli S7.

#### 4.4.2.4. Udział reakcji typu *backward* oraz udział innego typu reakcji w remodelowaniu fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* (enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*) wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC*

W przypadku testów z frakcją mikrosomalną wzbogaconą o cząsteczki *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* (stanowiły one około 51% wszystkich cząsteczek PC obecnych w tych mikrosomach), enzym *PtLPCAT1* najszybciej generował LPC w reakcji *backward* i kolejno reacylował je syntetyzując „nowe” cząsteczki PC gdy mieszaniny reakcyjne zawierały [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, a w następnej kolejności [<sup>14</sup>C]18:3-CoA i [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. Aktywność enzymu *PtLPCAT1* w tego typu remodelowaniu PC badanej frakcji mikrosomalnej przy wykorzystaniu [<sup>14</sup>C]18:3-CoA i [<sup>14</sup>C]18:2-CoA była odpowiednio o około 1,5 i 4,2 razy mniejsza niż aktywność odnotowana w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Natomiast wymiana (katalizowana przez *PtLPCAT1* poprzez przeprowadzanie reakcji *backward* a następnie *forward*) kwasów tłuszczowych w PC badanych frakcji mikrosomalnych na nasycone kwasy tłuszczowe pochodzące z [<sup>14</sup>C]16:0-CoA i [<sup>14</sup>C]18:0-CoA była bliska zera; innymi słowy intensywność reakcji przeprowadzonej z dodatkiem oraz bez dodatku DTNB była na podobnym poziomie (Rys. 32a; Tabela S7). W testach prowadzonych z dodatkiem DTNB, których wyniki przedstawiono na Rys. 32b, remodelowanie PC badanej frakcji mikrosomalnej przy udziale innych reakcji generujących LPC niż reakcja *backward* katalizowana przez *PtLPCAT1*, zachodziło na bardzo niskim poziomie niezależnie od zastosowanego w testach rodzaju [<sup>14</sup>C]acylo-CoA.

Obserwowany model remodelowania cząsteczek PC badanej frakcji mikrosomalnej (wzbogaconej o cząsteczki *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC*) był nieco zbliżony do modelu remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC* i różnił się bardzo mocno od modelu remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC*.



**Rys. 32.** Intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* w zależności od różnych donorów [<sup>14</sup>C]kwasów tłuszczowych - [<sup>14</sup>C]acylo-CoA dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno. **a** – remodelowanie będące wynikiem aktywności *PtLPCAT1* w reakcji *backward* (od intensywności remodelowania PC w testach bez dodatku DTNB odejmowano intensywność remodelowania PC w testach z dodatkiem tego inhibitora reakcji *backward*); **b** – intensywność remodelowania PC w testach z dodatkiem DTNB.

Wykorzystywane w badaniach frakcje mikrosomalne izolowane były z drożdży *ΔALE1* z wstawionym plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricornutum*. Wzbogacanie PC tych frakcji mikrosomalnych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* następowało w wyniku syntezy tego „gatunku” PC *in vitro* w testach promujących reakcje *forward* przy wykorzystaniu wymienionych frakcji mikrosomalnych (źródło enzymu *PtLPCAT1*), 18:1-LPC (akceptor kwasów tłuszczowych) oraz 18:4(n-3)-CoA (donor kwasów tłuszczowych). Syntetyzowane *de novo* PC wbudowywane było do wykorzystanych w testach frakcji mikrosomalnych. Po zakończeniu testów promujących reakcje *forward*, tak zmodyfikowane frakcje mikrosomalne odzyskiwano metodą wirowania i wykorzystywano do badania intensywności remodelowania zawartego w nich PC. Oprócz powyższego rysunku, wyniki tych testów (wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym) podane są w Tabeli S7.

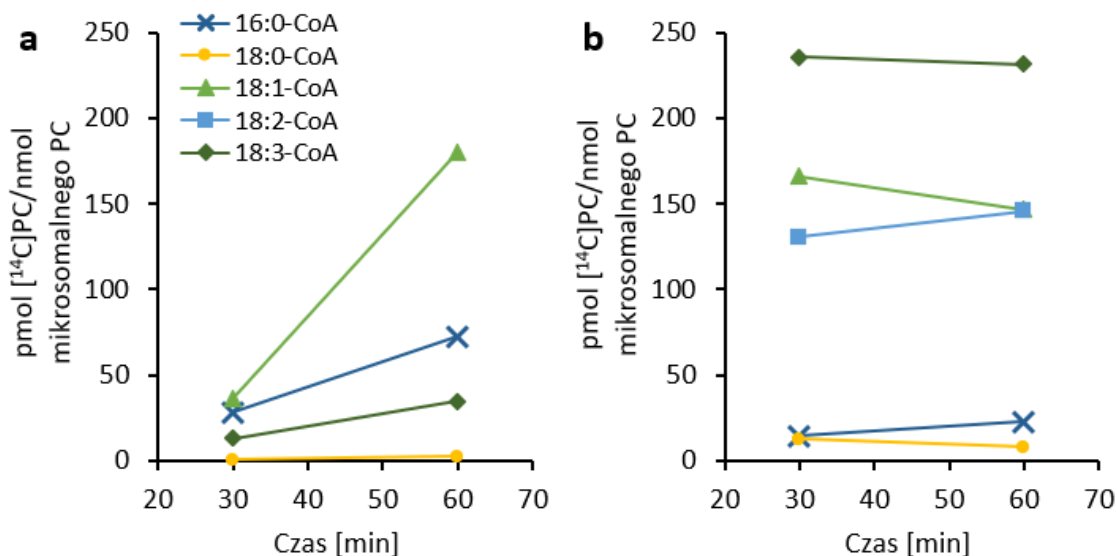
#### 4.4.2.5. Udział reakcji typu *backward* oraz udział innego typu reakcji w remodelowaniu fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* (enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*) wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC*

W kolejnym wariancie testu badano intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC* (stanowiły one około 51% wszystkich cząsteczek PC obecnych w tych mikrosomach). W sposobie remodelowania zależnym od intensywności generowania cząsteczek LPC przez enzym *PtLPCAT1* w reakcji *backward*, proces ten przebiegał najszybciej w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Ten rodzaj remodelowania składu kwasów tłuszczowych PC badanej frakcji mikrosomalnej przebiegał jeszcze gdy w mieszaninie reakcyjnej obecny był [<sup>14</sup>C]16:0-CoA lub [<sup>14</sup>C]18:3-CoA. W czasie 30 minutowej inkubacji ilość powstałego [<sup>14</sup>C]PC w testach z tymi trzema acylo-CoA ([<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]16:0-CoA, [<sup>14</sup>C]18:3-CoA) nie różniła się znacząco. Jednak przy inkubacji trwającej 60 minut, można było już odnotować większe różnice w efektywności przeprowadzanej reakcji *backward* i następującej po niej reakcji *forward*. W tym czasie ilość powstającego [<sup>14</sup>C]PC w testach z [<sup>14</sup>C]16:0-CoA stanowiła około 41% jego ilości powstającej w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Z kolei efektywność remodelowania PC w testach z [<sup>14</sup>C]18:3-CoA stanowiła około 20% najwyższej aktywności odnotowanej w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Intensywność remodelowania PC badanej frakcji mikrosomalnej, katalizowana przez enzym *PtLPCAT1* w reakcji *backward*, a następnie *forward*, była ledwie wykrywalna gdy w mieszaninie reakcyjnej znajdował się [<sup>14</sup>C]18:0-CoA i nie była wykrywalna w przypadku obecności w tej mieszaninie [<sup>14</sup>C]18:2-CoA (Rys. 33a, Tabela S7).

Testy przeprowadzone z dodatkiem DTNB, w których remodelowanie kwasów tłuszczowych PC badanej frakcji mikrosomalnej zależne było od generowania cząsteczek LPC w reakcjach innych niż reakcja *backward* katalizowana przez *PtLPCAT1*, wykazały stosunkowo wysoką intensywność tego typu remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC*. Wymiana kwasów tłuszczowych w PC badanej frakcji mikrosomalnej zachodziła najintensywniej na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:3-CoA, kolejno na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA i te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. Gdy w mieszaninie reakcyjnej znalazły się [<sup>14</sup>C]16:0-CoA lub [<sup>14</sup>C]18:0-CoA wymiana ta była od kilku do kilkunastu razy wolniejsza (Rys. 33b, Tabela S6). Intensywność remodelowania PC badanej frakcji mikrosomalnej w testach z DTNB, przebiegała o wiele

intensywniej w pierwszych 30 minutach inkubacji niż w kolejnych 30 minutach. W przypadku testów z [<sup>14</sup>C]18:3-CoA, [<sup>14</sup>C]18:1-CoA i testów z [<sup>14</sup>C]18:0-CoA ilość powstającego [<sup>14</sup>C]PC po 60 minutach inkubacji była nawet niższa niż ilość [<sup>14</sup>C]PC odnotowana po 30 minutach inkubacji (Rys. 33b, Tabela S7). W przypadku testów z [<sup>14</sup>C]18:3-CoA wymiana kwasów tłuszczowych w PC (po 60 minutach inkubacji) w reakcjach w których LPC generowane było w reakcjach innych niż reakcja *backward* katalizowana przez *PtLPCAT1* była około 7 razy bardziej efektywna niż podobna wymiana zachodząca w reakcjach w których LPC generowane było w wyniku reakcji *backward* katalizowanej przez *PtLPCAT1* (Rys. 33). W testach w których donorem [<sup>14</sup>C]kwasów tłuszczowych był [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, oba sposoby remodelowania PC zachodziły na podobnym poziomie, a w testach z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA remodelowanie w których LPC było generowane na drodze reakcji *backward* katalizowanej przez *PtLPCAT1* w ogóle nie było odnotowane. Intensywność reakcji remodelowania PC (w obecności DTNB) w testach z [<sup>14</sup>C]16:0-CoA była około 3-krotnie niższa, a w testach [<sup>14</sup>C]18:0-CoA nieco wyższa niż w reakcjach w których LPC generowane było przez *PtLPCAT1* w wyniku reakcji *backward*, chociaż w testach z obu tymi acylo-CoA intensywność ta była stosunkowo niska (Rys. 33a i b, Tabela S7).

Obserwowany model remodelowania cząsteczek PC badanej frakcji mikrosomalnej (wzbogaconej o cząsteczki *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC*) był nieco zbliżony do modelu remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC*.



**Rys. 33.** Intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadekspymujących *PtLPCAT1* wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC* w zależności od różnych donorów [<sup>14</sup>C]kwasów tłuszczowych - [<sup>14</sup>C]acylo-CoA dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno. **a** – remodelowanie będące wynikiem aktywności *PtLPCAT1* w reakcji *backward* (od intensywności remodelowania PC w testach bez dodatku DTNB odejmowano intensywność remodelowania PC w testach z dodatkiem tego inhibitora reakcji *backward*); **b** – intensywność remodelowania PC w testach z dodatkiem DTNB.

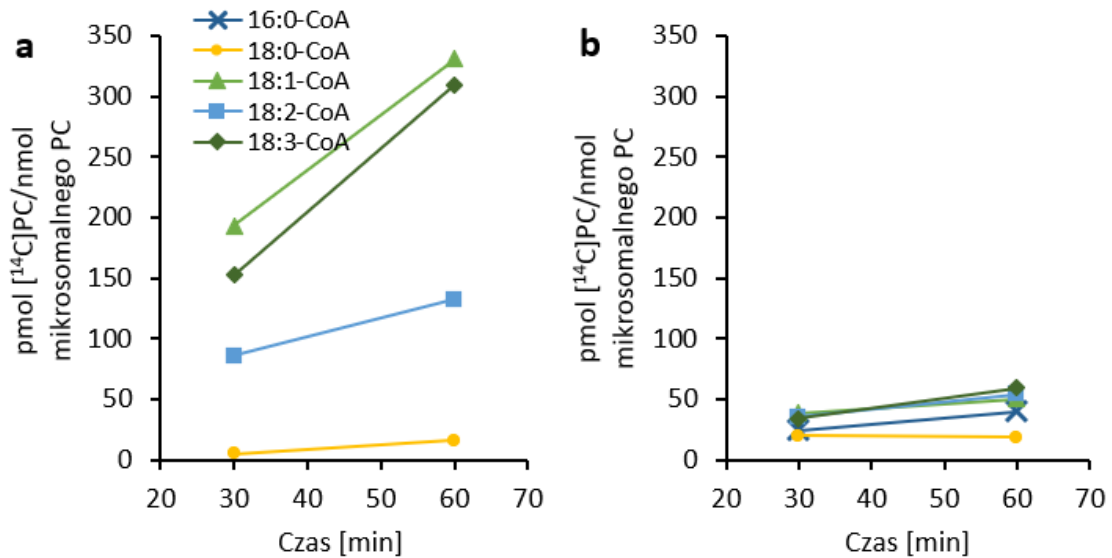
Wykorzystywane w badaniach frakcje mikrosomalne izolowane były z drożdży *ΔALE1* z wstawionym plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricorutum*. Wzbogacanie PC tych frakcji mikrosomalnych o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC* następowało w wyniku syntezy tego „gatunku” PC *in vitro* w testach promujących reakcje *forward* przy wykorzystaniu wymienionych frakcji mikrosomalnych (źródło enzymu *PtLPCAT1*), 18:1-LPC (akceptor kwasów tłuszczowych) oraz 20:4(n-3)-CoA (donor kwasów tłuszczowych). Syntetyzowane *de novo* PC wbudowywane było do wykorzystanych w testach frakcji mikrosomalnych. Po zakończeniu testów promujących reakcje *forward*, tak zmodyfikowane frakcje mikrosomalne odzyskiwano metodą wirowania i wykorzystywano do badania intensywności remodelowania zawartego w nich PC. Oprócz powyższego rysunku, wyniki tych testów (wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym) podane są w Tabeli S7.

#### 4.4.2.6. Udział reakcji typu *backward* oraz udział innego typu reakcji w remodelowaniu fosfatydylocholiny frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* (enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*) wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC*

Kolejne testy badające intensywność remodelowania PC prowadzono z frakcją mikrosomalną wzbogaconą o *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC* (stanowiło ono około 50% wszystkich cząsteczek PC obecnych w tych mikrosomach). Testy te wykazały, że *PtLPCAT1* (poprzez katalizowanie reakcji *backward*, a następnie *forward*) wymieniał najefektywniej kwasy tłuszczowe w PC tak zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, a w następnej kolejności z [<sup>14</sup>C]18:3-CoA i [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. W czasie 60 minutowej inkubacji, enzym *PtLPCAT1* przeprowadzał reakcję *backward*, a następnie *forward*, przy wykorzystaniu [<sup>14</sup>C]18:3-CoA tylko o około 6% mniej intensywnie niż przy wykorzystaniu [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Wymiana kwasów tłuszczowych w PC badanej frakcji mikrosomalnej na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA była już aż o około 60% mniej efektywna, niż podczas testów z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. W testach z [<sup>14</sup>C]18:0-CoA odnotowano zaś bardzo niską wymianę kwasów tłuszczowych w tego typu remodelowaniu PC, a w testach [<sup>14</sup>C]16:0-CoA w ogóle jej nie odnotowano (Rys. 34a, Tabela S7).

W testach z dodatkiem DTNB, w których cząsteczki LPC powstawały w innych reakcjach niż reakcja *backward* katalizowana przez *PtLPCAT1*, synteza [<sup>14</sup>C]PC (w wyniku reakcji *forward* katalizowanej przez *PtLPCAT1*), zachodziła z małą intensywnością w przypadku wszystkich badanych donorów kwasów tłuszczowych ([<sup>14</sup>C]acylo-CoA). Reakcje te były kilkakrotnie mniej intensywne od intensywności remodelowania zależnego od LPC powstającego w wyniku aktywności typu *backward* enzymu *PtLPCAT1* w przypadku testów z acylo-CoA zawierającymi nienasycone kwasy tłuszczowe; w przypadku testów z acylo-CoA z nasyconymi kwasami tłuszczowymi przebiegały jednak z nawet nieco wyższą intensywnością (Rys. 34a i b, Tabela S7).

Obserwowany model remodelowania cząsteczek PC badanej frakcji mikrosomalnej (wzbogaconej o cząsteczki *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC*) był nieco zbliżony do modelu remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC* czy wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* i różnił się od modelu remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC* czy *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC*.



**Rys. 34.** Intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC* w zależności od różnych donorów [ $^{14}\text{C}$ ]kwasów tłuszczowych - [ $^{14}\text{C}$ ]acylo-CoA dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno. **a** – remodelowanie będące wynikiem aktywności *PtLPCAT1* w reakcji *backward* (od intensywności remodelowania PC w testach bez dodatku DTNB odejmowano intensywność remodelowania PC w testach z dodatkiem tego inhibitora reakcji *backward*); **b** – intensywność remodelowania PC w testach z dodatkiem DTNB.

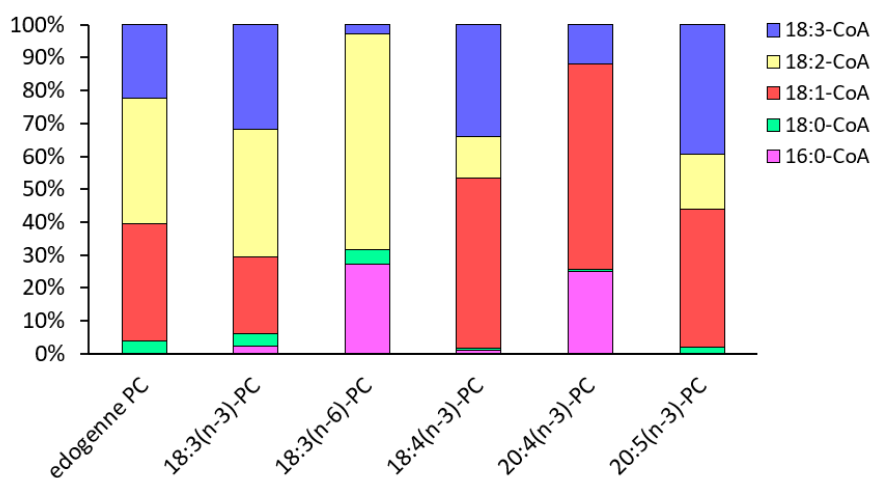
Wykorzystywane w badaniach frakcje mikrosomalne izolowane były z drożdży  $\Delta ALE1$  z wstawionym plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricornutum*. Wzbogacanie PC tych frakcji mikrosomalnych o *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC* następowało w wyniku syntezy tego „gatunku” PC *in vitro* w testach promujących reakcje *forward* przy wykorzystaniu wymienionych frakcji mikrosomalnych (źródło enzymu *PtLPCAT1*), 18:1-LPC (akceptor kwasów tłuszczowych) oraz 20:5(n-3)-CoA (donor kwasów tłuszczowych). Syntetyzowane *de novo* PC wbudowywane było do wykorzystanych w testach frakcji mikrosomalnych. Po zakończeniu testów promujących reakcje *forward*, tak zmodyfikowane frakcje mikrosomalne odzyskiwano metodą wirowania i wykorzystywano do badania intensywności remodelowania zawartego w nich PC. Oprócz powyższego rysunku, wyniki tych testów (wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym) podane są w Tabeli S7.



#### 4.4.2.7. Względna aktywność typu *backward* wykazywana przez *PtLPCAT1* (enzym kodowany przez gen *Phatr3\_J20460* sklonowany z okrzemka *Phaeodactylum tricornutum*) w procesie remodelowania PC zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych w testach z różnymi [<sup>14</sup>C]acylo-CoA

Wyniki przedstawione na Rys. 28 oraz Rys. 30a–34a, zobrazowano również w inny sposób na Rys. 35. Przedstawia on względną aktywność remodelowania PC badanych zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych w reakcjach typu *backward* w obecności każdego z pięciu wykorzystywanych w testach [<sup>14</sup>C]acylo-CoA. Aktywność tą przedstawiono, jako procent sumy intensywności remodelowania PC danego rodzaju zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej w testach z każdym z badanych acylo-CoA (potraktowanej, jako 100%). Dane przedstawione na Rys. 35 w jasny sposób obrazują, że intensywność remodelowania zależna od generowania LPC w reakcji *backward* katalizowanej przez *PtLPCAT1* zależy zarówno od rodzaju użytego w testach [<sup>14</sup>C]acylo-CoA, jak i od rodzaju remodelowanej PC. W testach, w których enzym *PtLPCAT1* remodelował (poprzez katalizowanie reakcji *backward* a następnie *forward*) naturalnie występującą w drożdżach PC (na rysunku oznaczona jako „endogenne PC”), PC wzbogacone o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:3(n-3)-PC lub wzbogacone o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:3(n-6)-PC (czyli PC posiadające w pozycji *sn*-2 kwasy tłuszczowe z 3-ma lub mniej wiązaniami podwójnymi), intensywność reakcji była najwyższa w testach z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. W przypadku PC wzbogaconego o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:3(n-6)-PC względna intensywność reakcji w testach z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA była szczególnie wysoka; dodatkowo remodelowanie tego rodzaju PC w testach z udziałem [<sup>14</sup>C]18:1-CoA nie zachodziło, czego nie można było odnotować dla żadnego z pozostałych badanych rodzajów PC. Z kolei gdy remodelowane były PC wzbogacone o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4(n-3)-PC, o *sn*-1-18:1-*sn*-2-20:4(n-3)-PC oraz o *sn*-1-18:1-*sn*-2-20:5(n-3)-PC (czyli PC posiadające w pozycji *sn*-2 kwasy tłuszczowe z 4-ma lub więcej wiązaniami podwójnymi), remodelowanie zależne od reakcji *backward* a następnie *forward* katalizowanych przez enzym *PtLPCAT1* przebiegało najintensywniej w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA; szczególnie w przypadku PC wzbogaconego o *sn*-1-18:1-*sn*-2-20:4(n-3)-PC. Wymiana kwasów tłuszczowych w PC wzbogaconym o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4(n-3)-PC oraz w PC wzbogaconym o *sn*-1-18:1-*sn*-2-20:5(n-3)-PC na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:2-CoA, nie była już tak intensywna jak w przypadku endogennego PC, PC wzbogaconego o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:3(n-3)-PC czy PC wzbogaconego o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:3(n-6)-PC. Ponadto, w testach z udziałem [<sup>14</sup>C]18:2-CoA wspomniany sposób remodelowania mikrosomalnego PC nie był odnotowany dla PC wzbogaconego o *sn*-1-

18:1-*sn*-2-20:4(n-3)-PC. W testach z [<sup>14</sup>C]acylo-CoA z nasyconymi kwasami tłuszczowymi proces remodelowania PC badanych frakcji mikrosomalnych, zależny od generowania LPC w wyniku reakcji *backward* katalizowanej przez *PtLPCAT1*, przebiegał bardzo słabo, chociaż z pewnymi wyjątkami. Gdy tym sposobem remodelowane było PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:3(n-6)-PC oraz PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-20:4(n-3)-PC (w remodelowaniu PC tych frakcji mikrosomalnych odnotowano duży udział „innych” reakcji niż reakcja typu *backward*), remodelowanie przebiegało stosunkowo intensywnie gdy w mieszaninie reakcyjnej znajdował się [<sup>14</sup>C]16:0-CoA. W reakcjach *backward* a następnie *forward* katalizowanych przez *PtLPCAT1*, wymiana kwasów tłuszczowych w PC na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:3-CoA zachodziła we wszystkich badanych wariantach mikrosomów; przy czym gdy remodelowana była fosfatydylocholina frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:3(n-6)-PC, enzym *PtLPCAT1* wykorzystywał [<sup>14</sup>C]18:3-CoA relatywnie najslabiej w porównaniu do wykorzystania tego acylo-CoA w remodelowaniu pozostałych rodzajów PC (Rys. 35).



**Rys. 35.** Względna aktywność typu *backward* wykazywana przez enzym *PtLPCAT1* w procesie remodelowania sześciu różnych rodzajów mikrosomalnego PC w testach z różnymi [<sup>14</sup>C]acylo-CoA. Wyniki przedstawiono w postaci procentowej; po zsumowaniu intensywności remodelowania danego rodzaju PC w testach z wszystkimi pięcioma badanymi [<sup>14</sup>C]acylo-CoA (sumę potraktowano jako 100%), obliczano procent intensywności remodelowania w testach z danym acylo-CoA w stosunku do całości.

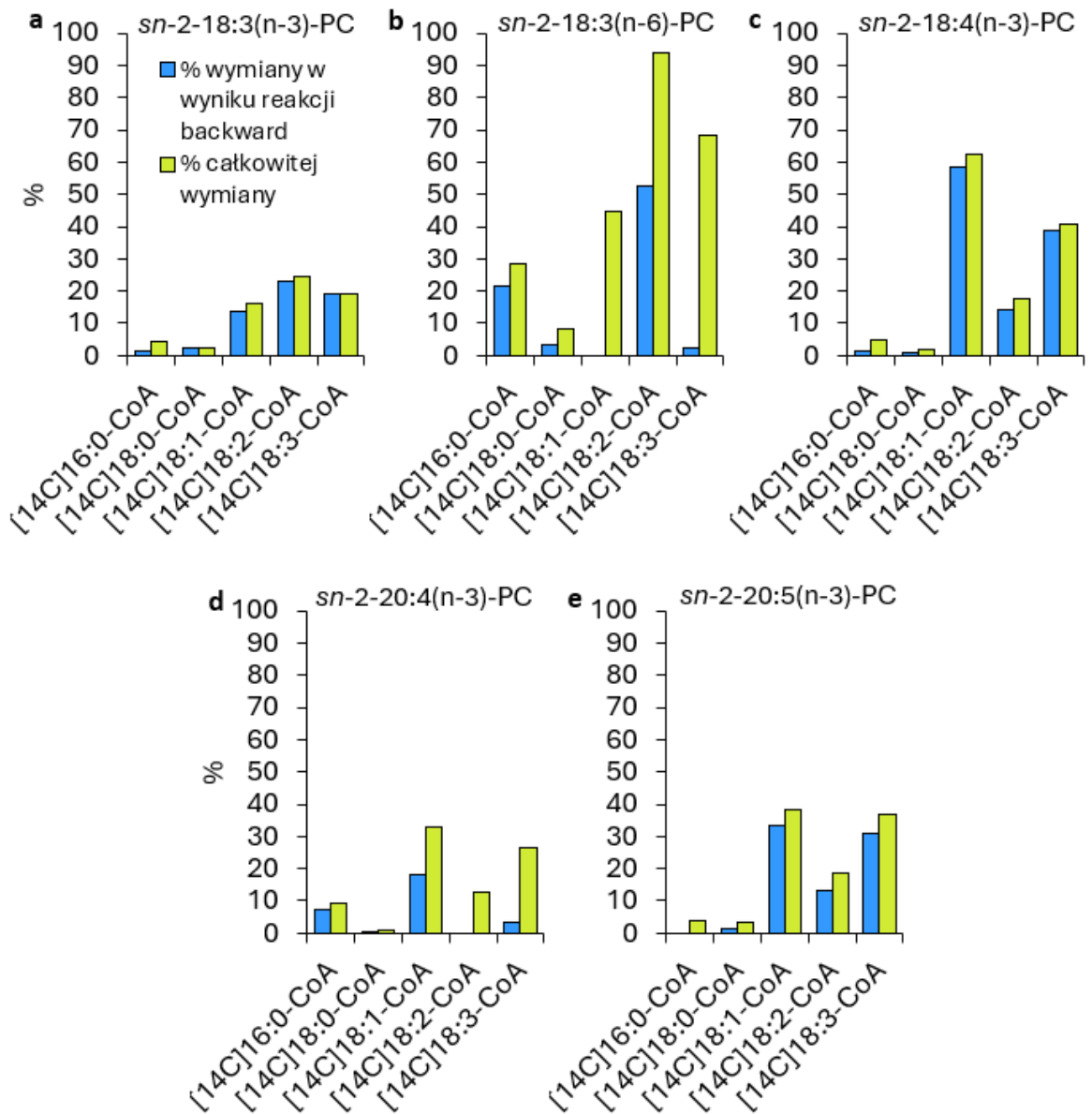
Wyniki przedstawione na rysunku dotyczą aktywności uzyskanych w testach trwających 60 min. Bezwzględne aktywności z tych testów przedstawione są na Rys. 28a - 34a oraz w Tabelach S1-6. Dla uproszczenia, w opisie osi OX podano tylko kwas tłuszczowy z pozycji *sn*-2 PC, o które została wzbogacona dana frakcja mikrosomalna. Wszystkie te PC w pozycji *sn*-1 posiadały 18:1.

#### 4.4.2.8. Procent kwasów tłuszczowych wymienionych w puli PC badanych frakcji mikrosomalnych w reakcjach typu *backward* katalizowanych przez PtLPCAT oraz całkowity procent tej wymiany

Ponieważ, w procesie odzyskiwania zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych w procesie wirowania po przeprowadzonych reakcjach modyfikacji (reakcje typu *forward* z egzogennym *sn*-1-18:1-LPC i egzogennym acylo-CoA) nie odzyskuje się całkowitej ilości frakcji mikrosomalnej, część uzyskanych osadów przeznaczano do oznaczenia zawartości PC w tych osadach. Wyniki tych oznaczeń przedstawiono w Tabeli S6. Pokazują one, że zawartość mikrosomalnego PC w uzyskiwanych osadach zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych wahała się od około 2,7 do około 3,7 nmol mikrosomalnego PC/test. Uzyskane w ten sposób wyniki posłużyły następnie do wyliczenia intensywności remodelowania PC badanych frakcji mikrosomalnych w testach z różnymi [<sup>14</sup>C]acylo-CoA. Intensywność ta została przedstawiona w Tabeli S7 jako „pmol [<sup>14</sup>C]PC/nmol mikrosomalnego PC”. Wykorzystując dane z tej Tabeli przygotowana została Tabela S8 i Rys. 36 przedstawiające procent wymiany kwasów tłuszczowych w PC testowanych frakcji mikrosomalnych na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]acylo-CoA obecnego w przeprowadzonych testach.

Procent tej wymiany był zdecydowanie wyższy we wszystkich badanych zmodyfikowanych frakcjach mikrosomalnych od tej odnotowanej dla PC frakcji mikrosomalnych zawierających tylko naturalnie występujące kwasy tłuszczowe (Tabela 8, Rys. 35 i Tabela S8). W przypadku frakcji wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:3(n-6)-PC (około 57% PC), całkowita wymiana kwasów tłuszczowych w mikrosomalnym PC wyniosła, w testach z 18:2-CoA, około 97% wszystkich kwasów tłuszczowych w ciągu godziny inkubacji. Wymiana ta w reakcji typu *backward* sięgnęła zaś ponad 50% puli tych kwasów. Biorąc pod uwagę, że enzymy typu LPCAT są o wiele bardziej specyficzne w stosunku do pozycji *sn*-2, można założyć, że praktycznie wszystkie kwasy tłuszczowe PC z tej pozycji uległy wymianie w reakcjach typu *backward*. Wzbogacenie badanych frakcji mikrosomalnych o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4(n-3)-PC (około 51% PC) skutkowało drugą pod względem intensywności wymianą kwasów tłuszczowych mikrosomalnej PC na te pochodzące z acylo-CoA. W tym przypadku najintensywniejszą wymianę odnotowano jednak w testach z 18:1-CoA. Całkowita wymiana dotyczyła w tym przypadku około 62% kwasów tłuszczowych mikrosomalnej PC i była tylko o około 4% wyższa od wymiany w reakcji typu *backward*, która dotyczyła około 58% kwasów tłuszczowych PC. Kolejną modyfikacją wywołującą podwyższenie intensywności remodelowania mikrosomalnego

PC było wzbogacenie frakcji mikrosomalnych o *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC* (około 50% PC). W testach z 18:1-CoA całkowita wymiana kwasów tłuszczowych mikrosomalnego PC wyniosła około 38% a tylko w reakcji typu *backward* około 33% w czasie 1 godz. inkubacji. Wzbogacenie frakcji mikrosomalnych o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC* (około 51% PC) wywoływało wzrost całkowitej wymiany kwasów tłuszczowych mikrosomalnego PC w testach z 18:2-CoA do około 24% (w tym około 23% na drodze reakcji typu *backward*), a wzbogacenie o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC* (około 50% PC) w testach z 18:1-CoA do około 33% z czego w reakcjach typu *backward* było to około 18% (Rys. 36, Tabela S8). W testach z pozostałymi acylo-CoA (nieomówionymi powyżej) procent wymiany kwasów tłuszczowych był niższy, ale zazwyczaj wyższy niż w odpowiednich testach z mikrosomami z niemodyfikowaną PC (Tabela 9, Rys. 36, Tabela S8).



**Rys. 36.** Procent wymiany kwasów tłuszczowych w fosfatydylocholinie zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT* na kwasy tłuszczowe pochodzące z różnych cząsteczek [ $^{14}\text{C}$ ]acylo-CoA w ciągu godziny inkubacji. Kolorem niebieskim oznaczono słupki przedstawiające procent wymiany w wyniku reakcji *backward*. Kolorem jasnozielonym oznaczono procent wymiany w wyniku reakcji *backward* i innych reakcji produkujących LPC (testy bez dodatku DTNB). **a** – frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)-PC*; **b** – frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC*; **c** – frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC*; **d** – frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC*; **e** – frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC*.

Oprócz powyższego rysunku, dane te przedstawiono również w Tabeli S8.

#### 4.4.2.9. Remodelowanie fosfatydylocholiny zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* w testach kompetencji z wykorzystaniem mieszanin pięciu acylo-CoA

Wpływ różnych acylo-CoA na proces remodelowania PC zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1*, oprócz testów wykorzystujących poszczególne acylo-CoA dodawane do mieszanin reakcyjnych pojedynczo, badano również w testach, w których wszystkie pięć badanych acylo-CoA dodawane było razem (tzw. testy kompetencji). W testach tych, tylko jeden z pięciu dodawanych do mieszaniny reakcyjnej rodzajów acylo-CoA (16:0-CoA, 18:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA, 18:3-CoA) był znakowany węglem [ $^{14}\text{C}$ ], a pozostałe cztery nie były znakowane. Takie rozwiązanie pozwoliło na zaobserwowanie, w jaki sposób dany rodzaj acylo-CoA wpływa na remodelowanie mikrosomalnego PC, czyli na intensywność biosyntezy [ $^{14}\text{C}$ ]PC, gdy znajduje się on w równo-molarnej mieszaninie z pozostałymi czterema testowanymi acylo-CoA. Do tego typu testów wybrano frakcje mikrosomalne wzbogacone o cząsteczki *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4(*n*-3)-PC (około 51% wszystkich cząsteczek PC), ponieważ zasadnicza część remodelowania PC tak wzbogaconych frakcji mikrosomalnych, w testach specyficzności substratowej (testy sprawdzające intensywność remodelowania mikrosomalnego PC wykorzystujące acylo-CoA dodawane do mieszanin reakcyjnych pojedynczo) zachodziła w wyniku reakcji *backward*, szczególnie w testach z acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (Tabela S7). Znając ten wynik można było w obecnym doświadczeniu wykonać jedynie testy nie zawierające w mieszaninie reakcyjnej DTNB, co znacznie upraszczało interpretację uzyskanych wyników. Testy kompetencji przeprowadzono w dwu temperaturach: 30 °C oraz 20 °C.

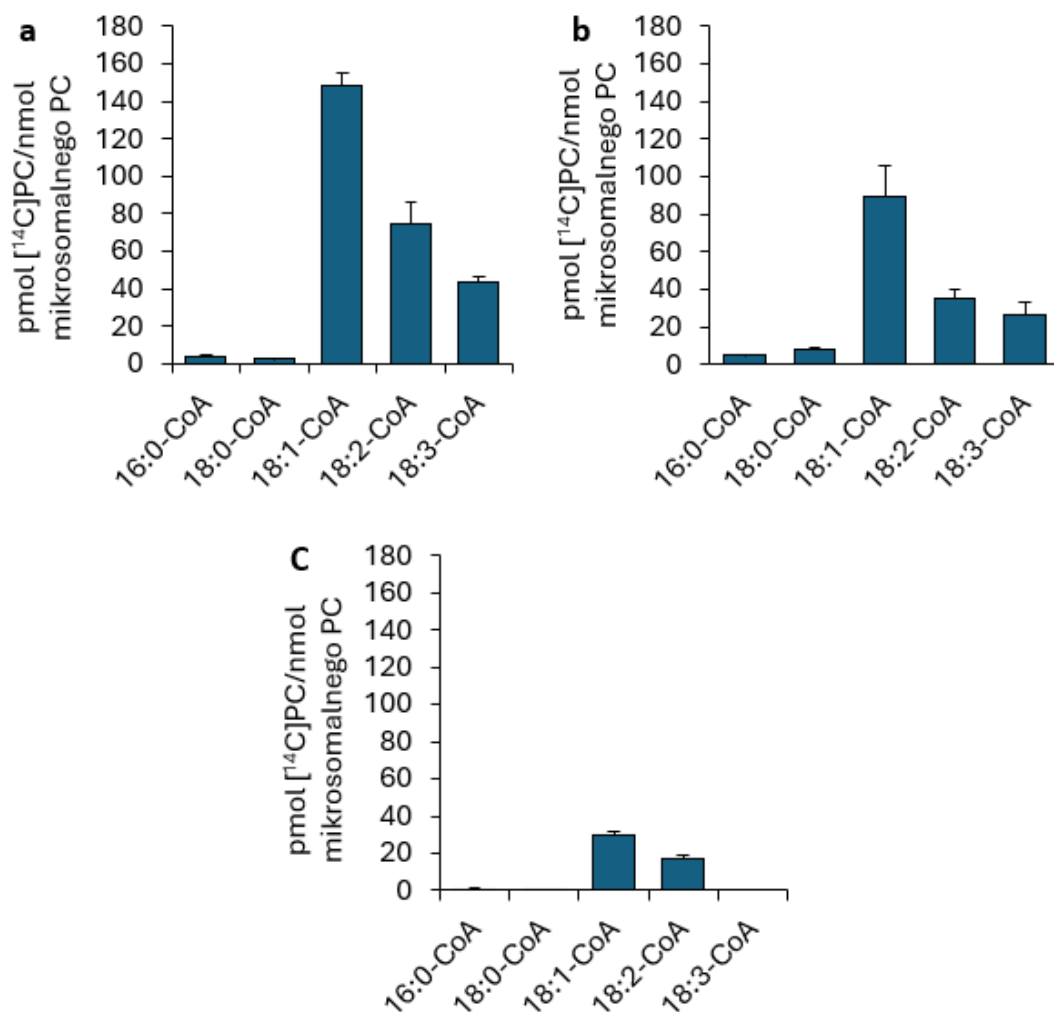
*PtLPCAT1* w testach kompetencji preferował 18-węglowe nienasycone kwasy tłuszczowe w procesie remodelowania mikrosomalnego PC wzbogaconego o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4-PC, zarówno w temperaturze 30 °C jak i 20 °C. Najwyższą preferencję wykazywał w stosunku do [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA, a następnie do [ $^{14}\text{C}$ ]18:2-CoA i [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA; kolejność ta była taka sama w obu badanych temperaturach (Rys. 37a i b). Preferencje te różnią się w pewnym stopniu od preferencji *PtLPCAT1* wykazywanych w testach z pojedynczymi rodzajami [ $^{14}\text{C}$ ]acylo-CoA. Co prawda *PtLPCAT1* preferował w tych testach również nienasycone kwasy tłuszczowe do procesu remodelowania mikrosomalnego PC, jednakże w testach tych [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA wykorzystywany był bardziej efektywnie niż [ $^{14}\text{C}$ ]18:2-CoA (Rys. 29c, Rys. 32, Tabela S7). W testach kompetencji odnotowana aktywność badanego enzymu w temperaturze 30 °C była niższa w stosunku do [ $^{14}\text{C}$ ]18:2-CoA i [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA

o odpowiednio około 50% i 70% względem najwyższej aktywności odnotowanej dla [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Podobny spadek intensywności wykorzystywania [<sup>14</sup>C]18:2-CoA i [<sup>14</sup>C]18:3-CoA do procesu remodelowania mikrosomalnego PC w porównaniu do wykorzystywania do tego procesu [<sup>14</sup>C]18:1-CoA miał miejsce w temperaturze 20 °C i wynosił odpowiednio około 60% i 70%. Efektywność wykorzystywania acylo-CoA z 18-węglowymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi była jednak niższa w temperaturze 20 °C o około 40-50% od efektywności odnotowanej w temperaturze 30 °C. Nasycone kwasy tłuszczowe pochodzące z [<sup>14</sup>C]acylo-CoA, były o wiele mniej efektywnie wykorzystywane do remodelowania mikrosomalnego PC (synteza [<sup>14</sup>C]PC). Wykorzystywanie [<sup>14</sup>C]16:0-CoA i [<sup>14</sup>C]18:0-CoA w temperaturze 30 °C wynosiło odpowiednio tylko około 2,5% i 1,8% efektywności wykorzystywania do tego procesu [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. W temperaturze 20 °C, badany enzym wykorzystywał już w testach kompetencji trochę efektywniej nienasycone kwasy tłuszczowe (16:0 i 18:0) z odpowiednich acylo-CoA, jednak nadal w porównaniu do wykorzystywania [<sup>14</sup>C]18:1-CoA w tej temperaturze, efektywność ta stanowiła tylko odpowiednio około 5,2% i 9,2% (Rys. 37a i b). W testach z pojedynczymi acylo-CoA znajdującymi się w mieszaninie reakcyjnej intensywność remodelowania mikrosomalnego PC (wzbogaconego o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4-PC) w obecności [<sup>14</sup>C]16:0-CoA czy [<sup>14</sup>C]18:0-CoA była również (podobnie jak w teście kompetencji) stosunkowo niska (Rys. 29c, Rys. 32, Tabela S7).

Ponieważ założono, że wprowadzone modyfikacje mogą wpływać na proces remodelowania już poprzez samo zwiększenie zawartości fosfatydylocholin w membranach testowanych frakcji mikrosomalnych, testów kompetencji nie przeprowadzono z niemodyfikowanymi frakcjami mikrosomalnymi. Jako kontrolę, w której skład kwasów tłuszczowych PC był najbardziej zbliżony do składu kwasów tłuszczowych PC niemodyfikowanych frakcji mikrosomalnych, przygotowano modyfikację polegającą na wzbogaceniu frakcji mikrosomalnej z drożdży nadekspymujących *PtLPCAT1* o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:1-PC. Testy kompetencji dla tak zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej przeprowadzono w temperaturze 30 °C. Enzym *PtLPCAT1* wykazywał podobną specyficzność substratową (w stosunku do badanych acylo-CoA) w tych testach jak w przypadku testów z frakcją mikrosomalną wzbogaconą o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4-PC. Z tym, że wykazywana aktywność podczas remodelowania mikrosomalnej PC była znacznie niższa niż aktywność w testach z frakcją mikrosomalną wzbogaconą o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4-PC, o około 80%. W testach z frakcją mikrosomalną wzbogaconą o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:1-PC, enzym również preferował w procesie

remodelowania w pierwszej kolejności [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA, a następnie [ $^{14}\text{C}$ ]18:2-CoA – aktywność enzymu w stosunku do [ $^{14}\text{C}$ ]18:2-CoA stanowiła około 57% maksymalnej aktywności wykazywanej w stosunku do [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA. Jednakże [ $^{14}\text{C}$ ]18:3-CoA, nie był wykorzystywany w ogóle do remodelowania PC tak wzbogaconej frakcji mikrosomalnej przez enzym *PtLPCAT1*. Nasycone kwasy tłuszczowe (16:0, 18:0), pochodzące z odpowiednich [ $^{14}\text{C}$ ]acylo-CoA, były zaś bardzo słabo wykorzystywane przez enzym *PtLPCAT1* do remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:1-PC; aktywność w stosunku do [ $^{14}\text{C}$ ]16:0-CoA i [ $^{14}\text{C}$ ]18:0-CoA wynosiła odpowiednio około 3,4% i 1,4% maksymalnej aktywności wykazywanej w stosunku do [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA (Rys. 37c).





**Rys. 37.** Intensywność wykorzystywania różnych acylo-CoA do remodelowania składu kwasów tłuszczowych PC zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* w testach kompetencji z równo-molową zawartością pięciu różnych acylo-CoA (16:0-CoA, 18:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA, 18:3-CoA) w mieszaninie reakcyjnej. **a** – remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4(*n*-3)-PC w temperaturze 30 °C; **b** – remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4(*n*-3)-PC w temperaturze 20 °C; **c** – remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:1-PC w temperaturze 30 °C.

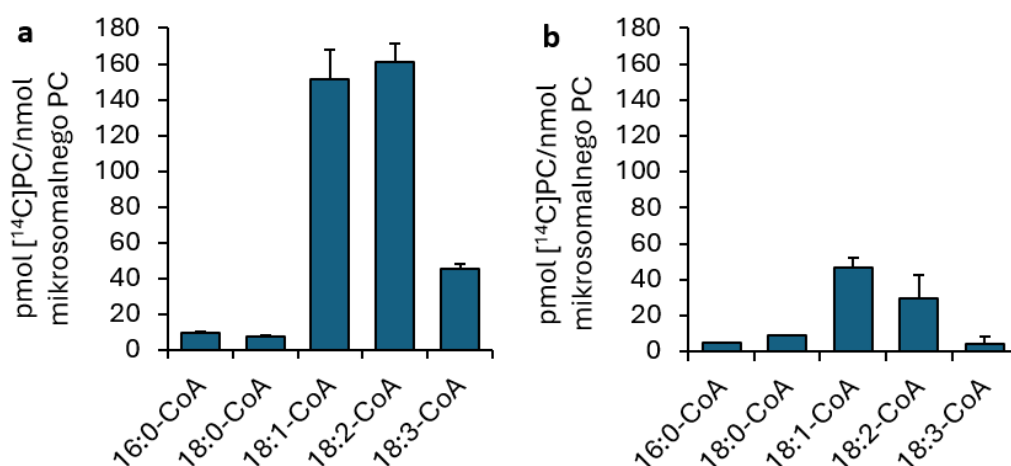
Reakcje prowadzono bez dodatku DTNB przez 30 min. Na wykresach przedstawiono uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowym.

#### 4.4.2.10. Remodelowanie fosfatydylocholiny zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących drożdżowy LPCAT - „ALE1” lub nadeksprymujących *AtLPCAT2* w testach kompetencji z wykorzystaniem mieszanin pięciu acylo-CoA

W celu porównania specyficzności substratowej, w procesie remodelowania, wykazywanej przez enzym typu LPCAT pochodzący z *Phaeodactylum tricornutum* ze specyficznością substratową LPCATów pochodzących z innych organizmów niż okrzemki, przeprowadzono dodatkowo testy kompetencji z wykorzystaniem frakcji mikrosomalnych z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2 niosącym gen *ALE1* (kodujący drożdżowy enzym typu LPCAT) lub gen *Atlg63050* (kodujący enzym typu LPCAT pochodzący z *Arabidopsis thaliana*). Testy badające specyficzność substratową (w stosunku do różnych acylo-CoA obecnych w jednej mieszaninie reakcyjnej) LPCATów pochodzących z *Arabidopsis thaliana* i drożdży przeprowadzono z wykorzystaniem frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC* oraz o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC*.

Uzyskane wyniki wykazały, że enzym typu LPCAT pochodzący z *Arabidopsis thaliana* (*AtLPCAT2*) wykazywał nieco odmienną preferencję w wykorzystywaniu różnych acylo-CoA znajdujących się w równo-molowym stężeniu w mieszaninie reakcyjnej do procesu remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *AtLPCAT2* wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC* niż enzym *PtLPCAT1*. Enzym ten wykazał najwyższą preferencję w procesie remodelowania mikrosomalnego PC w stosunku do 18:2-CoA i tylko nieco mniejszą do 18:1-CoA (*PtLPCAT1* zdecydowanie preferował 18:1-CoA). Aktywność *AtLPCAT2* w stosunku do [<sup>14</sup>C]18:3-CoA stanowiła zaś około 28% najwyższej aktywności odnotowanej w stosunku do [<sup>14</sup>C]18:2-CoA co było zbliżone do jego względnego wykorzystywania przez *PtLPCAT1*. Z kolei wykorzystywanie przez *AtLPCAT2* w procesie remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC* acylo-CoA z nasyconymi kwasami tłuszczowymi było na bardzo niskim poziomie. Wykorzystanie [<sup>14</sup>C]16:0-CoA i [<sup>14</sup>C]18:0-CoA do procesu remodelowania mikrosomalnego PC wynosiło jedynie około 4% oraz 6% (odpowiednio) wykorzystywania [<sup>14</sup>C]18:2-CoA do tego procesu (Rys. 38a). Enzym *AtLPCAT1* wykazywał znacznie niższą aktywność gdy procesowi remodelowania podlegało PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC* niż gdy procesowi temu podlegało PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC*. Podczas remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-*

18:1-PC, w testach kompetencji enzym *AtLPCAT2* wykazał najwyższą aktywność w stosunku do [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Jednak aktywność ta stanowiła tylko około 29% najwyższej aktywności *AtLPCAT2* wykazywanej w stosunku do [<sup>14</sup>C]18:2-CoA w procesie remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4-PC. Intensywność wykorzystywania do reakcji remodelowania PC frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:1-PC w tych testach kompetencji: [<sup>14</sup>C]18:2-CoA, [<sup>14</sup>C]18:0-CoA, [<sup>14</sup>C]18:3-CoA i [<sup>14</sup>C]16:0-CoA, wynosiła około 64%, 20%, 14% i 10% intensywności wykorzystywania [<sup>14</sup>C]18:1-CoA do tego procesu (Rys. 38b). W analogicznych testach *PtLPCAT1* praktycznie nie wykorzystywał do procesu remodelowania PC tak zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej ani [<sup>14</sup>C]18:3-CoA, ani acylo-CoA z nasyconymi kwasami tłuszczowymi.



**Rys. 38.** Intensywność wykorzystywania różnych acylo-CoA do remodelowania składu kwasów tłuszczowych PC zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych z drożdży nadekspymujących *AtLPCAT2* (kodowanego przez gen *Atlg63050*) w testach kompetencji z równo-molową zawartością pięciu różnych acylo-CoA (16:0-CoA, 18:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA, 18:3-CoA) w mieszaninie reakcyjnej. **a** – remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4(n-3)-PC; **b** – remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:1-PC.

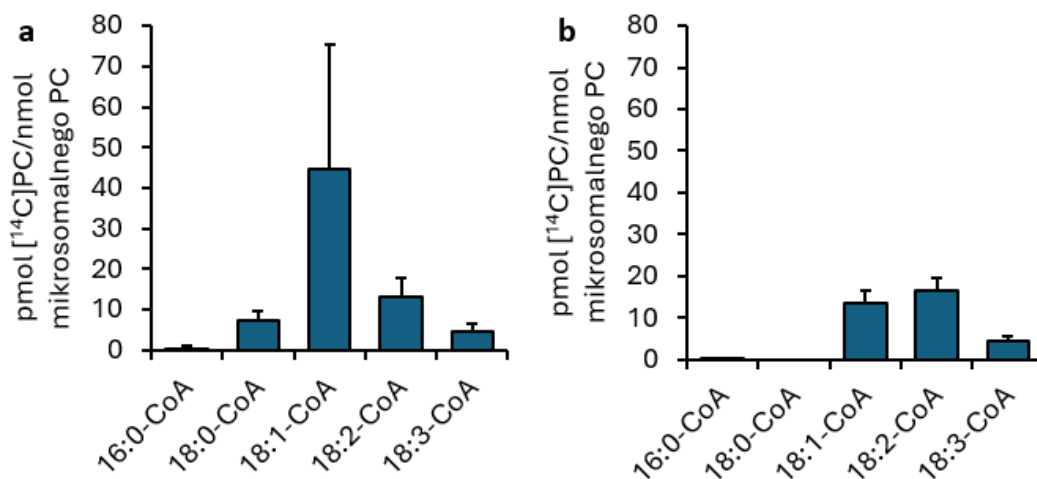
Reakcje prowadzono bez dodatku DTNB przez 30 min w temperaturze 30 °C. Na wykresach przedstawiono uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowym.

Wyniki testów przeprowadzonych z wykorzystaniem frakcji mikrosomalnych z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2 niosącym drożdżowy gen *ALE1* kodujący enzym typu LPCAT, wykazały że enzym ten w reakcjach remodelowania PC

badanej frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC* wykazywał nieco odmienną preferencję w stosunku do acylo-CoA będących w mieszaninie reakcyjnej niż *PtLPCAT1* czy *AtLPCAT2*. Drożdżowy LPCAT wykazywał najwyższą preferencję w przeprowadzonych testach kompetencji w stosunku do [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, a w następnej kolejności wykorzystywał [<sup>14</sup>C]18:2-CoA, [<sup>14</sup>C]18:0-CoA i [<sup>14</sup>C]18:3-CoA. Wykorzystywanie przez drożdżowy enzym typu LPCAT [<sup>14</sup>C]18:2-CoA w procesie remodelowania mikrosomalnego PC w testach kompetencji, była aż o około 70% niższa niż wykorzystywanie [<sup>14</sup>C]18:1-CoA w tym procesie. Wykorzystywanie zaś [<sup>14</sup>C]18:0-CoA oraz [<sup>14</sup>C]18:3-CoA stanowiło już tylko odpowiednio około 17% i 10% intensywności wykorzystywania [<sup>14</sup>C]18:1-CoA. Odnotowane wykorzystywanie przez drożdżowy enzym typu LPCAT [<sup>14</sup>C]16:0-CoA w procesie remodelowania PC badanej frakcji mikrosomalnej, było natomiast bliskie zera (Rys. 39a).

Enzym typu LPCAT kodowany przez drożdżowy gen *ALE1*, w testach z frakcją mikrosomalną wzbogaconą o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC*, najefektywniej wykorzystywał zaś w procesie remodelowania mikrosomalnego PC w testach kompetencji [<sup>14</sup>C]18:2-CoA, a następnie [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]18:3-CoA, [<sup>14</sup>C]16:0-CoA. Z kolei [<sup>14</sup>C]18:0-CoA nie był w ogóle wykorzystywany przez ten enzym do remodelowania PC wspomnianej frakcji mikrosomalnej. Aktywność drożdżowego enzymu typu LPCAT w stosunku do [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, [<sup>14</sup>C]18:3-CoA oraz [<sup>14</sup>C]16:0-CoA w tym procesie wynosiła odpowiednio około 80%, 27% i 2% aktywności odnotowanej dla [<sup>14</sup>C]18:2-CoA. Intensywność wykorzystywania [<sup>14</sup>C]18:1-CoA w procesie remodelowania PC frakcji wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC* była jednak o około 3 razy niższa niż przy remodelowaniu PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC*. Różnice w wykorzystywaniu [<sup>14</sup>C]18:2-CoA, [<sup>14</sup>C]18:3-CoA i [<sup>14</sup>C]16:0-CoA nie były jednak już tak znaczne, chociaż w przypadku [<sup>14</sup>C]18:0-CoA znowu się ujawniły – w remodelowaniu PC frakcji wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC* ten acylo-CoA praktycznie nie był w ogóle wykorzystywany (Rys. 39b).

Po porównaniu ze sobą aktywności trzech badanych enzymów typu LPCAT w procesie remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC* oraz wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC*, można odnotować że enzymy te przeprowadzały intensywniejsze remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC* niż PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC* (Rys. 37, 38 i 39).

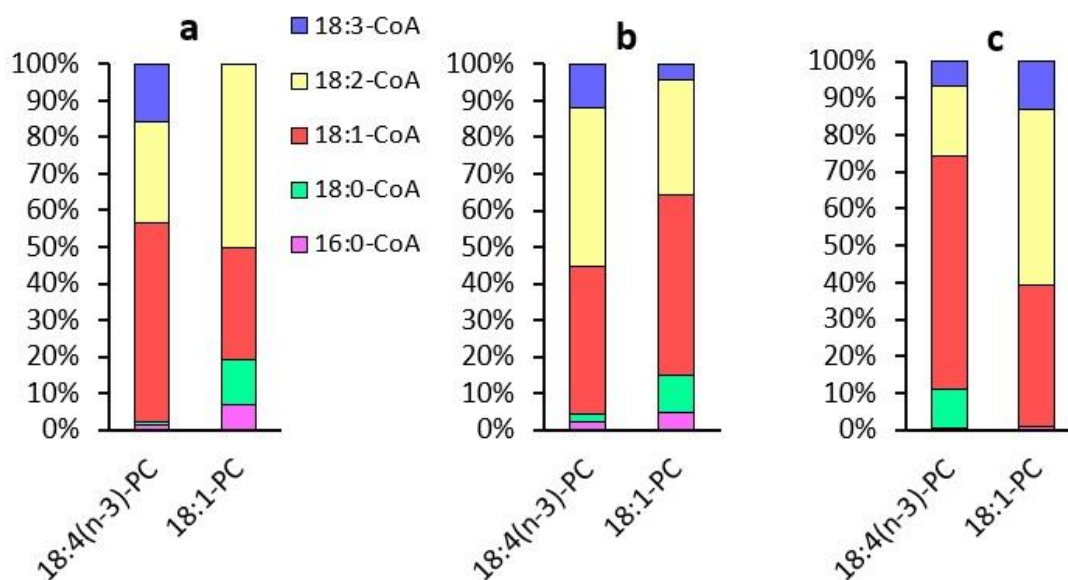


**Rys. 39.** Intensywność wykorzystywania różnych acylo-CoA do remodelowania składu kwasów tłuszczowych PC zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących ALE1 (drożdżowy LPCAT) w testach kompetencji z równo-molową zawartością pięciu różnych acylo-CoA (16:0-CoA, 18:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA, 18:3-CoA) w mieszaninie reakcyjnej. **a** – remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1- *sn*-2-18:4(*n*-3)-PC; **b** – remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1- *sn*-2-18:1-PC.

Reakcje prowadzono bez dodatku DTNB przez 30 min w temperaturze 30 °C. Na wykresach przedstawiono uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowym.

Wyniki przedstawione na Rys. 37, 38 i 39 przedstawiono również w postaci procentowej na Rys. 40, aby w łatwy sposób porównać wykazywane preferencje w stosunku do poszczególnych acylo-CoA obecnych w jednej mieszaninie reakcyjnej, przez enzymy *Pt*LPCAT1, *At*LPCAT2 i ALE1 (drożdżowy LPCAT). Enzymy *Pt*LPCAT1, *At*LPCAT2 i ALE1 preferowały [<sup>14</sup>C]18:1-CoA lub [<sup>14</sup>C]18:2-CoA, zarówno gdy remodelowały PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4-PC jak i o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:1-PC. Drożdżowy enzym typu LPCAT (ALE1), podczas remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:1-PC, wykazywał zbliżoną preferencję do badanych acylo-CoA jak enzymy *Pt*LPCAT1 i *At*LPCAT2 podczas remodelowania PC frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn*-1-18:1-*sn*-2-18:4-PC; podobieństwo polegało na bardzo słabym lub zerowym akceptowaniu nasyconych kwasów tłuszczowych przez te enzymy oraz wyższej aktywności w stosunku do [<sup>14</sup>C]18:3-CoA w porównaniu do reszty wariantów przedstawionych na Rys. 40. Natomiast, enzymy *Pt*LPCAT1 i *At*LPCAT2 wykazywały znacznie wyższą preferencję do [<sup>14</sup>C]16:0-CoA

i [ $^{14}\text{C}$ ]18:0-CoA, gdy przeprowadzały remodelowanie PC frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC* niż wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC*. Odwrotnie drożdżowy enzym ALE1 wykazał lepszą preferencję do 18:0-CoA, w procesie remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC* niż tych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC* (Rys. 40).



**Rys. 40.** Aktywność enzymów *PtLPCAT1* (a), *AtLPCAT2* (b) i *ALE1* (c) w procesie remodelowania PC frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC* oraz o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC*, w stosunku do różnych acylo-CoA znajdujących się w mieszaninie reakcyjnej w równo-molowych stężeniach. Wyniki przedstawiono w postaci procentowej - po podsumowaniu aktywności w stosunku do wszystkich acylo-CoA obliczano procent tej sumy przypadający dla poszczególnych acylo-CoA.

#### 4.4.3. Wpływ różnych parametrów reakcji na intensywność procesu remodelowania PC frakcji mikrosomalnej z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC*

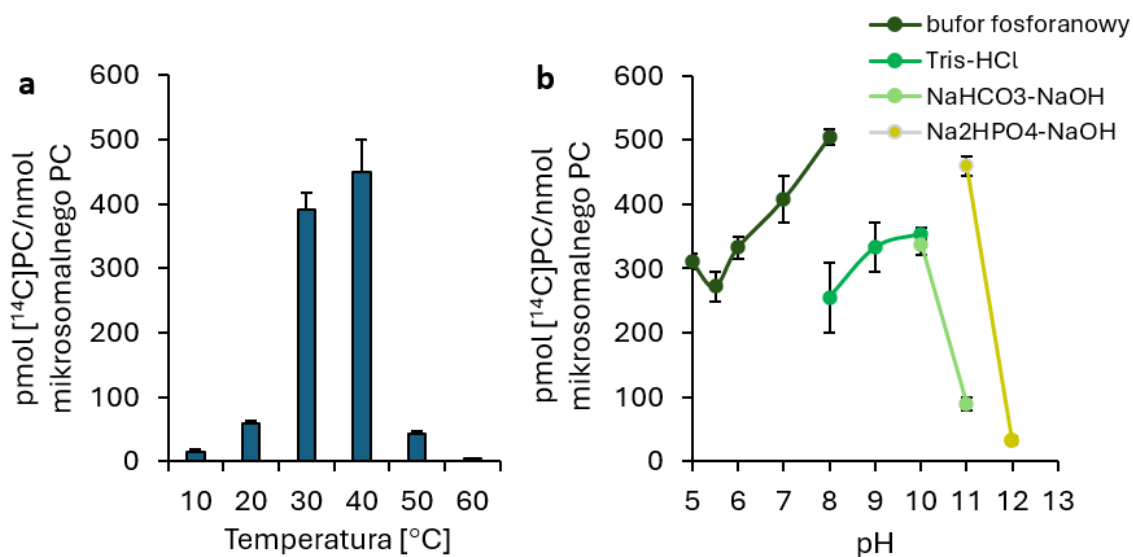
Do czynników zewnętrznych mogących mieć wpływ na intensywność remodelowania PC badanych frakcji mikrosomalnych w procesie katalizowanym przez *PtLPCAT1* należy (między innymi) temperatura, pH buforu inkubacyjnego oraz jony wapnia czy magnezu. Do testów badających wpływ wymienionych powyżej czynników zewnętrznych, wykorzystywane były frakcje mikrosomalne z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC*. Jako donor kwasów tłuszczowych wykorzystywanych w procesie remodelowania PC badanych frakcji mikrosomalnych był zaś [ $^{14}\text{C}$ ]18:1-CoA. W badaniach wcześniejszych wykazane, bowiem zostało, że proces

remodelowania PC tak zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych przebiega najintensywniej gdy donorem kwasów tłuszczowych jest właśnie ten acylo-CoA, a sam proces remodelowania mikrosomalnego PC przebiega w tym wariantcie testu praktycznie wyłącznie w wyniku reakcji typu *backward*; remodelowanie w wyniku powstawania LPC w innego typu reakcjach było znikome (Rys. 32; Tabela S7). W związku z powyższym przeprowadzano tylko jeden wariant testu, bez dodatku DTNB.

Wpływ temperatury był badany w zakresie od 10 °C do 60 °C. Wyniki testów badających wpływ temperatury wykazały, że enzym *PtLPCAT1* najefektywniej przeprowadzał reakcję remodelowania w temperaturze około 40 °C i tylko z nieznacznie niższą intensywnością w temperaturze 30 °C (aktywność zmniejszona tylko o około 13%). W niższych i wyższych temperaturach intensywność remodelowania PC badanych frakcji mikrosomalnych drastycznie spadała. W temperaturze 10 °C i 20 °C wynosiła tylko odpowiednio około 1% i 9,6% najwyższej aktywności odnotowanej w 40 °C. Z kolei w temperaturze 50 °C i 60 °C aktywność *PtLPCAT1* w tym procesie stanowiła odpowiednio około 13% i 3,4% najwyższej aktywności odnotowanej w 40 °C (Rys. 41a).

Wpływ pH na aktywność enzymu *PtLPCAT1* w katalizowaniu wymiany kwasów tłuszczowych PC frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4-PC* na te pochodzące z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA, badano przy wykorzystaniu czterech buforów inkubacyjnych o różnym zakresie pH: 0,1 M bufor fosforanowy (pH 5,0 – 8,0); 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0 – 10,0); 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-NaOH (pH 10,0 – 11,0) i 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH (pH 11,0 – 12,0). Enzym *PtLPCAT1* wykazywał najwyższą aktywność przy pH 8,0 w testach z buforem fosforanowym. Wraz ze spadkiem wartości pH buforu fosforanowego aktywność badanego enzymu spadała prawie liniowo do pH 5,5, po czym przy pH 5,0 lekko wzrosła. Odnotowany spadek aktywności w kwaśnym pH nie był jednak duży i enzym wykazywał nadal wysoką aktywność, która przy pH 5,0 wynosiła aż 62% najwyższej aktywności odnotowanej przy pH 8,0. Gdy zamieniono bufor inkubacyjny z buforu fosforanowego o pH 8,0 na Tris-HCl o pH 8,0, aktywność enzymu *PtLPCAT1* spadła o około 50%. W zakresie pH 8,0-10,0 (bufor Tris-HCl) odnotowano nieliniowy wzrost wydajności reakcji do 70% najwyższej aktywności odnotowanej w pH 8,0 w testach z buforem fosforanowym. Zmiana buforu Tris-HCl o pH 10,0 na bufor NaHCO<sub>3</sub>-NaOH o pH 10,0 nie wpłynęła na zmianę aktywności enzymu *PtLPCAT1*. Przy zastosowaniu buforu NaHCO<sub>3</sub>-NaOH o pH 11,0, intensywność reakcji mocno spadła i wynosiła około 18% najwyższej aktywności odnotowanej przy pH 8,0 (bufor fosforanowy). Jednak przy zmianie tego buforu na bufor Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaOH o tym samym pH intensywność reakcji podniosła się do

wysokiego poziomu wynoszącego około 90% aktywności przy pH 8,0 (bufor fosforanowy). Wzrost zasadowości buforu do pH 12,0 wywołał ostry spadek aktywności *PtLPCAT1*, wynoszącej już tylko około 6% maksymalnej aktywności odnotowanej przy pH 8,0 w testach z buforem fosforanowym (Rys. 41b).



**Rys. 41.** Wpływ temperatury (a) oraz pH buforu inkubacyjnego (b) na intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadekspymujących *PtLPCAT1* wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA promujących zachodzenie reakcji *backward*.

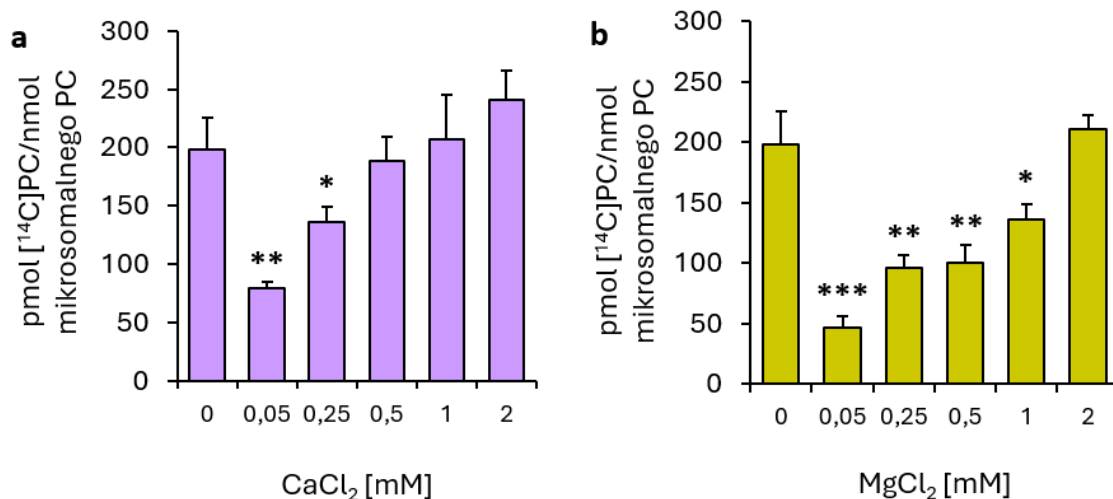
Reakcje prowadzono bez dodatku DTNB przez 30 min; w testach badających wpływ pH w temperaturze 30 °C. Na wykresach przedstawiono uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowym.

Do badania wpływu jonów wapnia oraz jonów magnezu na aktywność typu *backward* enzymu *PtLPCAT1* wykorzystano tego samego rodzaju frakcje mikrosomalne oraz ten sam acylo-CoA jak w testach badających wpływ pH i temperatury. Ze względu na słabą rozpuszczalność jonów wapniowych i magnezowych w buforze fosforanowym, testy tego typu wykonywano z użyciem 0,1 M buforu HEPES (pH 7,2). Wpływ badanych jonów na aktywność typu *backward* *PtLPCAT1* badano w zakresie ich stężeń od 0,05 mM do 2 mM. Kontrolne reakcje enzymatyczne przeprowadzano w środowisku buforu HEPES bez dodatku badanych jonów.

Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno jony wapnia jak i magnezu w niskich stężeniach wpływają hamująco na aktywność enzymu *PtLPCAT1* w reakcjach *backward*. Przy czym hamujący wpływ jonów magnezu był silniejszy niż jonów wapnia, oraz



utrzymywał się nawet przy stężeniu 1 mM. Dodatek jonów wapnia w stężeniu wynoszącym 0,05 mM i 0,25 mM, powodował spadek aktywności *PtLPCAT1* odpowiednio o około 60% i 31%. W tych dwóch przypadkach, hamujący wpływ jonów wapnia był statystycznie istotny. Gdy zwiększono stężenie jonów wapnia do 0,5 mM i 1 mM, enzym *PtLPCAT1* wykazywał podobną aktywność jak w testach kontrolnych (bez dodatku jonów). Można jednak odnotować, że przy stężeniu 0,5 mM aktywność *PtLPCAT1* była niższa o około 5% od aktywności kontrolnej, a przy stężeniu 1 mM była już wyższa o około 4%. Jeszcze wyższe stężenie jonów wapnia wynoszące 2 mM, powodowało zwiększenie intensywności reakcji *backward* katalizowanej przez *PtLPCAT1*; odnotowano 21% wzrost aktywności w porównaniu do aktywności kontrolnej (statystycznie jednak nieistotny). W przypadku jonów magnezu, hamujący ich efekt utrzymywał się nie tylko przy stężeniach 0,05 mM i 0,25 mM, ale też przy kolejnych wyższych stężeniach – 0,5 mM i 1 mM. Jony magnezu w tych stężeniach (0,05 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM) powodowały spadek aktywności enzymu *PtLPCAT1* odpowiednio o około 76%, 51%, 49% i 32%, a odnotowane spadki były statystycznie istotne. Natomiast, jony magnezu w stężeniu 2 mM nie powodowały hamowania reakcji remodelowania mikrosomalnego PC. Aktywność enzymu *PtLPCAT1* była w tym przypadku tylko lekko wyższa od aktywności kontrolnej, o około 6% (Rys. 42).



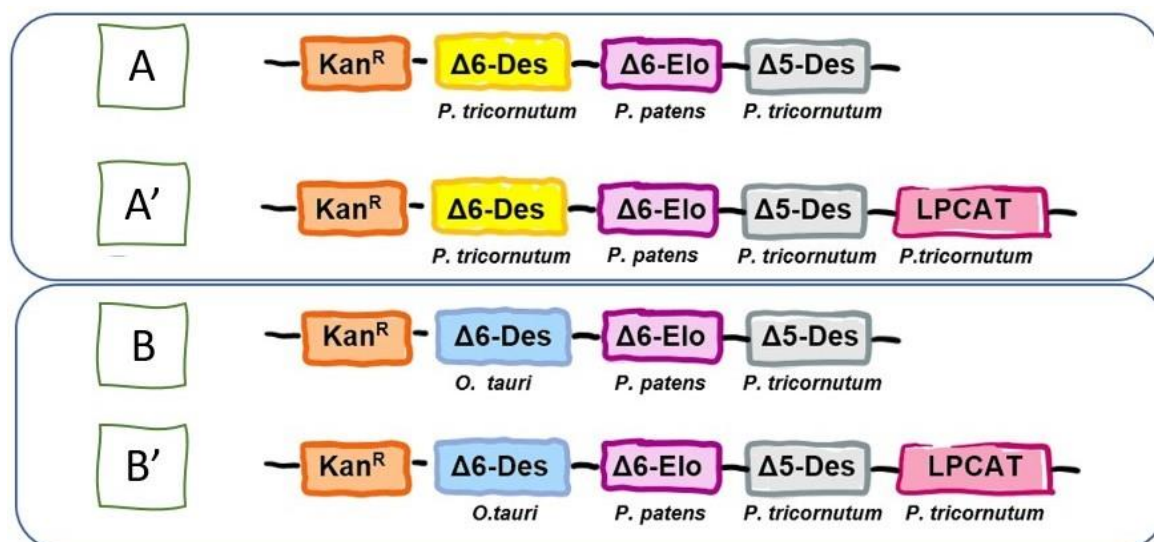
**Rys. 42.** Wpływ jonów wapnia (**a**) oraz magnezu (**b**) na intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* w testach z [<sup>14</sup>C]18:1-CoA promujących zachodzenie reakcji *backward*.

Reakcje prowadzono bez dodatku DTNB przez 30 min w temperaturze 30 °C. Na wykresach przedstawiono uśrednione wyniki wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością w testach bez dodatku jonów (kontrola), a aktywnością w testach z dodatkiem badanego stężenia jonów. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\*\* -  $p \leq 0,001$ , \*\* -  $p \leq 0,01$ , \* -  $p \leq 0,05$ .

#### 4.5. Próba uzyskania transgenicznych roślin *A. thaliana* produkujących bardzo długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe omega-3

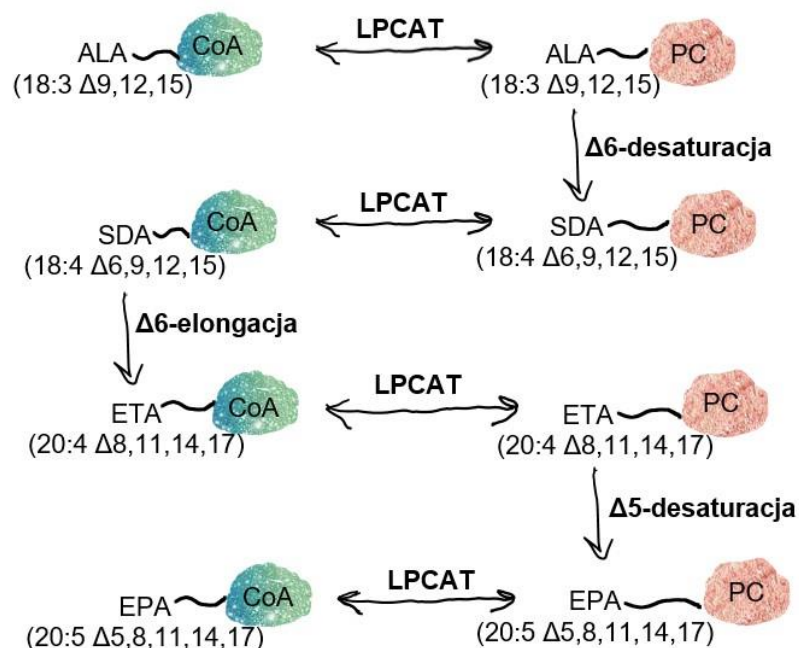
W ramach niniejszej pracy doktorskiej, podjęto próbę uzyskania transgenicznych roślin *Arabidopsis thaliana* przeprowadzających biosyntezę kwasu eikozapentaenowego (EPA; 20:5  $\Delta^{5,8,11,14,17}$ ), który jest bardzo długołańcuchowym wielonienasyconym kwasem tłuszczowym (VLC-PUFA) omega-3. Aby uzyskać roślinę transgeniczną syntetyzującą EPA wymagane jest wprowadzenie do niej genów z innych organizmów, które posiadają zdolność biosyntezy VLC-PUFA. Takimi organizmami są np. glony i grzyby. Produkcję EPA w *A. thaliana* można uzyskać z naturalnie występującego w roślinach kwasu tłuszczowego  $\alpha$ -linolenowego (ALA; 18:3 $\Delta^9, 12, 15$ ), poprzez trzy następujące po sobie etapy:  $\Delta^6$  desaturację,  $\Delta^6$  elongację i  $\Delta^5$  desaturację (Robert i wsp., 2005). Dodatkowym, bardzo ważnym etapem podczas produkcji VLC-PUFA w roślinach, wydaje się być reakcja przeprowadzana przez enzymy typu LPCAT (najlepiej pochodzące z organizmów naturalnie syntetyzujących EPA, ponieważ można zakładać, że posiadają one odpowiednią specyficzność substratową), które mogłyby zwiększać wydajność przepływu kwasów tłuszczowych podczas syntezy EPA pomiędzy pulą fosfolipidów a acylo-CoA (Graham i wsp., 2007; Rys. 44). Na ten moment można znaleźć wiele artykułów naukowych, przedstawiających różne gatunki roślin modyfikowanych genetycznie w kierunku syntezy EPA czy DHA z pozytywnym skutkiem. Jednak, często pojawiającym się problemem jest uzyskanie wysokiej wydajności produkcji tych VLC-PUFA w transgenicznych roślinach (Ruiz-Lopez i wsp., 2013). Dotychczas, podczas tworzenia konstruktów genetycznych zawierających geny kodujące enzymy ze szlaku biosyntezy EPA czy DHA, nie brano pod uwagę enzymu *PtLPCAT1* pochodzącego z *P. tricornutum* naturalnie produkującego wysokie ilości VLC-PUFA. Dlatego w niniejszej pracy doktorskiej, dodatkowym elementem konstruktów genetycznych był właśnie ten gen. Biorąc pod uwagę poszczególne etapy szlaku biosyntezy VLC-PUFA (Rys. 44), stworzono cztery różne konstrukty genetyczne (nazwane A, A', B i B'; Rys. 43) zawierające w różnej kombinacji geny kodujące enzymy:  $\Delta^6$  desaturazę z *P. tricornutum* lub *Ostreococcus tauri*,  $\Delta^5$  desaturazę z *P. tricornutum*,  $\Delta^6$  elongazę z *Physcomitrella patens* oraz badany w obecnej pracy enzym typu LPCAT pochodzący z *P. tricornutum* (*PtLPCAT1*). Każdy z czterech konstruktów genetycznych zawierał dodatkowo gen oporności na antybiotyk kanamycynę (gen selekcyjny), do selekcji transformowanych roślin. Konstrukty wytworzone w tej pracy różniły się między sobą między innymi pochodzeniem  $\Delta^6$  desaturazy. Konstrukty nazwane literą A (A i A') zawierały  $\Delta^6$  desaturazę z *P. tricornutum*, przeprowadzającą desaturację

kwasów tłuszczowych związanych z PC, natomiast konstrukty nazwane literą B (B i B') zawierały  $\Delta^6$  desaturazę z *Ostreococcus tauri*, przeprowadzającą desaturację kwasów tłuszczowych związanych z koenzymem A. W celu sprawdzenia potencjalnego wpływu enzymu *PtLPCAT1* na ewentualną biosyntezę EPA w *A. thaliana* (jeśli taką udałoby się uzyskać), stworzone konstrukty genetyczne A i B nie zawierały genu kodującego *PtLPCAT1*, a konstrukty A' i B' zawierały ten gen (Rys. 43).



**Rys. 43.** Schemat przedstawiający cztery różne konstrukty genetyczne nazwane A, A', B i B', zawierające geny kodujące enzymy biorące udział w biosyntezie kwasu eikozapentaenowego (EPA) będącego bardzo długołańcuchowym wielonienasyconym kwasem tłuszczowym (VLC-PUFA). Konstrukty te wykorzystano do transformacji genetycznej *Arabidopsis thaliana* za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* metodą zanurzania pąków kwiatowych (ang. *floral dip*).

Kan<sup>R</sup> – gen oporności na antybiotyk kanamycynę do selekcji transformowanych roślin,  $\Delta^6$ -Des – enzym  $\Delta^6$  desaturaza z *P. tricornutum* lub *Ostreococcus tauri*,  $\Delta^6$ -Elo – enzym  $\Delta^6$  elongaza z *Physcomitrella patens*,  $\Delta^5$ -Des – enzym  $\Delta^5$  desaturaza z *P. tricornutum*, LPCAT – enzym *PtLPCAT1* pochodzący z *P. tricornutum*.

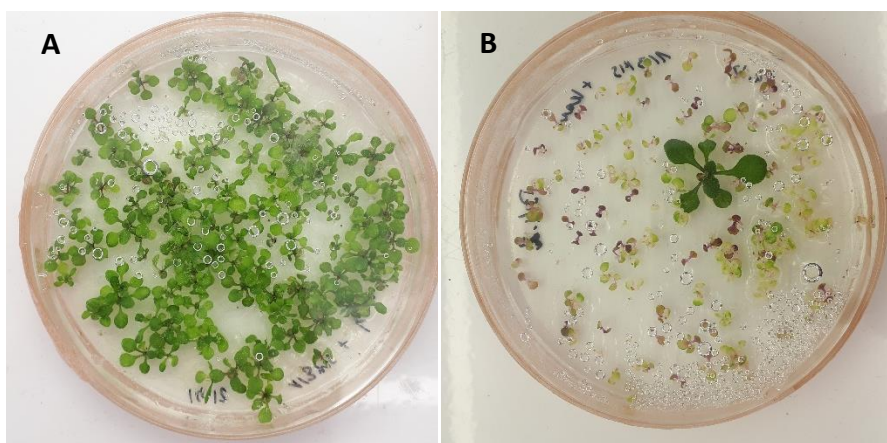


**Rys. 44.** Schemat przebiegu kolejnych reakcji (desaturacji i elongacji) w kierunku biosyntezy kwasu eikozapentaenowego (EPA) z naturalnie występującego w *A. thaliana* kwasu  $\alpha$ -linolenowego (ALA). Dodatkowo na schemacie zademonstrowano hipotetyczny udział enzymu typu LPCAT w procesie syntezy EPA.

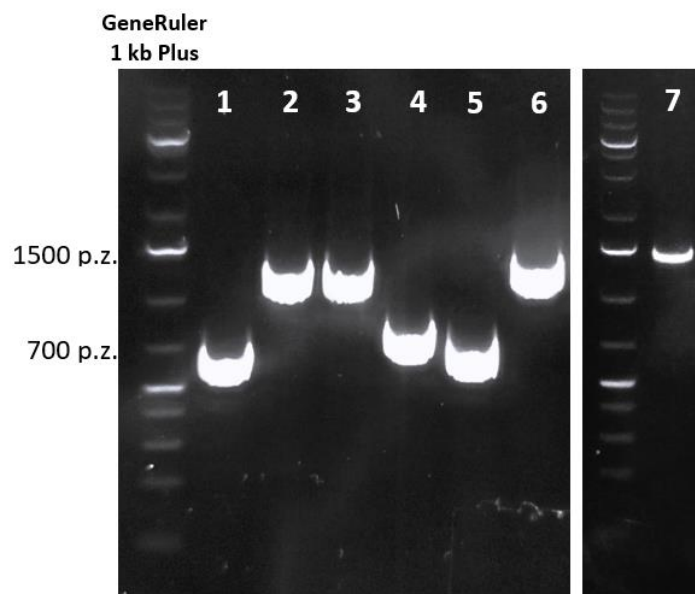
ALA – kwas  $\alpha$ -linolenowy, SDA - kwas stearydynowy, ETA - kwas eikozatetraenowy, EPA – kwas eikozapentaenowy.

Kasety ekspresyjne do transformacji *A. thaliana* tworzono metodą klonowania Golden Gate. Poszczególne etapy przygotowywania wielogenowych konstruktów zostały opisane w rozdziale 3.18. Obecność poszczególnych genów w tworzonych konstruktach była potwierdzana metodą PCR (rozdział 3.18.6) przed przystąpieniem do etapu transformacji *A. thaliana* metodą *floral dip*. Metoda transformacji *A. thaliana* została opisana w rozdziale 3.2. Po transformacji, rośliny hodowano i selekcjonowano zgodnie z metodami opisanymi w rozdziałach 3.1 i 3.3, odpowiednio. Wyselekcjonowane poszczególne linie roślin pokolenia F3, które wyrosły z nasion pokolenia F3 opornych w 100% na antybiotyk kanamycynę, traktowano jako potencjalne homozygoty. Na rysunku 45 przedstawiono przykładową linię nasion pokolenia F3, których siewki były odporne na kanamycynę w 100% oraz taką linię nasion F3, których siewki obumierały po wykiełkowaniu na pożywce z kanamycyną, co świadczyło o braku transgenów. Z liści transgenicznych roślin *A. thaliana* pokolenia F3 wybranych jako potencjalne homozygoty izolowano DNA (metodą opisaną w rozdziale 3.4), które wykorzystywano do

przeprowadzenia reakcji PCR (rozdział 3.18.6) w celu sprawdzenia obecności transgenów. Niestety, nie udało się potwierdzić obecności jednego z transgenów w roślinach *A. thaliana* pokolenia F3, transformowanych konstruktem genetycznym A' (wytypowanych jako homozygoty) – nie potwierdzono obecności genu kodującego *PtLPCAT1*, pomimo wielu prób. Nie pomogła zmiana warunków reakcji PCR takich jak: ilość matrycy DNA dodawanej do reakcji, temperatura przyłączania starterów, stężenie  $MgCl_2$  w mieszaninie reakcyjnej, stężenie polimerazy DNA Taq w mieszaninie reakcyjnej. Ponowne izolowanie DNA z liści badanych roślin *A. thaliana*, również nie przyniosło lepszych rezultatów. Obecność wprowadzanych genów dla wariantu roślin transformowanych konstruktem genetycznym A', próbowano potwierdzić w różnych liniach roślin wytypowanych jako homozygotyczne, co również nie poskutkowało znalezieniem takiej która posiadała by wszystkie wprowadzone geny. W pozostałych trzech wariantach transgenicznych roślin pokolenia F3 transformowanych konstrukciami B, B' i A, udało się potwierdzić obecność wszystkich wprowadzanych genów. Na rysunku 46 przedstawiono przykładowe wyniki reakcji PCR, potwierdzające obecność transgenów w roślinach *A. thaliana*. Natomiast w Tabeli 10 przedstawiono, które geny zidentyfikowano dla poszczególnych wariantów transformowanych *A. thaliana* pokolenia F3.



**Rys. 45.** Selekcja nasion z transformowanych roślin *A. thaliana* na etapie pokolenia F3 na szalkach Petriego ze stałą pożywką  $\frac{1}{3}$  MS zawierającą antybiotyk kanamycynę. Linie nasion pokolenia F3, z których wszystkie siewki były odporne na kanamycynę traktowano jako potencjalne linie homozygotyczne (A). Poszczególne linie nasion pokolenia F3, które po wykiełkowaniu obumierały i nabierały żółtego koloru, traktowano jako linie nieposiadające wprowadzanych genów (B).



**Rys. 46.** Przykładowe produkty reakcji PCR przeprowadzanej z DNA genomowym izolowanym z liści *Arabidopsis thaliana* wyselekcjonowanych po transformacji jako potencjalne homozygoty. Ścieżka nr 1 - gen oporności na kanamycynę; ścieżka nr 2 – gen kodujący  $\Delta^5$  desaturazę z *P. tricornutum*; ścieżka nr 3 – gen kodujący  $\Delta^6$  desaturazę z *P. tricornutum*, ścieżka nr 4 – gen kodujący  $\Delta^6$  elongazę z *Physcomitrella patens*, ścieżka nr 5 – gen oporności na kanamycynę, ścieżka nr 6 – gen kodujący  $\Delta^6$  desaturazę z *Ostreococcus tauri*, ścieżka nr 7 – gen kodujący PtLPCAT1 z *P. tricornutum*.

**Tabela 10.** Obecność poszczególnych genów (sprawdzana za pomocą reakcji PCR) w transgenicznym liniach roślin pokolenia F3, transformowanych poszczególnymi konstrukcjami – A, A', B, B'. Szare pole w tabeli oznacza, że dany konstrukt genetyczny nie zawierał danego genu.

Geny	Linie roślin F3 wyselekcjonowane jako potencjalne homozygoty			
	A	A'	B	B'
Oporność na antybiotyki kanamycynę	+	+	+	+
$\Delta^6$ desaturaza z <i>P. tricornutum</i>	+	+		
$\Delta^6$ desaturaza z <i>O. tauri</i>			+	+
$\Delta^6$ elongaza z <i>P. patens</i>	+	+	+	+
$\Delta^5$ desaturaza z <i>P. tricornutum</i>	+	+	+	+
PtLPCAT1 z <i>P. tricornutum</i>		-		+



Ostatnim etapem eksperymentu dotyczącego modyfikacji genetycznej *A. thaliana*, było sprawdzenie za pomocą metody GC (chromatografia gazowa; metoda opisana w rozdziale 3.9), czy wyselekcjonowane rośliny homozygotyczne z poszczególnych wariantów transformacji (konstruktem A, A', B i B') posiadają nowe kwasy tłuszczowe w tym EPA, oraz czy zaszła u nich zmiana w ilości poszczególnych kwasów tłuszczowych. Pomimo, że nie udało się potwierdzić obecności wszystkich genów u roślin z wariantu transformacji konstruktem A', wybrano jedną linię z tego wariantu transformacji (linia ta nie miała potwierdzonej obecności genu kodującego *PtLPCAT1*; nasiona tej linii były odporne na antybiotyk kanamycynę) do dalszej analizy GC. Skład oraz zawartość kwasów tłuszczowych w wyselekcjonowanych homozygotach, określano w nasionach oraz w częściach nadziemnych (łodygi, liście, łuszczyny, kwiaty, pąki kwiatowe; Rys. 47) odcinanych jako całość do jednej ekstrakcji lipidów, około 40 dnia od wysiania.



**Rys. 47.** Nadziemna część transformowanej *A. thaliana* (liście, łodygi, kwiaty, pąki kwiatowe, łuszczyny) odcinana do ekstrakcji lipidów, około 40 dnia od wysiania nasion. Ekstrakty lipidowe wykorzystano do analizy składu i zawartości kwasów tłuszczowych przy pomocy chromatografii gazowej.



W Tabeli 11 przedstawiono wyniki analizy składu oraz zawartości kwasów tłuszczowych w nasionach poszczególnych transformantów oraz typu dzikiego roślin *A. thaliana*. Natomiast na Rys. 48 zaprezentowano chromatogramy, z przeprowadzonej analizy na chromatografie gazowym, przedstawiające skład oraz zawartość kwasów tłuszczowych w ekstraktach lipidowych z części nadziemnych transformowanych roślin *A. thaliana* pokolenia F3 i typu dzikiego oraz w ekstraktach lipidowych z nasion transformowanych roślin pokolenia F3 i typu dzikiego. Odnotowane wyniki wskazują, że skład kwasów tłuszczowych w nasionach pokolenia F3 pozostał taki sam jak w typie dzikim *A. thaliana* – nie zaobserwowano syntezy nowych kwasów tłuszczowych. Dodatkowo procentowa zawartość kwasów tłuszczowych raczej pozostała taka sama, a ewentualne różnice pomiędzy nasionami roślin transformowanych a roślin typu dzikiego, były na tyle niskie, że ciężko jest ocenić czy są one wynikiem przeprowadzonej transformacji czy też różnice wynikają z odrębnych powtórzeń technicznych procesu izolacji lipidów. Skład kwasów tłuszczowych badanych nasion (zarówno WT jak i transformowanych linii *A. thaliana*) był następujący: kwas palmitynowy (16:0), kwas palmitoleinowy (16:1 $\Delta^9$ ), kwas stearynowy (18:0), kwas oleinowy (18:1 $\Delta^9$ ), izomer kwasu oleinowego (18:1 $\Delta^{11}$ ), kwas linolowy (18:2), kwas linolenowy (18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ); kwas arachidowy (20:0), kwas cis- $\Delta^{11}$ -eikozenowy (20:1 $\Delta^{11}$ ), izomer kwasu eikozenowego (20:1 $\Delta^{13}$ ), kwas cis- $\Delta^{8,11}$ -eikozadienowy (20:2) oraz kwas erukowy (22:1). Bardzo dokładnie analizując uzyskane wyniki, można zauważyć około jednoprocenowy wzrost zawartości kwasu oleinowego (18:1 $\Delta^9$ ) w nasionach wszystkich czterech wariantów roślin transgenicznych, oraz kwasu linolowego (18:2) w nasionach roślin transgenicznych transformowanych plazmidem A, A', B i B', w porównaniu do kontroli (WT). Odnotowano również spadek zawartości kwasu cis- $\Delta^{11}$ -eikozenowego (20:1) o około 1% w nasionach roślin transformowanych konstrukcjami genetycznymi A i B oraz o około 2% w przypadku nasion roślin transformowanych konstruktem B' (Tabela 11).

Procentową zawartość oraz skład kwasów tłuszczowych sprawdzono również w częściach nadziemnych transformowanych roślin *A. thaliana* oraz w typie dzikim. Analiza na GC, ekstraktów lipidowych z części nadziemnych badanych roślin, nie wykazała produkcji nowych kwasów tłuszczowych ze szlaku biosyntezy EPA. Części nadziemne badanych roślin *A. thaliana* (zarówno WT jak i badanych transformantów) zawierały następujące kwasy tłuszczowe: kwas palmitynowy (16:0), kwas palmitoleinowy (16:1 $\Delta^9$ ), cis- $\Delta^{7,10,13}$ -heksadekatrienowy (16:3), kwas stearynowy (18:0), kwas oleinowy (18:1 $\Delta^9$ ), izomer kwasu oleinowego (18:1 $\Delta^{11}$ ), kwas linolowy (18:2), kwas linolenowy

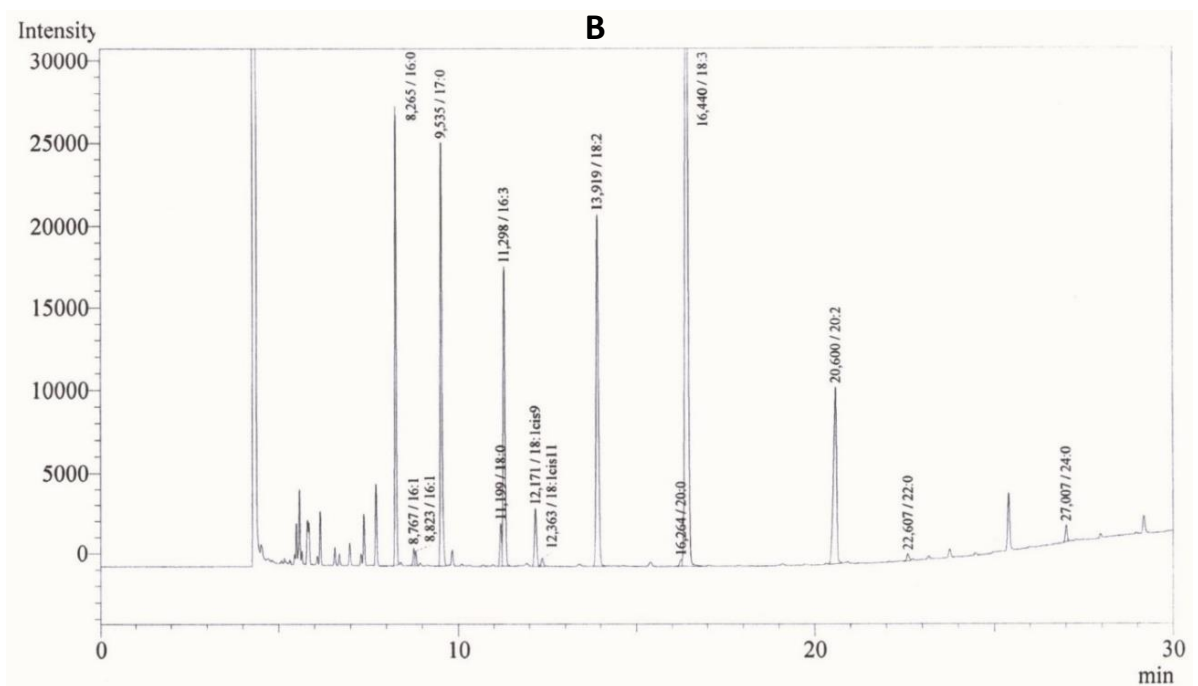
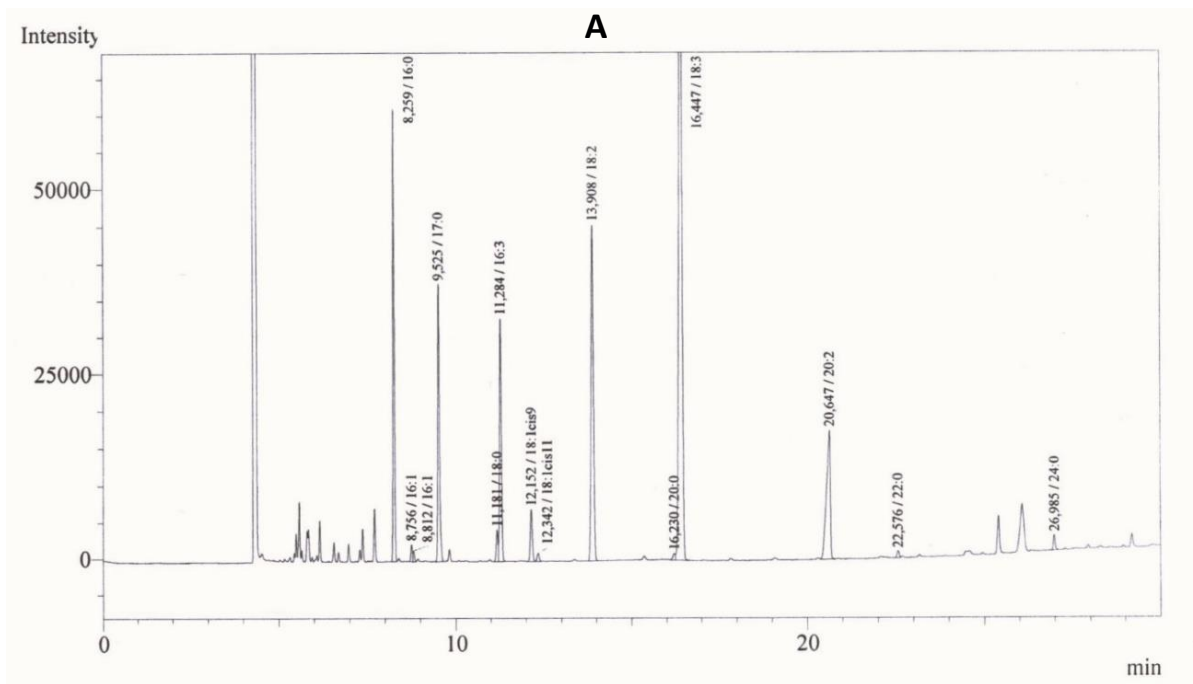
(18:3  $\Delta^{9,12,15}$ ); kwas arachidowy (20:0), kwas cis- $\Delta^{8,11}$ -eikozadienowy (20:2), kwas behenowy (22:0) i lignocerynowy (24:0). Po przeanalizowaniu procentowej zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w badanych ekstraktach, można odnotować drobne zmiany u transformowanych roślin w porównaniu do typu dzikiego *A. thaliana*. Procentowa zawartość kwasu heksadekatrienowego (16:3) w częściach nadziemnych rośliny z wariantu transformacji B i B' wzrosła o około 1-2% w porównaniu do kontroli. Z kolei zawartość kwasu oleinowego (18:1 $\Delta^9$ ) w nadziemnych częściach roślin spadła o około 1% w przypadku wszystkich czterech wariantów transformowanej *A. thaliana*. Zawartość kwasu linolowego (18:2) spadła o około 1% w częściach nadziemnych roślin transformowanych konstruktem genetycznym B'. Następnym kwasem tłuszczowym, którego procentowa zawartość w częściach nadziemnych transformowanych roślin się zmieniła, był kwas linolenowy (18:3 $\Delta^{9,12,15}$ ) – w roślinach wariantu A' i B odnotowano około dwuprocentowy wzrost zawartości, a w wariacie B' transgenicznej rośliny odnotowano około 4% wzrost. W częściach nadziemnych roślin transgenicznych wariantu B', odnotowano również około 2% spadek zawartości kwasu cis- $\Delta^{8,11}$  eikozadienowego (20:2), w porównaniu do typu dzikiego (Tabela 12).

**Tabela 11.** Skład kwasów tłuszczowych lipidów nasion *A.thaliana*, pochodzących z transformowanych linii *A. thaliana* pokolenia F3 (wytypowanych jako homozygotyczne), uzyskanych po transformacji czterema różnymi konstrukcjami genetycznymi (A, A', B, B') oraz pochodzących z roślin typu dzikiego (WT).

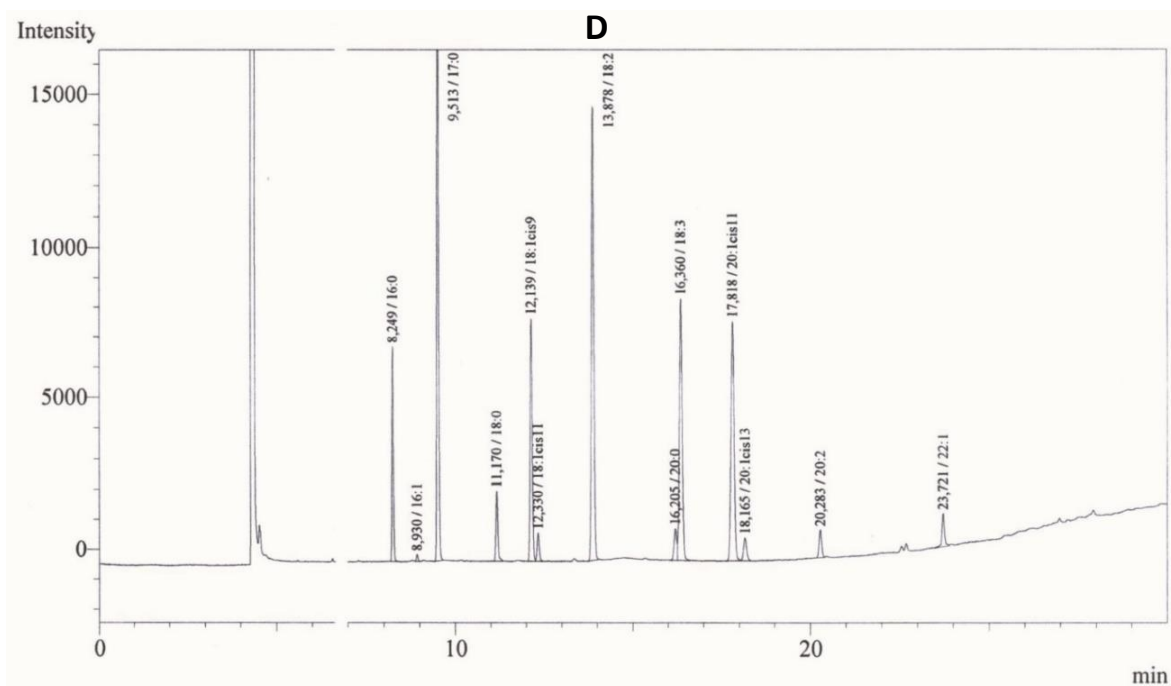
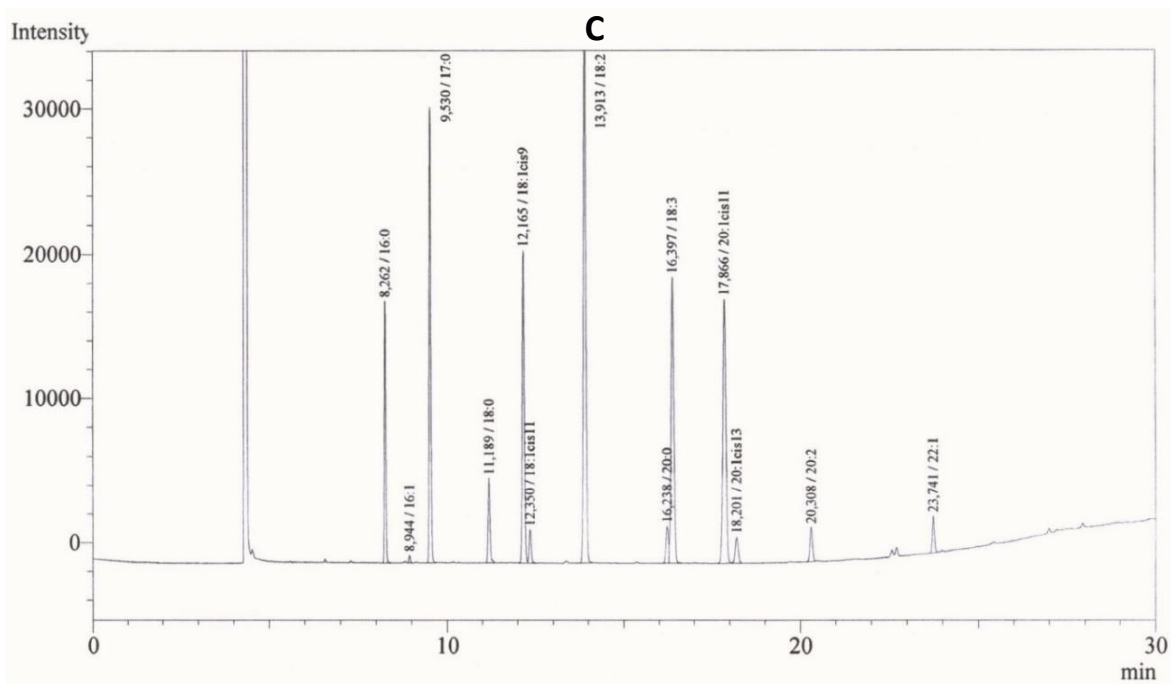
Kwasy tłuszczowe	% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych				
	WT	A	A'	B	B'
<b>16:0</b>	8,3±0,8	8,6±0,3	8,1±0,2	8,7±0,5	8,4±0,4
<b>16:1Δ<sup>9</sup></b>	0,3±0,01	0,3±0,01	0,3±0,01	0,3±0,0	0,3±0,01
<b>18:0</b>	3,6±0,01	3,7±0,3	3,7±0,2	3,7±0,3	3,9±0,2
<b>18:1Δ<sup>9</sup></b>	12,9±0,1	14,0±0,2	14,0±0,1	14,1±0,2	14,3±0,3
<b>18:1Δ<sup>11</sup></b>	1,6±0,05	1,5±0,02	1,5±0,1	1,5±0,02	1,5±0,03
<b>18:2Δ<sup>9,12</sup></b>	27,3±0,3	28,5±0,2	27,9±0,7	28,4±0,2	28,7±0,05
<b>18:3Δ<sup>9,12,15</sup></b>	18,4±0,8	17,6±0,1	18,4±0,5	17,8±0,2	17,7±0,05
<b>20:0</b>	2,3±0,1	2,2±0,0	2,15±0,1	2,1±0,1	2,1±0,03
<b>20:1Δ<sup>11</sup></b>	19,7±0,8	18,5±0,1	18,9±0,4	18,3±0,2	17,9±0,2
<b>20:1Δ<sup>13</sup></b>	1,9±0,1	1,8±0,04	1,7±0,05	1,8±0,04	1,7±0,03
<b>20:2Δ<sup>8,11</sup></b>	1,8±0,2	1,8±0,03	1,9±0,1	1,8±0,05	1,9±0,03
<b>22:1Δ<sup>13</sup></b>	2,0±0,4	1,7±0,0	1,7±0,03	1,6±0,05	1,7±0,03
<b>18:3Δ<sup>6,9,12</sup></b>	–	–	–	–	–
<b>18:4Δ<sup>6,9,12,15</sup></b>	–	–	–	–	–
<b>20:4Δ<sup>8,11,14,17</sup></b>	–	–	–	–	–
<b>20:5Δ<sup>5,8,11,14,17</sup></b>	–	–	–	–	–

**Tabela 12.** Skład kwasów tłuszczowych w nadziemnych częściach roślin *A.thaliana* (łodygi, liście, pąki kwiatowe, kwiaty oraz łuszczyzny analizowane łącznie) pochodzących z transformowanych linii *A. thaliana* pokolenia F3 (wytypowanych jako homozygotyczne) uzyskanych po transformacji czterema różnymi konstruktami genetycznymi (A, A', B, B') oraz pochodzących z roślin typu dzikiego (WT).

Kwasy tłuszczowe	% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych				
	WT	A	A'	B	B'
<b>16:0</b>	13,7±0,9	13,7±0,3	14,4±0,4	13,5±0,2	13,5±0,7
<b>16:1Δ<sup>9</sup></b>	1,0±0,1	0,7±0,2	0,9±0,1	1,1±0,2	1,1±0,1
<b>16:3Δ<sup>7,10,13</sup></b>	9,3±1,8	9,9±0,02	9,0±0,8	10,6±0,0	11,0±0,4
<b>18:0</b>	1,7±0,03	1,2±0,1	1,3±0,2	1,3±0,1	1,2±0,02
<b>18:1Δ<sup>9</sup></b>	3,6±1,8	2,5±0,1	2,5±0,6	2,3±0,2	2,1±0,04
<b>18:1Δ<sup>11</sup></b>	0,5±0,3	0,5±0,01	0,4±0,1	0,4±0,1	0,4±0,05
<b>18:2Δ<sup>9,12</sup></b>	17,3±2,3	17,1±0,2	16,4±0,5	16,5±0,8	16,1±0,5
<b>18:3Δ<sup>9,12,15</sup></b>	41,5±2,4	42,4±0,3	43,7±1,9	43,2±1,8	45,7±1,6
<b>20:0</b>	0,5±0,3	0,4±0,01	0,4±0,1	0,3±0,04	0,3±0,1
<b>20:2Δ<sup>8,11</sup></b>	10,1±0,3	10,7±0,3	10,0±1,0	9,7±2,9	7,8±1,9
<b>22:0</b>	0,3±0,04	0,3±0,0	0,3±0,04	0,3±0,04	0,3±0,02
<b>24:0</b>	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,6±0,04
<b>18:3Δ<sup>6,9,12</sup></b>	–	–	–	–	–
<b>18:4Δ<sup>6,9,12,15</sup></b>	–	–	–	–	–
<b>20:4Δ<sup>8,11,14,17</sup></b>	–	–	–	–	–
<b>20:5Δ<sup>5,8,11,14,17</sup></b>	–	–	–	–	–



**Rys. 48.** Przykładowe wyniki analizy na chromatografii gazowej przedstawiające skład i zawartość kwasów tłuszczowych w ekstraktach lipidowych izolowanych z części nadziemnych transformowanych roślin *A. thaliana* pokolenia F3 (**A**), części nadziemnych *A. thaliana* typu dzikiego (**B**), nasion transformowanych *A. thaliana* pokolenia F3 (**C**) i nasion *A. thaliana* typu dzikiego (**D**).



**Rys. 48 cd.** Przykładowe wyniki analizy na chromatografii gazowej przedstawiające skład i zawartość kwasów tłuszczowych w ekstraktach lipidowych izolowanych z części nadziemnych transformowanych roślin *A. thaliana* pokolenia F3 (A), części nadziemnych *A. thaliana* typu dzikiego (B), nasion transformowanych *A. thaliana* pokolenia F3 (C) i nasion *A. thaliana* typu dzikiego (D).

## 5. DYSKUSJA

### 5.1. Acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid

Enzymy typu LPLAT (acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid) pełnią kluczową rolę w metabolizmie lipidów zarówno w organizmach eukariotycznych jak i prokariotycznych. Enzymy te można podzielić na odpowiednie grupy, różniące się specyficnością substratową w stosunku do akceptora kwasów tłuszczowych (lizofosfolipidu – LPL). Takimi akceptorami kwasów tłuszczowych są: LPA (kwas lizofosfatydowy), LPE (lizofosfatydyloetanolamina), LPC (lizofosfatydylocholina), LPS (lizofosfatydyloseryna), LPI (lizofosfatydyloinozytol), LPG (lizofosfatydyloglicerol). W zależności od tego, do jakiego akceptora kwasów tłuszczowych dany enzym typu LPLAT wykazuje najwyższą specyficzność, nadaje się mu nazwę pochodzącą od tego właśnie akceptora kwasów tłuszczowych (Jasieniecka-Gazarkiewicz i wsp., 2016; Klińska i wsp., 2019). Główna reakcja katalizowana przez LPLATy polega na odłączaniu reszty acylowej od koenzymu A i przyłączeniu jej do odpowiedniego lizofosfolipidu, w wyniku czego syntetyzowany jest odpowiedni fosfolipid (reakcje typu *forward*). Udokumentowano również, że enzymy typu LPLAT mogą przeprowadzać reakcje odwrotne, w których odłączają one resztę acylową od fosfolipidu i przyłączają ją do koenzymu A, produkując odpowiedni lizofosfolipid oraz acylo-CoA (reakcje typu *backward*). Zdolność LPLATów do przeprowadzania reakcji w obydwu kierunkach, czyni je ważnymi enzymami, które mogą modyfikować skład lipidów membranowych w celu zachowania odpowiedniej struktury membran komórkowych np. w odpowiedzi na zmianę temperatury. Roślinne enzymy typu LPLAT, a szczególnie te charakteryzujące się główną aktywnością typu LPCAT (preferujące lizofosfatydylocholinę jako akceptor kwasów tłuszczowych), zostały dotychczas stosunkowo dobrze poznane. Uważa się, że enzymy typu LPCAT w roślinach odgrywają ważną rolę np. w dostarczaniu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych przeznaczonych do syntezy triacylogliceroli (TAG) poprzez wzbogacanie puli cytoplazmatycznego acylo-CoA w kwasy tłuszczowe pochodzące z PC (fosfatydylocholina - główny lipid membran komórkowych) czyli miejsca ich biosyntezy (Lager i wsp., 2013; Pan i wsp., 2015).

Ze względu na brak danych literaturowych dotyczących enzymów typu LPCAT pochodzących z mikroalg, głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było zidentyfikowanie genu/ów kodujących tego typu enzymy, a następnie zbadanie właściwości biochemicznych i specyficzności substratowej zidentyfikowanych LPCATów

pochodzących z okrzemka *Phaeodactylum tricornerutum*. Mikroalga ta jest jednym z organizmów modelowych w badaniach nad okrzemkami z kilku istotnych powodów. Przede wszystkim, posiada ona w pełni zsekwencjonowany genom, co jest niezwykle przydatne w badaniach nad funkcjami genów (Bowler i wsp., 2008). Ponadto, *P. tricornerutum* wykazuje szybkie tempo wzrostu w warunkach laboratoryjnych, co ułatwia przeprowadzanie na nim badań biologicznych. *P. tricornerutum* oraz inne mikroalgi są zdolne do produkcji znacznych ilości długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3, w szczególności kwasu eikozapentaenowego (EPA; Ozcan i Ovez, 2022). Naturalna produkcja EPA przez *P. tricornerutum* może sięgać do 35% wszystkich kwasów tłuszczowych w tej okrzemce (Hamilton i wsp., 2014). Jednak proces tak wydajnej biosyntezy VLC-PUFAs u *P. tricornerutum* i innych mikroalg nie został jeszcze w pełni poznany. Spekuluje się, że to enzymy typu LPCAT pełnią istotną rolę w biosyntezie VLC-PUFA zachodzącej u mikroalg, poprzez wydajny transfer reszt acylowych pomiędzy PC a pulą acylo-CoA, oraz być może poprzez udział w transporcie VLC-PUFA (np. EPA) do miejsca ich magazynowania (u *P. tricornerutum* są to głównie monogalaktozylodiacyloliglicerole – MGDG; Mühlroth i wsp., 2013), chociaż ta ostatnia (potencjalna) ich funkcja nie jest jeszcze eksperymentalnie udowodniona. Ostatnio, w badaniach związanych z projektem, którego częścią jest również obecna praca doktorska, przeprowadzonych przez You i wsp. (2023), wykazano jednakże, że *PtLPCAT1* jest zlokalizowany w komórce *P. tricornerutum* w zewnętrznej błonie chloroplastu (MGDG zlokalizowane jest głównie w błonach chloroplastowych) łączącej się z błoną retikulum endoplazmatycznego.

W niniejszej pracy, pierwsze badania dotyczyły określenia funkcji sześciu sklonowanych genów z *P. tricornerutum*, które wytypowano, jako potencjalnie kodujące enzymy typu LPLAT (klonowanie wykonane w pracowni Prof. Yangming'a Gong – partnera projektu w ramach, którego wykonywane były również badania związane z obecną pracą doktorską). Źródłem enzymów w przeprowadzanych reakcjach enzymatycznych *in vitro* były frakcje mikrosomalne izolowane z drożdży  $\Delta ALE1$  (pozbawionych głównego enzymu typu LPCAT) transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym określony gen z *P. tricornerutum*. W wyniku przeprowadzenia wstępnych badań, udało się zidentyfikować spośród sześciu badanych enzymów kodowanych przez sklonowane z *P. tricornerutum* geny, jeden enzym typu LPCAT (kodowany przez gen *Phatr3\_J20460*) bardzo aktywny w testach enzymatycznych *in vitro*, któremu nadano nazwę *PtLPCAT1*. Dodatkowo, zidentyfikowano dwa enzymy



wykazujące aktywność typu LPAAT (preferujące kwas lizofosfatydowy jako akceptor kwasów tłuszczowych), które nazwano *PtLPAAT1* oraz *PtLPAAT2*, kodowane przez geny *Phatr3\_J11916* i *Phatr3\_J43099* (odpowiednio). Aktywność typu LPLAT pozostałych badanych enzymów kodowanych przez sklonowane geny: *Phatr3\_J54709*, *Phatr3\_J40461* i *Phatr3\_J48640*, nie była odpowiednio wysoka w testach enzymatycznych *in vitro*, aby uznać je za enzymy tego typu. Trzy zidentyfikowane enzymy typu LPLAT poddano dalszym badaniom biochemicznym. Enzym *PtLPCAT1* badano w kierunku zarówno reakcji *forward* jak i *backward*. Dokładniejsze badania reakcji katalizowanych przez *PtLPCAT1* w kierunku *forward* rozpoczęto od sprawdzenia jego aktywności przy zmieniających się parametrach reakcji takich jak: ilość mikrosomalnego PC, temperatura, czas reakcji, pH buforu inkubacyjnego i wpływ różnych jonów ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  i  $K^+$ ). Kolejnym krokiem było zbadanie specyficzności substratowej wykazywanej przez *PtLPCAT1* w stosunku do różnych donorów kwasów tłuszczowych (w tym do długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych ze szlaku biosyntezy EPA) i akceptorów kwasów tłuszczowych oraz preferencji w stosunku do pozycji *sn-1* i *sn-2* lizofosfatydylocholiny. Aby dowiedzieć się, jakie są różnice i podobieństwa między roślinnymi a okrzemkowymi enzymami typu LPCAT, w kontekście ich specyficzności substratowej w stosunku do kwasów tłuszczowych obecnych w połączeniach z CoA (acylo-CoA), przeprowadzono dodatkowo testy enzymatyczne sprawdzające specyficzność substratową enzymów typu LPCAT pochodzących z rozwijających się nasion *Camelina sativa*. Następne eksperymenty dotyczyły charakterystyki reakcji *backward* katalizowanych przez *PtLPCAT1*. W ramach tych doświadczeń, sprawdzano udział enzymu *PtLPCAT1* w remodelowaniu cząsteczek PC, PE i PA obecnych naturalnie we frakcjach mikrosomalnych z drożdży (zawierających kwasy tłuszczowe naturalnie występujące w komórkach drożdżowych). Dodatkowym wariantem tego doświadczenia, było przeprowadzenie testów enzymatycznych z wykorzystaniem cząsteczek PC innych niż naturalnie występujące w komórkach drożdżowych. Te „nowe” cząsteczki PC zawierały, głównie w pozycji *sn-2*, kwasy tłuszczowe ze szlaku biosyntezy EPA takie jak: 18:3 n-3, 18:3 n-6, 18:4 n-3, 20:4 n-3, 20:5 n-3. Biosyntezę tych „nowych” PC przeprowadzono bezpośrednio przed wykorzystaniem ich do testów promujących reakcje typu *backward*. Specyficzność substratową enzymu *PtLPCAT1* w reakcji *backward* badano również poprzez przeprowadzenie testów kompetencji w stosunku do różnych donorów kwasów tłuszczowych (acylo-CoA) dodawanych razem, w równomolowym stężeniu, do jednej mieszaniny reakcyjnej. W celu porównania wykazywanej preferencji

przez *PtLPCAT1* w testach promujących reakcje *backward* w stosunku do różnych donorów kwasów tłuszczowych (w testach kompetencji), z preferencją LPCATów pochodzących z innych organizmów niż okrzemki, przeprowadzono również testy enzymatyczne z frakcją mikrosomalną drożdży nadeksprymujących *AtLPCAT2* (pochodzącym z *A. thaliana*) oraz z frakcją mikrosomalną z drożdży nadeksprymujących *ALE1* (główny drożdżowy LPCAT). Dodatkowo badano wpływ temperatury, pH buforu inkubacyjnego oraz jonów wapnia i magnezu obecnych w mieszaninie reakcyjnej na aktywność remodelowania PC badanych frakcji mikrosomalnych w testach promujących reakcje typu *backward*, przez *PtLPCAT1*.

## 5.2. Reakcje typu *forward* przeprowadzane przez *PtLPCAT1*

Odnotowane w pracy wyniki testów wskazują, że enzym *PtLPCAT1* najefektywniej akceptował w reakcji *forward* nienasycone kwasy tłuszczowe dodawane do mieszaniny reakcyjnej w postaci acylo-CoA. Najwyższą aktywność *PtLPCAT1* wykazał w stosunku do 18:4-CoA, a następnie do 18:3-CoA n-3 > 20:4-CoA n-3 > 18:3-CoA n-6 > 22:6-CoA n-3 > 16:1-CoA n-7 > 20:5-CoA n-3 > 18:1-CoA n-9 > 18:2-CoA n-6. Natomiast nasycone kwasy tłuszczowe, były bardzo słabo lub w ogóle nie były akceptowane przez enzym *PtLPCAT1*. Zaskakująco niską aktywność odnotowano również wobec dwóch nienasyconych kwasów tłuszczowych – 20:3-CoA n-3 i 20:4-CoA n-6. Biorąc pod uwagę niską aktywność do 20:4-CoA n-6 oraz wysoką do 20:4-CoA n-3, można wysnuć wniosek, że dla enzymu *PtLPCAT1* nie tylko istotna jest ilość podwójnych wiązań, ale także ich położenie w łańcuchu węglowodorowym danego kwasu tłuszczowego. Specyficzność substratowa testowanego *PtLPCAT1* wobec acylo-CoA zawierających 18-węglowe nienasycone kwasy tłuszczowe była podobna do specyficzności substratowej roślinnych enzymów typu LPCAT (Klińska i wsp., 2019; Lager i wsp., 2013). Można było jednak odnotować pewne różnice w specyficzności substratowej w stosunku do acylo-CoA zawierających nasycone kwasy tłuszczowe; roślinne enzymy typu LPCAT wykorzystywały je lepiej w reakcjach *forward* niż *PtLPCAT1*. W badaniach prezentowanych przez Zheng i wsp. (2012) oraz Klińska i wsp. (2019), dotyczących LPCATów pochodzących z *B. napus* i *C. sativa* (odpowiednio), odnotowano wyższą aktywność w stosunku do 16:0-CoA i 18:0-CoA niż aktywność badanego w tej pracy *PtLPCAT1* do tych nasyconych kwasów tłuszczowych. Klińska i wsp. (2019) odnotowali również, że enzymy LPCAT pochodzące z *C. sativa* nie wykorzystują 20:1-CoA oraz 22:1-CoA do reakcji *forward*, tak samo jak testowany

w obecnej pracy *PtLPCAT1*. Wyniki niniejszych badań, dotyczących LPCATów frakcji mikrosomalnych izolowanych z dojrzewających nasion *C. sativa*, wskazują na śladową ich aktywność w stosunku do 20:3-CoA n-3 i 20:4-CoA n-6, podobnie jak to miało miejsce w przypadku *PtLPCAT1*. Jednakże w przeciwieństwie do *PtLPCAT1*, badane enzymy LPCAT pochodzące z rozwijających się nasion *C. sativa* wykazały również bardzo niską aktywność do 20:4-CoA n-3 i 20:5-CoA n-3 oraz zaskakująco wysoką aktywność do 22:6-CoA n-3. Na ten moment, nie ma innych doniesień naukowych dotyczących specyficzności substratowej roślinnych LPCATów w stosunku do VLC-PUFA.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki, dotyczące specyficzności substratowej *PtLPCAT1* w stosunku do donorów kwasów tłuszczowych w reakcjach typu *forward*, są zgodne z wcześniejszymi przypuszczeniami, że *PtLPCAT1* może odgrywać ważną rolę w biosyntezie VLC-PUFA. Przeprowadzone testy wykazały wysoką aktywność enzymu *PtLPCAT1* w stosunku do 20:4-CoA n-3. Ten wynik zgadza się z proponowanym szlakiem biosyntezy EPA i DHA u *P. tricornutum*, poprzez kwas tłuszczowy 20:4 n-3 a nie poprzez 20:4 n-6 (Zulu i wsp., 2018). Biorąc pod uwagę, że  $\Delta^5$  desaturacja kwasu tłuszczowego 20:4 (ETA) do 20:5 (EPA) zachodzi w PC i jest to ostatni etap szlaku biosyntezy EPA, aktywność *PtLPCAT1* (włączająca 20:4 n-3 do PC) poprzedzająca tę desaturację może odgrywać kluczową rolę w biosyntezie wysokiego poziomu EPA u *P. tricornutum*. Ponadto, kwas ETA stanowi tylko około 2,2% profilu kwasów tłuszczowych w *P. tricornutum* hodowanym w normalnych warunkach wzrostu (Zulu i wsp., 2018) co sugeruje, że ETA po wprowadzeniu do PC przez *PtLPCAT1* szybko ulega desaturacji do EPA. Praktycznie zerowa aktywność enzymów LPCAT pochodzących z rozwijających się nasion *C. sativa* w stosunku do 20:4-CoA n-3, wykazana w tej dysertacji, pozwala na wysnucie przypuszczenia, że znacząca aktywność *PtLPCAT1* w stosunku do 20:4 n-3, może potencjalnie eliminować wąskie gardło (ang. *bottleneck*) ograniczające wydajną biosyntezę EPA i DHA w transgenicznym roślinach oleistych (Domergue i wsp., 2005). Potwierdzenie tego założenia wymaga jednak dalszych badań, w których można by określić wpływ *PtLPCAT1* w roślinach transgenicznych transformowanych genem kodującym ten enzym oraz pozostałymi genami kodującymi enzymy ze szlaku biosyntezy EPA.

W testach badających aktywność *PtLPCAT1* w reakcji *forward*, enzym ten wykazał 11 razy wyższą aktywność w stosunku do pozycji *sn-2* niż do pozycji *sn-1* lizofosfatydylocholiny, gdy donorem kwasów tłuszczowych był 18:1-CoA. Podobny wynik uzyskali Lager i wsp. (2013), którzy badali enzymy LPCAT1 i LPCAT2

pochodzące z *A. thaliana*. Były one 7-8 razy bardziej aktywne w stosunku do pozycji *sn-2* niż do pozycji *sn-1* lizofosfatydylocholiny, gdy donorem acyli był również 18:1-CoA. Klińska i wsp. (2019) również uzyskali podobny wynik w badaniach prowadzonych nad enzymami typu LPCAT pochodzącymi z *C. sativa*, które były około 8 razy bardziej aktywne w stosunku do pozycji *sn-2* niż do pozycji *sn-1* LPC. *PtLPCAT1* wykazuje więc podobną preferencję jak inne LPCATy roślinne w stosunku do acylacji miejsc *sn-1* i *sn-2* lizofosfatydylocholiny.

W testach sprawdzających specyficzność substratową w stosunku do akceptora kwasów tłuszczowych (lizofosfolipidu), *PtLPCAT1* wykazywał oprócz aktywności w stosunku do LPC, która była najwyższa, również aktywność w stosunku do LPE (w testach, w których dodawano jeden rodzaj LPL na test). Różnica pomiędzy wykazywaną aktywnością enzymu *PtLPCAT1* w stosunku do LPC i LPE, była mniejsza niż w przypadku różnic w aktywności innych LPCATów roślinnych w stosunku do tych akceptorów kwasów tłuszczowych. Stosunek wykazywanej aktywności do LPC i LPE przez *PtLPCAT1* był bardziej podobny do tego wykazywanego przez drożdżowy ALE1. Brak jest jednak danych literaturowych, w których badano by aktywność LPCATów w testach z obecnością różnych lizofosfolipidów w jednej mieszaninie reakcyjnej. Takie badania zostały przeprowadzone w niniejszej pracy nad *PtLPCAT1*. Wykazały one pewne różnice, pomiędzy testami prowadzonymi z dodatkiem różnych rodzajów LPL do jednej mieszaniny reakcyjnej a testami, w których do mieszanin reakcyjnych dodawano tylko jeden rodzaj LPL. Co prawda gdy w mieszaninie reakcyjnej znajdowały się różne lizofosfolipidy badany *PtLPCAT1* nadal najefektywniej acylował LPC, jednak różnica pomiędzy aktywnością w stosunku do LPE i do LPC była większa (zarówno gdy donorem kwasów tłuszczowych był 18:1-CoA jak i 18:3-CoA) niż w testach z tymi lizofosfolipidami dodawanymi do testów pojedynczo. Dodatkowo w testach kompetencji (różne lizofosfolipidy dodawane w równomolowych stężeniach do mieszaniny reakcyjnej) *PtLPCAT1* przeprowadzał również acylację LPS i LPG gdy donorem kwasów tłuszczowych był 18:1-CoA, w przeciwieństwie do testów w których różne LPL były dodawane osobno – *PtLPCAT1* nie wykazywał wtedy aktywności do LPS i LPG. W testach, w których różne LPL były obecne w jednej mieszaninie reakcyjnej, aktywność badanego *PtLPCAT1* w stosunku do różnych LPL zależała od rodzaju użytego acylo-CoA do reakcji. W testach w których wykorzystywano 18:3-CoA, *PtLPCAT1* nie wykazywał aktywności w stosunku do LPS, w przeciwieństwie do testów z 18:1-CoA, gdzie aktywność do LPS była wyższa niż do LPE. W pracy przetestowano również wpływ

różnych cząsteczek LPC na aktywność *PtLPCAT1*. Tego typu testy wykazały, że *PtLPCAT1* wykazywał najwyższą aktywność do 16:0-LPC, a następnie do 18:1-LPC i 18:0-LPC. Natomiast 20:0-LPC był bardzo słabo wykorzystywany przez *PtLPCAT1* – aktywność enzymu była bliska zera. Dotychczasowe badania nad LPCATami opierały się głównie na wykorzystywaniu tylko 18:1-LPC do przeprowadzanych reakcji katalizowanych przez te enzymy (Jasieniecka-Gazarkiewicz i wsp., 2016; Klińska i wsp., 2019; Ståhl i wsp., 2008). Nie można więc porównać specyficzności substratowej badanego przez nas *PtLPCAT1* ze specyficznością innych roślinnych LPCATów w stosunku do różnych „gatunków” LPC. Lager i wsp. (2013) w swoich badaniach użyli w prawdzie również ric-LPC (LPC z kwasem rycynowym) i uzyskali niższą aktywność roślinnych LPCATów niż w testach z użyciem 18:1-LPC jednakże w naszych badaniach nie stosowaliśmy tego „gatunku” LPC, więc i w tym przypadku nie można tych danych skonfrontować z aktywnością *PtLPCAT1*.

### **5.3. Reakcje typu *backward* przeprowadzane przez *PtLPCAT1* i reakcje „innego” typu włączone w proces remodelowania fosfolipidów - głównie fosfatydylocholin**

Badany w pracy *PtLPCAT1* w testach promujących reakcje *backward* z mikrosomami z drożdży nadekspymującymi ten enzym posiadającymi jedynie naturalnie występujące w komórkach drożdżowych kwasy tłuszczowe, najefektywniej wymieniał kwasy tłuszczowe w PC tego typu mikrosomów na te pochodzące z 18:1-CoA, 18:2-CoA i 18:3-CoA. W przypadku obecności w mieszaninie reakcyjnej dwu pierwszych z tych acylo-CoA, większość tej wymiany zachodziła w wyniku reakcji typu *backward*, natomiast w przypadku 18:3-CoA w około połowie wymiana następowała w wyniku tego typu reakcji a reszta w wyniku innych reakcji generujących LPC. W przypadku obecności w mieszaninie reakcyjnej 16:0-CoA lub 18:0-CoA w wyniku reakcji typu *backward* wymiana kwasów tłuszczowych w mikrosomalnym PC nie następowała. Pewną wymianę można było jednak zaobserwować w wyniku innych reakcji generujących LPC. Słabe wykorzystywanie acylo-CoA z nasyconymi kwasami tłuszczowymi i stosunkowo dobre wykorzystywanie acylo-CoA z kwasami nienasyconymi było, więc podobne w obu typach reakcji przeprowadzanych przez *PtLPCAT1* tj, zarówno w reakcjach typu *forward* jak i reakcjach typu *backward* (w których *PtLPCAT1* remodelował PC naturalnie występujące we frakcjach mikrosomalnych z drożdży). Wyniki te są podobne do wyników uzyskanych przez Jasieniecka-Gazarkiewicz i wsp. (2023), w których wykazano, że roślinny enzym *AtLPCAT2* (pochodzący z *Arabidopsis*) remodelował mikrosomalne PC najintensywniej,

gdy do reakcji dostarczane były nienasycone 18-węglowe kwasy tłuszczowe w formie acylo-CoA (szczególnie 18:1-CoA). W tych samych badaniach Jasienieckiej-Gazarkiewicz i wsp. (2023) odnotowano, że enzym ALE1 (drożdżowy LPCAT) przeprowadzał remodelowanie PC najintensywniej gdy do reakcji były dodawane donory kwasów tłuszczowych zawierające nasycone kwasy tłuszczowe (16:0-CoA i 18:0-CoA); reakcja remodelowania mikrosomalnego PC z udziałem nienasyconych 18-węglowych kwasów tłuszczowych zachodziła mniej intensywnie. Badania przedstawiane przez Klińską i wsp. (2019, 2021) również wskazują na najwyższą aktywność LPCATów frakcji mikrosomalnych pochodzących z nasion i liści *Camelina sativa* w procesie remodelowania PC podczas obecności 18:1-CoA w roztworze inkubacyjnym. Remodelowanie PC badanych frakcji mikrosomalnych drożdży zawierających jedynie naturalnie występujące w nich kwasy tłuszczowe w wyniku generowania LPC w reakcjach innych niż typu *backward* również zależało w pewnym stopniu od rodzaju acylo-CoA obecnego w roztworze inkubacyjnym. Obecność 18:2-CoA i 18:3-CoA generowała prawie dwukrotnie wyższą wyminę w tego typu reakcjach niż obecność pozostałych acylo-CoA (16:0-CoA, 18:0-CoA i 18:1-CoA). Ponieważ do wyliczenia tego typu remodelowania brano różnicę w intensywności remodelowania PC z testów bez dodatku DTNB (mierzących oba rodzaje remodelowania) z mikrosomami nadeksprymującymi *PtLPCAT1* i ich odpowiedników z mikrosomami z drożdży kontrolnych, remodelowanie to wydaje się być również związane z aktywnością *PtLPCAT1*. Tego typu aktywność wykazywana przez inne LPCATy została odnotowana wcześniej przez Jasieniecką-Gazarkiewicz i wsp. (2023).

W testach promujących zachodzenie reakcji *backward*, w których były remodelowane fosfolipidy obecne naturalnie we frakcji mikrosomalnej (poprzez reakcje *backward* a następnie *forward*), enzym *PtLPCAT1* poza wykazywaną aktywnością w stosunku do PC, wykazał również aktywność w stosunku do PA i PE. Jednakże, remodelowanie PA i PE zachodziło mniej efektywnie niż PC, przy czym remodelowanie PA było bardzo niskie – na granicy detekcji. Stosunek pomiędzy ilością remodelowanego PC i PE przez *PtLPCAT1* w wyniku reakcji *backward* był podobny jak stosunek efektywności syntezy tych lipidów w testach promujących reakcje *forward*; zarówno gdy donorem kwasów tłuszczowych był 18:1-CoA jak i 18:3-CoA – zarówno synteza PC jak i jego remodelowanie była/o około 4 razy efektywniejsza/e niż odpowiednio synteza/remodelowanie PE. Wyniki te wskazują, na pewnego rodzaju korelację pomiędzy wykorzystywaniem LPL w reakcji *forward*, i efektywnością remodelowania powstających

z nich PL (poprzez reakcję *backward*, a następnie *forward*) przez enzym *PtLPCAT1*. W badaniach wcześniejszych dotyczących innych LPCATów nie udało się zaobserwować podobnej korelacji pomiędzy specyficnością w wykorzystywaniu poszczególnych lizolipidów do syntezy odpowiadających im lipidów (reakcje typu *forward*) a specyficnością w ich remodelowaniu w wyniku reakcji *backward* (Jasieniecka-Gazarkiewicz i wsp., 2016 i 2023).

W testach, w których badano remodelownie PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* poddanych uprzednio wzbogaceniu o inne niż występujące naturalnie w drożdżach cząsteczki PC, intensywność remodelowania PC tego typu frakcji mikrosomalnych zależała w dużej mierze nie tylko od acylo-CoA znajdującego się w buforze inkubacyjnym, ale również od rodzaju przeprowadzonej modyfikacji. Najintensywniejsze remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej odnotowano gdy frakcje mikrosomalne wzbogacono o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC*. Remodelowanie to przebiegało zarówno w wyniku reakcji typu *backward* jak i w wyniku generowania cząsteczek LPC w innego typu reakcjach. Remodelowanie w reakcjach typu *backward* przebiegało najintensywniej gdy w mieszaninie reakcyjnej znajdował się 18:2-CoA i nieco słabiej w obecności 16:0-CoA; w obecności pozostałych acylo-CoA intensywność tego typu remodelowania cząsteczek PC była znikoma. Remodelowanie zaś cząsteczek PC badanej frakcji mikrosomalnej w wyniku generowania cząsteczek LPC w innego typu reakcjach przebiegało najintensywniej w obecności wszystkich trzech acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi i zdecydowanie słabiej w obecności acylo-CoA z nasyconymi kwasami tłuszczowymi. Remodelowanie tego typu obserwowano praktycznie tylko w pierwszych 30 min inkubacji. Po tym czasie ilość cząsteczek PC zmodyfikowanych tym sposobem, w testach z niektórymi acylo-CoA ulegała nawet zmniejszeniu. Ponieważ po 60 min inkubacji całkowita ilość [<sup>14</sup>C]PC była wyższa niż po 30 min, cząsteczki te mogły ulegać dalszemu remodelowaniu już w wyniku reakcji *backward*. Spośród wszystkich pięciu modyfikacji badanych frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* podobny sposób remodelowania mikrosomalnego PC jak omówiony powyżej odnotowano jedynie dla frakcji mikrosomalnej wzbogaconej w *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC*. W tym przypadku również obserwowano w sposobie remodelowania mikrosomalnego PC duży udział reakcji w których LPC generowane było w wyniku innych reakcji niż reakcje typu *backward* przeprowadzane przez *PtLPCAT1*. W pierwszych 30 min inkubacji w remodelowaniu mikrosomalnego PC tak zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych zdecydowanie przeważały tego typu reakcje. Oprócz tych dwu omówionych modyfikacji,

w remodelowaniu PC frakcji mikrosomalnych z pozostałych trzech modyfikacji (frakcje wzbogacone o:  $sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)$ -PC,  $sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)$ -PC i  $sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)$ -PC) zdecydowaną przewagę miały reakcje typu *backward*. Jak na razie nie możemy jednoznacznie powiedzieć, jaki element struktury „nowych” cząsteczek PC wzbogacających dane frakcje mikrosomalne miał zdecydowany wpływ na rodzaj reakcji związanych z remodelowaniem PC tych frakcji. Ponieważ trudne jest znalezienie jednego wspólnego elementu odróżniającego te kwasy tłuszczowe od kwasów tłuszczowych z pozycji *sn-2* pozostałych modyfikacji należy raczej przyjąć, że decydowała o tym cała struktura tych kwasów. Tak jak to postulowano wcześniej, przy dyskusowaniu sposobów remodelowania PC niemodyfikowanych frakcji mikrosomalnych z drożdży nadekspymujących *PtLPCAT1* wydaje się, że również „inne” sposoby remodelowania PC zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych tego typu drożdży związane są z aktywnością *PtLPCAT1*. Intensywność tego typu remodelowania była, bowiem znacznie wyższa niż ta obserwowana w testach z mikrosomami z drożdży kontrolnych (nietransformowanych genem kodującym *PtLPCAT1*). Nie można jednak wykluczyć, że wprowadzone „nowe” cząsteczki PC, które wywoływały znaczny udział „innych” reakcji w procesie remodelowania mikrosomalnego PC, tj.  $sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)$ -PC i  $sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)$ -PC) były mocno preferowane przez inne enzymy włączone w tworzenie LPC np. odpowiednie lipazy czy enzymy typu PDAT. Potwierdzenie lub zanegowanie tego typu sugestii pozostaje jednak kwestią dalszych badań, niezwiązanych już bezpośrednio z tematyką obecnej pracy.

Proces remodelowania składu kwasów tłuszczowych fosfolipidów, w tym omawianej obecnie fosfatydylocholino, jest dwustopniowy. Najpierw musi dojść do powstania lizofosfolipidu; odłączenie kwasu tłuszczowego od danego fosfolipidu może być wynikiem reakcji typu *backward* katalizowanej przez odpowiednie enzymy typu LPLAT lub wynikiem działania innych enzymów np. odpowiednich lipaz czy PDATu. W drugim etapie do powstałego lizofosfolipidu dołączany jest kwas tłuszczowy pochodzący z odpowiedniego acylo-CoA w reakcji katalizowanej przez odpowiedni enzym typu LPLAT. Obserwowany w obecnie przeprowadzonych badaniach różny wpływ badanych acylo-CoA na proces remodelowania mikrosomalnego PC mógłby, więc wiązać się ze specyficznością substratową *PtLPCAT1* w stosunku do wykorzystywanych w testach acylo-CoA w reakcjach typu *forward* lub być związany z innym wpływem tych związków na badany proces. W testach badających aktywność *PtLPCAT1* w stosunku do pięciu wykorzystywanych w testach, promujących reakcje typu *forward*, acylo-CoA



wykazaliśmy, że aktywność ta wahała się w granicach od około 18000 do około 66000 pmol syntetyzowanego PC/nmol mikrosomalnego PC/godz dla acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi i w granicach 900 do około 1200 pmol syntetyzowanego PC/nmol mikrosomalnego PC/godz dla acylo-CoA z nasyconymi kwasami tłuszczowymi. Aktywności te są na tyle wysokie, że nie wydają się być czynnikiem decydującym/limitującym reacylację powstających LPC; maksymalna aktywność w procesie remodelowania PC badanych zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych nie przekroczyła 900 pmol PC/nmol mikrosomalnego PC/godz (60 min inkubacja). Różny wpływ badanych acylo-CoA na intensywność remodelowania mikrosomalnego PC wydaje się, więc być związany z wpływem tych acylo-CoA na pierwszy etap remodelowania tj. na intensywność powstawania LPC. Badane acylo-CoA mogłyby wiązać się allosterycznie z *PtLPCAT1* i modyfikować jego zdolność do odłączania kwasu tłuszczowego od PC (czy to w reakcji typu *backward*, czy też w innego typu reakcjach). Podobne sugestie odnośnie wpływu różnych acylo-CoA na intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży przez inne LPCATy (*AtLPCAT2*, *ALE1*, *SLC1*) zostały sformułowane wcześniej przez Jasieniecką-Gazarkiewicz i wsp. (2023). Nie można jednak wykluczyć, że szybsze usuwanie ze środowiska reakcji powstających LPC w testach z acyl-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (wysoka aktywność reakcji typu *forward*) w porównaniu z ich odpowiednikami z nasyconymi kwasami tłuszczowymi może mieć również pewien wpływ na obserwowane różnice w intensywności remodelowania mikrosomalnych PC. Z fizjologicznego punktu widzenia intensywniejsze remodelowanie PC w obecności acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi ma głęboki sens, bowiem kwasy te, szczególnie 18:1-CoA, po włączeniu do PC mogą ulegać dalszej desaturacji. Podwyższona obecność zaś 18:2-CoA czy 18:3-CoA w cytozolu może też świadczyć o wysyceniu pozycji *sn-2*-PC tego typu kwasami tłuszczowymi i ich stymulujący wpływ na proces wytwarzania LPC, który udostępniałby pozycję *sn-2* w PC do reacylowania kwasami tłuszczowymi z acylo-CoA dominującymi w danej chwili w cytozolowej puli tych związków.

Najwyższa aktywność enzymu *PtLPCAT1* w stosunku do PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)*-PC w procesie remodelowania składu jej kwasów tłuszczowych, wpisuje się dobrze w propozycję Arao i Yamada (1994), zakładającą że dominujący szlak biosyntezy EPA u *P. tricornutum* zachodzi poprzez  $\Delta 6$  desaturację kwasu linolowego (18:2 <sup>$\Delta 9,12$</sup> ). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki sugerują zatem, że po  $\Delta 6$  desaturacji kwasu 18:2 <sup>$\Delta 9,12$</sup>  obecnego w PC, powstały kwas tłuszczowy

18:3(n-6) może być bardzo skutecznie odłączany od PC i dalej w reakcji zależnej od  $\Delta^6$  elongazy może być wydłużany o dwa atomy węgla do kwasu DGLA 20:3(n-6), jednego z intermedatów w szlaku biosyntezy EPA. Uzyskane wyniki sugerują jednak, że również druga gałąź szlaku biosyntezy EPA nie jest eliminowana i może zachodzić z stosunkowo wysoką intensywnością. Remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)*-PC zachodziło z intensywnością tylko nieznacznie mniejszą niż remodelowanie PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)*-PC. Ponadto, aktywność *PtLPCAT1* w remodelowaniu PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)*-PC, bezpośredniego substratu w biosyntezie 18:4(n-3) była jedną z najniższych z pośród intensywności remodelowania PC wszystkich badanych modyfikacji frakcji mikrosomalnych nadeksprymujących *PtLPCAT1*. Wyniki te sugerują więc, że specyficzność substratowa *PtLPCAT1* w procesie remodelowania różnych „gatunków” PC związanych z biosyntezą EPA nie eliminuje żadnej z „gałęzi” tego szlaku, a intensywność przepływu intermedatów poprzez jedną lub drugą jego „gałąź” będzie od aktywności pozostałych enzymów włączonych w powstawanie/przekształcanie tych intermedatów. Z fizjologicznego punktu widzenia, remodelowanie PC frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)*-PC nie wydaje się korzystne dla procesu biosyntezy EPA. W procesie tym ETA (20:4 n-3) musi bowiem ulec kolejnej desaturacji w procesie zależnym od  $\Delta^5$  desaturazy wykorzystującej ETA z pozycji *sn-2*-PC. Nie można jednak wykluczyć, że u okrzemka istnieje również  $\Delta^5$  desaturaza zależna od acylo-CoA i wtedy tego typu remodelowanie (skutkujące powstawaniem 20:4-CoA) miałoby fizjologiczny sens. Remodelowanie zaś PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)*-PC, wprawdzie jedno z mniej intensywnych, przeprowadzane jednak głównie w wyniku reakcji typu *backward* dostarczającej 20:5-CoA może dostarczać substratu (proces elongacji zachodzi gdy kwas tłuszczowy połączony jest z CoA) do biosyntezy DHA (22:6) lub włączenia go do lipidu docelowego (MGDG, TAG).

#### **5.4. Remodelowanie PC badanych frakcji mikrosomalnych przez *PtLPCAT1* oraz przez inne LPCATy – testy kompetencji**

Badania wpływu różnych acylo-CoA na intensywność remodelowania PC badanych frakcji mikrosomalnych przeprowadzono również w tzw. testach kompetencji, w których 5 różnych acylo-CoA (16:0-CoA, 18:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA, 18:3-CoA) dodawano razem w równomolowych stężeniach do mieszanin reakcyjnych. Do tego typu

testów z frakcjami mikrosomalnymi z drożdży nadeksprymującymi *PtLPCAT1* wytypowano frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* (remodelowanie w testach z pojedynczo dodawanymi acylo-CoA przebiegało prawie wyłącznie w wyniku reakcji typu *backward*) oraz wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC* („nowe” cząsteczki PC były pod względem składu kwasów tłuszczowych zbliżone do naturalnie występujących w drożdżach). Testy kompetencyjne z mikrosomami wzbogaconymi o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* przeprowadzono w dwóch różnych temperaturach: 30 i 20 °C. Wykazano w nich podobne względne wykorzystywanie znajdujących się w mieszaninie reakcyjnej acylo-CoA do procesu remodelowania mikrosomalnego PC jak w testach z pojedynczo dodawanymi poszczególnymi acylo-CoA do mieszanin reakcyjnych. W obu rodzajach testów 18-węglowe nienasycone kwasy tłuszczowe były o wiele lepiej wykorzystywane do remodelowania mikrosomalnego PC niż nasycone kwasy tłuszczowe (18:0 i 16:0). W testach kompetencji zaobserwowano jedynie lepsze wykorzystywanie do procesu remodelowania mikrosomalnego PC, 18:2-CoA niż 18:3-CoA (w testach z pojedynczo dodawanymi acylo-CoA preferencja była odwrotna). Zakładając jednak, że główny wpływ badanych acylo-CoA na remodelowanie mikrosomalnego PC zachodził poprzez ich allosteryczny wpływ na wytwarzanie LPC przez *PtLPCAT1*, nieco inna preferencja w wykorzystywaniu badanych acylo-CoA znajdujących się w mieszaninie niż dodawanych pojedynczo może być wyjaśniana równoczesnym oddziaływaniem wszystkich badanych acylo-CoA na te zmiany. Zmiana temperatury inkubacji z 30 °C na 20 °C nie wpłynęła znacząco na preferencję substratową enzymu *PtLPCAT1* w procesie remodelowania mikrosomalnej PC. Powodowała jedynie lekkie względne obniżenie preferencji w stosunku do nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz lekkie podwyższenie preferencji w stosunku do nasyconych kwasów tłuszczowych; zmniejszyła jednak o około połowę intensywność procesu remodelowania. Gdy testy kompetencji przeprowadzono z mikrosomami wzbogaconymi o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC*, intensywność remodelowania mikrosomalnego PC zmniejszyła się nawet bardziej niż obniżenie temperatury inkubacji do 20 °C. Do remodelowania PC tak zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej nie był też wykorzystywany 18:3-CoA. Względne wykorzystywanie pozostałych acylo-CoA było podobne jak w testach z mikrosomami wzbogaconymi o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC*. Wynik ten potwierdza tylko wcześniejsze wnioski, że intensywność remodelowania mikrosomalnego PC zależy od rodzaju przeprowadzonych modyfikacji; ogólniej rzecz biorąc od rodzaju modyfikowanego PC. Rodzaj modyfikowanego PC może też wpływać na względne wykorzystywanie w procesie

remodelowania różnych acylo-CoA (obecnie diskutowane dane i dane z testów z acylo-CoA pojedynczo dodawanych do mieszanin reakcyjnych), co czyni regulację całego procesu remodelowania PC procesem mocno skomplikowanym. Na intensywność remodelowania PC i na sposób wykorzystania różnych acylo-CoA w tym procesie wpływało również pochodzenie enzymu typu LPCAT wprowadzanego do systemu drożdżowego (drożdże  $\Delta ALE1$ , praktycznie pozbawione aktywności typu LPCAT). W testach kompetencji z mikrosomami nadeksprymującymi *AtLPCAT2* z *Arabidopsis*, wzbogaconymi o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* intensywność remodelowania mikrosomalnego PC była na podobnym poziomie jak w testach z mikrosomami nadeksprymującymi *PtLPCAT1* wzbogaconymi o taki sam rodzaj PC. Gdy do testów zastosowane zostały zaś frakcje mikrosomalne z drożdży nadeksprymujących drożdżowy *ALE1* intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* była zaś około 3-krotnie niższa niż w analogicznych testach z mikrosomami z drożdży nadeksprymującymi *PtLPCAT1*. Remodelowanie zaś PC frakcji mikrosomalnych wzbogaconych o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC* z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* i *ALE1* było niższe odpowiednio o około 34% i 64% od remodelowania tego typu PC w testach z mikrosomami nadeksprymującymi *AtLPCAT2*. W przeprowadzonych testach kompetencji wszystkie trzy wspomniane acylotransferazy typu LPCAT wprawdzie stosunkowo lepiej wykorzystywały acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (niż te zawierające kwasy tłuszczowe nasycone) do procesu remodelowania mikrosomalnego PC, jednakże względne wykorzystywanie poszczególnych acylo-CoA nie było już takie samo i było dodatkowo modyfikowane przez rodzaj wprowadzonych „nowych” cząsteczek PC. W testach wykorzystujących frakcje mikrosomalne wzbogacone o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC*, *AtLPCAT2* wykorzystywał do remodelowania mikrosomalnego PC najefektywniej 18:2-CoA i tylko nieco słabiej 18:1-CoA. *PtLPCAT1* wykorzystywał zaś w analogicznych testach najintensywniej 18:1-CoA i o około połowę słabiej 18:2-CoA, zaś *ALE1* preferował jeszcze mocniej 18:1-CoA i 18:2-CoA wykorzystywał już tylko z około 1/3 intensywności jego wykorzystania. W odróżnieniu od dwu pozostałych LPCATów, *ALE1* stosunkowo dobrze wykorzystanie również 18:0-CoA do tego procesu (około połowa efektywności wykorzystania 18:2-CoA). W testach z frakcjami mikrosomalnymi wzbogaconymi o *sn-1-18:1-sn-2-18:1-PC* względne preferencje w wykorzystaniu różnych acylo-CoA do procesu remodelowania PC również nie były identyczne. *PtLPCAT1* i *AtLPCAT2* wykorzystywały wprawdzie 18:1-CoA i nieco słabiej 18:2-CoA oraz nie wykorzystywały 18:3-CoA do procesu remodelowania,

ale już ALE1 lepiej preferował 18:2-CoA niż 18:1-CoA i wykorzystywał również 18:3-CoA. Testy te jednoznacznie wykazują, że enzymy o aktywności LPCAT pochodzące różnych organizmów charakteryzują się odmienną specyficznością substratową zarówno w stosunku do remodelowanych „gatunków” PC jak i w stosunku do acylo-CoA wykorzystywanych w procesie remodelowania. W pewnym sensie potwierdza to wnioski wyciągnięte wcześniej przez Jasieniecką-Gazarkiewicz i wsp. (2023) jeżeli chodzi o acylo-CoA oraz poszerza te dane o preferencje w stosunku różnych rodzajów PC.

### 5.5. Wpływ czynników środowiskowych na aktywność *PtLPCAT1*

Eksperymenty dotyczące wpływu temperatury na aktywność *PtLPCAT1* wykazały, że enzym ten w reakcjach *forward* wykazuje najwyższą aktywność w 30 °C. Zastosowanie niższej lub wyższej temperatury powodowało gwałtowny spadek aktywności *PtLPCAT1*. W badaniach prowadzonych przez Klińską i wsp. (2019) nad enzymami LPCAT pochodzącymi z *C. sativa*, również optymalną temperaturą dla tych enzymów było 30 °C. Jednak spadek aktywności przy niższej lub wyższej temperaturze niż optymalna, nie był tak drastyczny jak w przypadku *PtLPCAT1*.

W testach badających wpływ temperatury na intensywność remodelowania mikrosomalnego PC drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* najwyższą intensywność tej reakcji odnotowano w temperaturze 40 °C. Ponieważ do testów stosowano frakcję mikrosomalną wzbogaconą o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* dla której odnotowano, że proces remodelowania PC zachodzi głównie w wyniku reakcji typu *backward* należy więc założyć że maksymalna temperatura dla reakcji typu *backward* i reakcji typu *forward* przeprowadzanych przez *PtLPCAT1* znacznie się różni; w reakcjach typu *forward* wynosiła 30 °C. Obniżenie temperatury do 30 °C, nie spowodowało drastycznego spadku aktywności *PtLPCAT1* w procesie remodelowania PC; aktywność w tej temperaturze była tylko nieznacznie niższa niż w 40 °C. Dopiero obniżenie temperatury do 20 °C lub podwyższenie do 50 °C skutkowało bardzo drastycznym obniżeniem aktywności *PtLPCAT1* w reakcjach *backward*. Ponadto, po podniesieniu temperatury do 60 °C, *PtLPCAT1* przeprowadzał reakcję *forward* tylko z niewiele niższą efektywnością niż w 50 °C, podczas gdy jego aktywność typu *backward* była w tej temperaturze bliska zera. Uzyskanych w obecnej pracy wyników dotyczących różnic w wysokości optymalnej temperatury dla reakcji typu *forward* i reakcji typu *backward* przeprowadzanych przez *PtLPCAT1* nie możemy skonfrontować z podobnymi badaniami wykonanymi dla innych LPCATów, bowiem w literaturze brak jest jak dotychczas danych na ten temat.

Z fizjologicznego punktu widzenia, trudno jest określić znaczenie wykazanej zależności *PtLPCAT1* od temperatury. Uważa się, że temperatura poniżej 15 °C i powyżej 21 °C to warunki stresowe dla *P. tricornutum* (Bojko i wsp., 1970). Yongmanitchai i Ward (1991) podają, że *P. tricornutum* najefektywniej produkuje EPA w zakresie temperatury 21,5 – 23 °C, a optymalna temperatura dla wzrostu jest szacowana na 15 °C do 20 °C. Skok aktywności *PtLPCAT1* między 20 °C a 30 °C, może być w jakiś sposób związany z odpowiedzią wykazywaną przez ten organizm na warunki stresowe, w których biosynteza EPA zachodzi intensywniej.

Enzym *PtLPCAT1* wykazywał wysoką aktywność w pH obojętnym (około 7) i zasadowym pH (8-11) zarówno w reakcjach *forward* jak i *backward* (najwyższa aktywność przypadła na pH około 8), podobnie jak *LPCATy* pochodzące z nasion *C. sativa* (Klińska i wsp., 2019). Proces remodelowania PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC* przebiegał jednak stosunkowo intensywnie również w pH lekko kwaśnym (pH 5-6), w którym reakcja typu *forward* katalizowana przez *PtLPCAT1* przebiegała na bardzo niskim poziomie. W pH zbliżonym do obojętnego remodelowanie PC tak zmodyfikowanej frakcji mikrosomalnej przebiegało praktycznie w wyniku reakcji typu *backward*. Jeżeli założylibyśmy, że również w niższych pH remodelowanie PC badanej frakcji mikrosomalnej również zachodzi w wyniku tego typu reakcji to właściwości *PtLPCAT1* w reakcjach *forward* oraz *backward* różniłyby się znacznie, jeżeli chodzi o zależność tych reakcji od kwasowości środowiska. W niższych wartościach pH, LPC mogło oczywiście powstawać również w reakcjach innego typu niż reakcje *backward* katalizowane przez *PtLPCAT1*. Można więc rozważać, że to nie reakcje *backward* zachodziły stosunkowo intensywnie w niższych pH, ale reakcje innego typu były przez to pH stymulowane.. Uzyskanych przez nas wyników dotyczących wpływu pH na aktywność remodelowania PC, prawdopodobnie w wyniku reakcji typu *backward*, nie możemy porównać z danymi literaturowymi, bowiem w literaturze brak jest tego typu danych dotyczących innych enzymów typu *LPCAT*. Jeżeli chodzi jednak o wpływ pH na intensywność reakcji *forward* przeprowadzanych przez enzymy typu *LPCAT* z *B. napus* (Furukawa-Stoffer i wsp., 2003; Oo i Huang, 1989) oraz z myszy (Nakanishi i wsp., 2006), to ich najwyższą aktywność odnotowano również w zasadowym pH. Jednak na ten moment, znaczenie fizjologiczne tej wspólnej cechy jest trudne do wytłumaczenia. W przypadku *P. tricornutum* wykazano jednak, że jego hodowla w zasadowym pH, mobilizuje go do produkcji większej ilości lipidów niż podczas hodowli w pH neutralnym (Mus i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2016). Jednakże nie ma bezpośrednich dowodów, że ma

to związek z wysoką aktywnością LPCAT w pH zasadowym – aby to potwierdzić wymagane jest przeprowadzenie dodatkowych badań.

W testach badających reakcje *forward*, *PtLPCAT1* wykazywał inną odpowiedź na dodatek jonów magnezu i wapnia w stężeniach 0,05 – 0,5 mM, niż LPCATy pochodzące z roślin (Klińska i wsp., 2019). LPCATy z *P. tricornutum* reagowały podwyższoną aktywnością na dodatek tych jonów, natomiast LPCATy roślinne spadkiem aktywności, w porównaniu do testów prowadzonych bez dodatku jonów. Jony wapnia i magnezu wywierały natomiast odmienny wpływ na *PtLPCAT1* w reakcjach *backward* w porównaniu do reakcji *forward* – najniższe badane stężenia tych jonów powodowały silne hamowanie reakcji *backward*. Wraz ze wzrostem stężenia jonów hamowanie reakcji ulegało zmniejszeniu i w pewnych stężeniach ustępowało całkowicie (stężenia te były wyższe dla jonów magnezu niż wapnia). Zachowanie *PtLPCAT1* w odpowiedzi na jony wapnia i magnezu w reakcji *backward* było więc zbliżone do odpowiedzi LPCATów pochodzących z nasion *C. sativa* w reakcji *forward* jednakże w przypadku tych ostatnich hamowanie reakcji było tym mocniejsze im wyższe były stężenia dodawanych jonów (Klińska i wsp., 2019). Wyższe stężenia jonów magnezu i wapnia mogą wpływać na gorszą rozpuszczalność acylo-CoA, co może mieć związek ze spadkiem aktywności enzymu *PtLPCAT1* w reakcji *forward* przy wyższych stężeniach tych jonów (Constantinides, 1986). Ta hipoteza nie wyjaśnia jednak hamującego wpływu niskich stężeń jonów magnezu i wapnia na reakcję *backward* i brak tego wpływu w wyższych stężeniach. W dyskusowaniu do tej pory tej kwestii zakładaliśmy, że remodelowanie mikrosomalnego PC zachodziło w wyniku reakcji *backward*. Wydaje się jednak, że należy rozważyć również udział „innych” reakcji w tym remodelowaniu. Gdyby przyjąć, że jony wapnia czy magnezu hamując reakcję *backward* w niskich stężeniach nie wpływają w tych stężeniach na „inne” reakcje, natomiast w wyższych stężeniach reakcje te stymulują, wyjaśniałoby to zaobserwowane efekty wpływu tych jonów. Aby jednak potwierdzić to założenie należałoby przeprowadzić dodatkowe badania. Pomimo, braku całkowitej jasności dotyczącej mechanizmu wpływu różnych stężeń wapnia i magnezu na aktywność *PtLPCAT1* uzyskane wyniki sugerują regulatorowy ich wpływ na jego aktywność. W niższych stężeniach mogłyby one stymulować reakcję *forward* natomiast hamować reakcję *backward* i utrzymywać odpowiednią aktywność enzymu w zależności od zaistniałych potrzeb fizjologicznych w komórce. Jony potasu, wykazywały natomiast w reakcjach *forward* wpływ hamujący zarówno na enzym LPCAT pochodzący z *P. tricornutum* jak i na LPCATy pochodzące z *C. sativa* (Klińska i wsp., 2019).

Hamujący wpływ tych jonów był jednak niewielki i wynosił od około 1 do 30%, w obu przypadkach. Badania dotyczące wpływu potasu na aktywność LPCATów w reakcjach *backward* nie były zaś jak do tej pory przeprowadzone. Stężenia jonów potasu, wapnia i magnezu w kompartmentach komórkowych *P. tricornutum* mogą odbiegać od stężeń, które użyto w niniejszych badaniach. Stężenie jonów wapnia w komórce *P. tricornutum* prawdopodobnie jest zbliżone do najniższych stężeń użytych w pracy lub jeszcze niższe. Jony wapnia są aktywnie transportowane z komórki przez Ca<sup>2+</sup>-ATPazę znajdującą się w błonie komórkowej, aby utrzymać niskie stężenie wewnątrzkomórkowe tych jonów, przy wysokim stężeniu zewnętrznym (Melkikh i Bessarab, 2010). Jeżeli chodzi o jony magnezu i potasu, to ich stężenie wewnątrzkomórkowe może być wyższe niż stężenia używane w badaniach nad *PtLPCAT1*. W badaniach prezentowanych przez Dickson i Krist (1987), wykazano, że stężenie jonów potasu i magnezu wewnątrz komórek *P. tricornutum* wynosiło około 200 mM i 32 mM, odpowiednio, gdy komórki były hodowane w środowisku o zasoleniu zbliżonym do tego występującego w środowisku naturalnym. Również w przypadku badań prowadzonych przez Overnella (1975), zaobserwowano wysokie stężenie jonów potasu, wynoszące około 140 mM, wewnątrz komórek *P. tricornutum*, hodowanych w pożywce zawierającej jony potasu w stężeniu 6,7 mM. Jednakże nie wiadomo, czy wykazane w tych badaniach stężenia wewnątrzkomórkowe omawianych jonów, odpowiadały stężeniom występującym w bezpośrednim otoczeniu enzymu *PtLPCAT1*. Dlatego, nie jest możliwe bezpośrednio przełożenie wpływu badanych jonów na aktywność enzymatyczną odnotowaną w środowisku reakcyjnym *in vitro* na ich potencjalny wpływ na aktywność enzymu w warunkach *in vivo* jako, że praktycznie nie jest możliwe oszacowanie stężenia tych jonów w bezpośrednim otoczeniu enzymu w obu tych warunkach.

## **5.6. Enzymy typu LPAAT kodowane przez geny sklonowane z *P. tricornutum***

Oprócz badań dotyczących charakterystyki biochemicznej i specyficzności substratowej *PtLPCAT1* w niniejszej pracy wykonano również charakterystykę zidentyfikowanych dwu enzymów wykazujących aktywność typu LPAAT (acylotransferazy acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy), kodowanych przez geny pochodzące z *P. tricornutum* i nadano im nazwy *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2*. W testach z dodatkiem różnych lizofosfolipidów (dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno) odnotowano, że wykazują one również aktywność w stosunku do LPE (lizofosfatydyloetanoloamina) – oba badane enzymy i LPS (lizofosfatydyloseryna) – tylko *PtLPAAT2*. Aktywności te były



jednak o wiele niższe niż ich aktywność w stosunku do LPA w związku z powyższym zakwalifikowano je jako enzymy typu LPAAT. Wyniki przeprowadzonych testów nie wykazywały żadnej aktywności badanych enzymów ani w stosunku do LPC (lizofosfatydylocholina) ani LPG (lizofosfatydyloglicerol).

Testy dotyczące specyficzności substratowej *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* w stosunku do różnych acylo-CoA wykazały, że enzymy te charakteryzują się odmienną preferencją w stosunku do różnych „gatunków” tych donorów kwasów tłuszczowych. Enzym *PtLPAAT1* najlepiej akceptował 18:4-CoA n-3, a *PtLPAAT2* najlepiej akceptował 18:1-CoA, a dopiero w drugiej kolejności 18:4-CoA n-3. Dodatkowo *PtLPAAT1* wykazywał o wiele wyższą aktywność w stosunku do 18:2-CoA, 18:3-CoA n-3 i 18:3-CoA n-6 niż *PtLPAAT2*. Oba te enzymy akceptowały również pozostałe kwasy tłuszczowe ze szlaku biosyntezy EPA (oprócz wspomnianego 18:4-CoA) takie jak: 20:4 n-3, 20:4 n-6, 20:5 n-3. Przy czym można odnotować wyższą aktywność tych enzymów do 20:4 n-6 niż do 20:4 n-3. Jak wspomniano we wcześniejszym etapie dyskusji dotyczącej *PtLPCAT1*, aktywność w stosunku do 20:4-CoA n-3 może być istotna podczas biosyntezy 20:5 (EPA). Wpływ enzymów *PtLPAAT* na proces biosyntezy EPA można rozpatrywać jednakże jedynie, jako wpływ pośredni. Syntetyzowane przez nie cząsteczki PA mogłyby być dostawcą DAG do biosyntezy PC i skład kwasów tłuszczowych tak zsyntetyzowanych cząsteczek PC mógłby ulegać dalszym modyfikacjom dostarczając EPA lub innych intermediatów z jego szlaku biosyntezy w przypadku innych kwasów tłuszczowych niż kwas 20:4, podlegających modyfikacjom. W badaniach przedstawianych przez Klińska i wsp. (2020), LPAATy pochodzące z nasion *C. sativa* wykazywały preferencję w stosunku do 18-węglowych nienasyconych kwasów tłuszczowych, szczególnie do 18:1. Spośród nasyconych kwasów tłuszczowych akceptowały zaś stosunkowo dobrze 16:0. LPAATy z *P. tricornutum* wykazywały również, wysoką aktywność w stosunku do 16:0-CoA oraz 18:1-CoA. Jeżeli chodzi o pozostałe wielonienasycone 18-to węglowe kwasy tłuszczowe to *PtLPAAT1* akceptował je stosunkowo dobrze zaś *PtLPAAT2* relatywnie słabo, W badaniach prowadzonych przez Klińska i wsp. (2020) nie sprawdzano preferencji roślinnych LPAATów w stosunku do acylo-CoA z kwasami tłuszczowymi dłuższymi niż 18-cie atomów węgla lub z większą ilością podwójnych wiązań niż trzy. Nie da się więc porównać z nimi specyficzności LPAATów pochodzących z *P. tricornutum*, które stosunkowo dobrze akceptowały wiele z tego typu kwasów tłuszczowych. Jednakże już z badań nad specyficznością substratową LPAATów z *P. tricornutum* można założyć, że

każdy z LPAATów charakteryzuje się typową tylko dla siebie specyficzną substratową.

Oba badane LPAATy z *P. tricornutum* (*PtLPAAT1* i *PtLPAAT2*) wykazywały najwyższą aktywność w temperaturze 23 °C. Enzym *PtLPAAT1* wykazywał jednakże większą zależność od temperatury niż *PtLPAAT2*. Jego aktywności w przedziale badanych temperatur 10 – 60 °C ulegała dużo większym zmianom niż aktywność *PtLPAAT2*. Niniejsze wyniki dotyczące wpływu temperatury na aktywność LPAATów pochodzące z *P. tricornutum* pokazują, że reakcja tych enzymów na temperaturę otoczenia różniła się od reakcji LPAATów pochodzących z nasion *C. sativa* (Klińska i wsp., 2020). LPAATy z *C. sativa* wykazały bowiem najwyższą aktywność w temperaturze 30 °C. Jednakże jeżeliby porównywać podatność na zmianę temperatury enzymów LPAAT pochodzących z *P. tricornutum* i enzymów LPAAT pochodzącymi z nasion *C. sativa*, to enzym *PtLPAAT1* wykazywał podobnie dużą wrażliwość na zmianę temperatury (zmiana temperatury na poniżej 20 °C lub powyżej 30 °C powodowała drastyczny spadek aktywności) jak LPAATy pochodzące z nasion *C. sativa*.

Reakcja enzymów *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* na zmiany pH otoczenia była do pewnego stopnia podobna, jednakże odnotowano również dosyć istotne różnice w ich odpowiedzi na zmiany tego czynnika środowiskowego. Oba enzymy wykazywały najwyższą swoją aktywność w środowisku zasadowym. Enzym *PtLPAAT1* wykazywał jednak najwyższą swoją aktywność przy pH 9,0, a enzym *PtLPAAT2* dopiero przy pH 10,0. W pH 11,0 *PtLPAAT1* nie wykazywał już praktycznie aktywności enzymatycznej, podczas gdy *PtLPAAT2* tracił tę aktywność dopiero w pH 12,0. W badaniach dotyczących LPAATów roślinnych Ichihara i wsp. (1987) wykazali, że LPAATy pochodzące z nasion krokosza barwierskiego (*C. tinctorius*), wykazywały maksymalną aktywność w zakresie pH 8,5 – 9,5. Natomiast, Oo i Huang (1989) w swoich badaniach nad LPAATami rzepaku (*B. napus*), odnotowali optymalne dla nich pH powyżej wartości 10,0.

Przeprowadzone badania wykazały również zależność zarówno *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* od obecności jonów magnezu i wapnia w mieszaninie reakcyjnej. Obecność jonów wapnia w stężeniach 0,05 – 1 mM wywołała drastyczny spadek aktywności obydwu badanych enzymów. Natomiast wpływ jonów magnezu był już trochę inny. Najniższe z użytych stężeń jonów magnezu (0,05 mM) zwiększało aktywność obydwu enzymów, natomiast wyższe ich stężenia (0,5 mM i 1 mM) wpływały zdecydowanie hamująco na ich aktywność. Hamujący wpływ jonów wapnia odnotowano również w przypadku enzymów typu LPAAT pochodzących z palmy (*S. cocoides*), kukurydzy (*Z. mays*) i rzepaku

(*B. napus*; Oo i Huang, 1989). Stymulujący wpływ jonów magnezu (w stężeniu 1 mM) odnotowano natomiast w stosunku do enzymów typu LPAAT pochodzących z kukurydzy i palmy (Oo i Huang, 1989). Ci sami autorzy odnotowali też, że dla LPAATów pochodzących z rzepaku jony magnezu wpływały hamująco. W badaniach przedstawianych przez Cao i wsp. (1990) odnotowano zaś, że jony magnezu wpływały stymulująco na aktywność LPAATów pochodzących z *Limnanthes alba*.

### 5.7. Transgeniczne rośliny *A. thaliana* z genami szlaku biosyntezy VLC-PUFA

Ostatnim etapem niniejszej pracy była próba uzyskania roślin transgenicznych *A. thaliana* zdolnych do biosyntezy kwasu eikozapentaenowego (EPA), w tym zbadanie wpływu enzymu *PtLPCAT1* na wydajność biosyntezy tego kwasu tłuszczowego. Aby to sprawdzić w ramach niniejszej pracy wytworzono cztery konstrukty genetyczne (metodą klonowania Golden Gate) zawierające geny kodujące  $\Delta^6$  desaturazę z *P. tricornutum* lub *Ostreococcus tauri*,  $\Delta^6$  elongazę z *Physcomitrella patens*,  $\Delta^5$  desaturazę z *P. tricornutum*, gen selekcyjny kodujący oporność na antybiotyk kanamycynę, oraz *PtLPCAT1*. Te konstrukty genetyczne różniły się między sobą brakiem lub obecnością genu kodującego *PtLPCAT1* (dla porównania wpływu tego enzymu na biosyntezę EPA w roślinach transgenicznych) oraz pochodzeniem  $\Delta^6$  desaturazy (dwa konstrukty zawierały desaturazę pochodzącą z *O. tauri*, a pozostałe dwa z *P. tricornutum*). Po transformacji roślin *A. thaliana* przygotowanymi konstrukcjami, prowadzono selekcję roślin w celu uzyskania linii homozygotycznych pokolenia F3, których nasiona były w 100% odporne na antybiotyk kanamycynę. Dla każdego z czterech rodzajów transformowanych roślin, udało się wyselekcjonować linie homozygotyczne odporne w 100% na antybiotyk kanamycynę. Te linie były następnie sprawdzane metodą PCR, na obecność transgenów. Z pośród czterech rodzajów transformowanych roślin udało się potwierdzić obecność wszystkich transgenów w trzech rodzajach (zawierających konstrukty A, B, B'); niestety nie udało się potwierdzić obecności wszystkich transgenów w jednej z nich (A'). Następnie sprawdzano metodą GC skład kwasów tłuszczowych w ekstraktach z nasion oraz częściach nadziemnych (traktowanych jako całość) z roślin homozygotycznych w których potwierdzono obecność wszystkich genów, oraz jednej rośliny nie posiadającej zidentyfikowanego jednego z genów (kodującego enzym *PtLPCAT1*). Uzyskane wyniki wykazały brak oczekiwanego produktu EPA oraz innych kwasów tłuszczowych ze szlaku biosyntezy EPA takich jak: GLA, SDA, ETA, we wszystkich wariantach transformowanych *A. thaliana* pokolenia F3. W niektórych homozygotach zaobserwowano jedynie drobne zmiany w ilości kwasów

tłuszczowych naturalnie występujących w roślinach *A. thaliana*, w porównaniu do WT. Nie wydaje się jednak aby, zmiany te były efektem przeprowadzonej transformacji, a raczej mogą one wynikać z odrębnych powtórzeń technicznych procesu izolacji lipidów oraz z powtórzeń biologicznych szczególnie w przypadku ekstraktów z części nadziemnych, gdzie rośliny mogły się trochę różnić między sobą w ilości rozwiniętych pąków czy ilości nasion. Brak produkcji nowych kwasów tłuszczowych w transformowanych *A. thaliana*, uniemożliwił zbadanie wpływu *PtLPCAT1* na syntezę EPA w warunkach *in vivo*.

Dane literaturowe pokazują, wiele udanych eksperymentów, w których uzyskano rośliny transgeniczne produkujące VLC-PUFA; np. Abbadi i wsp. (2004) uzyskali produkcje EPA i ARA u lnu (*Linum usitatissimum*) stanowiącą odpowiednio 1% i 1,5% wszystkich kwasów tłuszczowych, oraz uzyskali produkcję ARA u tytoniu stanowiącą 2%. Badacze Ci użyli tego samego zestawu genów jak w niniejszej pracy, czyli kodujących  $\Delta^6$  desaturazę z *P. tricornutum*,  $\Delta^5$  desaturazę z *P. tricornutum* oraz  $\Delta^6$  elongazę z *Physcomitrella patens*. Autorzy tych badań doszukiwali się przyczyny niskiej produkcji EPA i ARA min. w możliwym zachodzeniu wyciszania niektórych transgenów z powodu użycia tego samego promotora (USP) do wszystkich trzech genów w konstrukcie genetycznym. O możliwym wyciszaniu transgenów przy użyciu tego samego promotora do wszystkich wprowadzanych genów, pisali również w swoich publikacjach Chen i wsp. (2006) oraz Ruiz- López i wsp. (2012). W niniejszej pracy użyto innego gatunku rośliny do transformacji (*A. thaliana*) niż w badaniach przedstawianych przez Abbadi i wsp. (2004). Zastosowano jednak taki sam promotor (NOS) do wszystkich genów zawartych w konstrukcie genetycznych. Nie można więc wykluczyć, że mogło to mieć wpływ na brak produkcji EPA w transformowanych roślinach *A. thaliana*.

## 6. WNIOSKI

1. Gen *Phatr3\_J20460* pochodzący z *P. tricornutum* koduje bardzo aktywny w testach enzymatycznych *in vitro*, enzym typu LPCAT, który nazwano *PtLPCAT1*. Dodatkowo, geny *Phatr3\_J11916* i *Phatr3\_J43099* (również pochodzące z *P. tricornutum*) kodują enzymy wykazujące aktywność typu LPAAT, które nazwano *PtLPAAT1* oraz *PtLPAAT2* (odpowiednio).
2. Enzym *PtLPCAT1* wykazuje w reakcjach typu *forward* wysoką aktywność w stosunku do acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi ze szlaku biosyntezy kwasu eikozapentaenowego (EPA). Szczególnie wysoka aktywność *PtLPCAT1* w stosunku do 20:4-CoA n-3, a niska do 20:4-CoA n-6 sugeruje, że szlak biosyntezy EPA u *P. tricornutum* może przebiegać głównie poprzez ten pierwszy intermediat. Niska aktywność LPCATów pochodzących z nasion *C. sativa* w stosunku do 20:4-CoA n-3 i znacząca aktywność *PtLPCAT1* do 20:4-CoA n-3, sugeruje że enzym *PtLPCAT1* może potencjalnie eliminować wąskie gardło (ang. *bottleneck*) ograniczające wydajną biosyntezę EPA i DHA w transgenicznym roślinach oleistych.
3. Niska aktywność enzymu *PtLPCAT1* do 20:4-CoA n-6 oraz wysoka do 20:4-CoA n-3, świadczy również o tym, że dla tego enzymu nie tylko istotna jest ilość podwójnych wiązań, ale także ich położenie w łańcuchu węglowodorowym danego kwasu tłuszczowego.
4. Wysoka aktywność *PtLPCAT1* w reakcjach *forward* w stosunku do 20:4-CoA n-3 koreluje ze stosunkowo niską aktywnością tego enzymu w reakcjach remodelowania (zachodzących głównie w wyniku reakcji typu *backward*) *sn-2-20:4(n-3)-PC* co wskazuje na promowane przyłączanie reszt acylowych pochodzących z 20:4-CoA n-3 do lizofosfatydylocholiny i tworzenie *sn-2-20:4(n-3)-PC*, gdzie może zajść desaturacja 20:4 n-3 do 20:5 n-3.
5. Proces remodelowania składu kwasów tłuszczowych fosfolipidów (w tym głównie PC) katalizowany przez *PtLPCAT1* jest zależny zarówno od składu kwasów tłuszczowych fosfatydylocholiny jak i rodzaju acylo-CoA wykorzystywanych w procesie remodelowania.
6. Preferencja w remodelowaniu PC frakcji mikrosomalnej wzbogaconej o *sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)-PC* przez *PtLPCAT1* może sugerować, że synteza EPA u *P. tricornutum*

może intensywnie przebiegać poprzez 18:3 n-6 jako produkt pośredni w tej biosyntezie, który po odłączeniu jest następnie przedłużany do 20:3 (n-6).

7. Wysoka aktywność typu *backward* enzymu *PtLPCAT1* również w stosunku PC z 18:4(n-3) w pozycji *sn-2*, świadczyć może o wydajnej reakcji odłączania 18:4 n-3 od fosfatydylocholiny i tworzeniu 18:4-CoA n-3, który może być dalej wydłużany do 20:4-CoA n-3. Specyficzność *PtLPCAT1* w procesie remodelowania różnych „gatunków” PC nie eliminuje więc możliwości ani szlaku biosyntezy EPA poprzez 18:3 n-6 ani poprzez 18:3 n-3 przekształcanego dalej w PC do 18:4. Przepływ intermediatów jego biosyntezy poprzez jedną lub drugą „gałąź” szlaku zależeć, więc będzie najprawdopodobniej od aktywności pozostałych enzymów włączonych w jego biosyntezę.
8. Różny wpływ badanych acylo-CoA na proces remodelowania PC frakcji mikrosomalnych przez *PtLPCAT1* w warunkach *in vitro* nie jest raczej powiązany z aktywnością typu *forward* wykazywaną przez *PtLPCAT1* w stosunku do tych acylo-CoA (aktywności te są w stosunku do wszystkich badanych acylo-CoA wyższe niż ich wykorzystanie w procesie remodelowania). Wydaje się więc, że wpływają one na proces remodelowania PC w inny sposób, np. poprzez allosteryczne wiązanie się z enzymem i wpływaniem przez to na jego aktywność w tym procesie.
9. Wykorzystywanie przez *PtLPCAT1* w procesie remodelowania PC różnych acylo-CoA zarówno w testach z pojedynczo dodawanymi acylo-CoA do mieszaniny reakcyjnej jak i w testach, gdy dodawane były razem w równomolowej mieszaninie, było podobne (acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi były wykorzystywane preferencyjnie). Sposób ich podawania zmieniał jednak nieco preferencję enzymu w stosunku poszczególnych acylo-CoA.
10. Zależność reakcji typu *forward* przeprowadzanych przez *PtLPCAT1* od czynników środowiskowych nie była identyczna jak zależność od tych czynników procesu remodelowania fosfolipidów. Najwyższą efektywność reakcji typu *forward* odnotowano np. w temperaturze 30 °C, a najwyższą efektywność procesu remodelowania w temperaturze 40 °C. Oba procesy przebiegały najefektywniej w zasadowym pH (8-11), ale w pH lekko kwaśnym (pH 5-6) reakcje typu *forward* przebiegały ze śladową intensywnością a intensywność remodelowania nie była już

tak mocno zredukowana. Dodatek jonów wapnia i magnezu stymulował reakcje typu *forward*, a hamował proces remodelowania.

11. Zidentyfikowane enzymy typu LPAAT tj. *PtLPAAT1* i *PtLPAAT2* wykazywały w systemie drożdżowym o wiele niższą aktywność niż *PtLPCAT1*. Aktywności te były jednak wystarczająco wysokie by wykonać ich charakterystykę biochemiczną i określić ich specyficzność substratową. Wykazano, że oba enzymy charakteryzowały się odmienną specyficznością substratową w stosunku do różnych acylo-CoA i nieco odmiennie reagowały też na czynniki środowiskowe takie jak temperatura, pH, obecność jonów wapnia czy magnezu.
12. Przeprowadzone transformacje roślin *Arabidopsis* genami szlaku biosyntezy EPA nie doprowadziły do uzyskania roślin transgenicznych zawierających bardzo długo łańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Przyczyna jak na razie pozostaje nieznana.

## 7. SPIS LITERATURY

3. Abbadi A., Domergue F., Bauer J., Napier J.A., Welti R., Zahringer U., Cirpus P., Heinz E. (2004) Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: constraints on their accumulation. *The Plant Cell* 16: 2734-2748.
4. Abedi E., Sahari M. (2014) Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food Science & Nutrition* 2(5): 443-463.
5. Fatiha A. (2020) Plant lipid metabolism. *Advances in lipid metabolism*. IntechOpen.
6. Anaokar S., Kodali R., Jonik B., Renne M., Brouwers J.F.H.M., Lager I., Kroon A.I.P.M., Patton-Vogt J. (2019) The glycerophosphocholine acyltransferase Gpc1 is part of a phosphatidylcholine (PC)-remodeling pathway that alters PC species in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 294(4): 1189-1201.
7. Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.
8. Arao T., Yamada M. (1994) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the marine diatom. *Phaeodactylum Tricornutum*. *Phytochemistry* 35: 1177–1181.
9. Athenstaedt K., Daum G. (2006) The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(12): 1355-69.
10. Ball W.B., Neff J.K., Gohil V.M. (2017) The role of non-bilayer phospholipids in mitochondrial structure and function. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 592(8): 1273-1290.
11. Bates P.D., Stymne S., Ohlrogge J. (2013) Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 358-364.
12. Birner R., Bürgermeister M., Schneiter R., Daum G. (2001) Roles of phosphatidylethanolamine and of its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 12: 997-1007.
13. Bligh E.G., Dyer W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911–917.
14. Bojko M., Brzostowska K., Kuczyńska P., Latowski D., Olchawa-Pajor M., Krzeszowiec W., Waloszek A., Strzałka K., (1970) Temperature effect on growth, and selected parameters of *Phaeodactylum tricornutum* in batch cultures. *Acta Biochimica Polonica* 60: 861–864.



15. Botella C., Jouhet J., Block M. (2017) Importance of phosphatidylcholine on the chloroplast surface. *Progress in Lipid Research* 65: 12-23.
16. Bowler C., Allen A., Grigoriev I. (2008) The *Phaeodactylum* genom reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456: 239-244.
17. Bowler C., Allen A.E., Badger J.H., Grimwood J., Jabbari K., Kuo A., Maheswari U., Martens C., Maumus F., Otilar R.P. i inni (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456: 239–244.
18. Cagliari A., Margis R., Maraschin F.S., Turchetto-Zolet A.C., Loss G., Margis-Pinheiro M. (2011) Biosynthesis of triacylglycerols (TAGs) in plants and algae. *International Journal of Plant Biology* 2(1): e10.
19. Cao Y.Z., Oo K.C., Huang A.H.C. (1990) Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam (*Limnanthes alba*). *Plant Physiology* 94: 1199–1206.
20. Carman G.M., Han G.S. (2011) Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Biochemistry* 80: 859-883.
21. Castejon N., Senorans F.J. (2020) Enzymatic modification to produce health-promoting lipids from fish oil and other new omega-3 sources: A review. *New Biotechnology* 57: 45-54.
22. Chen R., Matsui K., Ogawa M., Oe M., Ochiai M., Kawashima H. (2006) Expression of D6, D5-desaturase and GLELO elongase genes from *Mortierella alpina* for production of arachidonic acid in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds. *Plant Science* 170: 399–406.
23. Cheng B., Wu G., Vrinten P., Falk K., Bauer J., Qiu X. (2010) Towards the production of high levels of eicosapentaenoic acid in transgenic plants: the effects of different host species, genes and promoters. *Transgenic Research* 19: 221–229.
24. Christie W.W., Han X. (2012) Chapter 1—Lipids: Their structures and occurrence. *Lipid Analysis*, 3–19.
25. Collin S., Justin A.M., Cantrel C., Arondel V., Kader J.C. (1999) Identification of AtPIS, a phosphatidylinositol synthase from Arabidopsis. *European Journal of Biochemistry* 262: 652-658.
26. Constantinides (1986) Solubility of palmitoyl-coenzyme A in acyltransferase assay buffers containing magnesium ions. *Archives Biochemistry and Biophysics* 250: 267–270.

27. Cowan A.K. (2006) Phospholipids as plant growth regulators. *Plant Growth Regulation* 48(2): 97-109.
28. Cui Y., Thomas-Hall S., Schenk P. (2019) *Phaeodactylum tricornerutum* microalgae as a rich source of omega-3 oil: Progress in lipid induction techniques towards industry adoption. *Food Chemistry* 297: 124937.
29. Daboussi F., Leduc S., Marechal A., Dubois G., Guyot V., Perez-Michaut C., Amato A., Falciatore A., Juillerat A., Beurdeley M., Voytas D., Cavarec L., Duchateau P. (2014) Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* for biotechnology. *Nature Communications* 5: 3831.
30. Dickson D.M.J., Kirst G.O. (1987) Osmotic adjustment in marine eukaryotic algae: The role of inorganic ions, quaternary ammonium, tertiary sulphonium and carbohydrate solutes: diatoms and a rhodophyte. *New Phytologist* 106: 645–655.
31. Domergue F., Abbadi A., Heinz E. (2005) Relief for fish stocks: oceanic fatty acids in transgenic oilseeds. *Trends in Plant Science* 10: 112–116.
32. Domergue F., Abbadi A., Zahringer U., Moreau H., Heinz E. (2005) *In vivo* characterization of the first acyl-CoA  $\Delta^6$ -desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *Biochemical Journal* 389: 483-490.
33. Domergue F., Spiekermann P., Lerchl J., Beckmann C., Kilian O., Kroth P., Boland W., Zahringer U., Heinz E. (2003) New Insight into *Phaeodactylum tricornerutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal  $\Delta^{12}$ -fatty acid desaturases. *Plant Physiology* 131: 1648-1660.
34. Dubots E., Audry M., Yamaryo Y., Bastien O., Ohta H., Breton C., Maréchal E., Block M.A. (2010) Activation of the chloroplast monogalactosyldiacylglycerol synthase MGD1 by phosphatidic acid and phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* 285: 6003–6011.
35. Eckert H., La Vallee B., Schweiger B.J., Kinney A.J., Cahoon E.B., Clemente T. (2006) Co-expression of the borage Delta 6 desaturase and the Arabidopsis Delta 15 desaturase results in high accumulation of stearidonic acid in the seeds of transgenic soybean. *Planta* 224(5): 1050-7.
36. Engler C., Youles M., Gruetzner R., Ehnert T.M., Werner S., Jones J.D.G., Patron N.J., Marillonnet S. (2014) A golden gate modular cloning toolbox for plants. *ACS Synthetic Biology* 3: 839-843.

37. Falciatore A., Jaubert M., Bouly J., Bailleul B., Mock T. (2020) Diatom molecular research comes of age: Model species for studying phytoplankton biology and diversity. *The Plant Cell* 32(3):547-572.
38. Furukawa-Stoffer T.L., Boyle R.M., Thomson A.L., Sarna M.A., Weselake R.J. (2003) Properties of lysophosphatidylcholine acyltransferase from *Brassica Napus* Cultures. *Lipids* 38: 651–656.
39. Gammone M.A., Riccioni G., Parrinello G., D’Orazio N. (2018) Omega-3 polyunsaturated fatty acids: Benefits and endpoints in sport. *Nutrients* 11(1): 46.
40. Gibellini F., Smith T. K. (2010) The Kennedy Pathway – *de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 62(6): 414-428.
41. Graham I.A., Larson T., Napier J.A. (2007) Rational metabolic engineering of transgenic plants for biosynthesis of omega-3 polyunsaturates. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 142-147.
42. Hamilton M.L., Haslam R.P., Napier J.A., Sayanova O. (2014) Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricornutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering* 22(100): 3-9.
43. Harwood J. (2019) Algae: critical source of very long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biomolecules* 9: 708.
44. He M., Qin C.X., Wang X., Ding N.Z. (2020) Plant unsaturated fatty acids: biosynthesis and regulation. *Frontiers in Plant Science* 11: 390.
45. Ichihara K., Asahi T., Fujii S. (1987) 1-acyl-*sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase in maturing safflower seeds and its contribution to the non-random fatty acid distribution of triacylglycerol. *European Journal of Biochemistry* 167(2): 339–347.
46. Innis S. (2007) Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *The Journal of Nutrition* 137(4): 855–859.
47. Jasieniecka K., Demski K., Lager I., Stymne S., Banaś A. (2016) Possible role of different yeast and plant lysophospholipid: acyl-CoA acyltransferases (LPLATs) in acyl remodeling of phospholipids. *Lipids* 51: 15-23.
48. Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Klińska-Bąchor S., Banaś A. (2023) Efficiency of phospholipid remodeling via acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases action is modified by acyl-CoAs. *European Journal of Lipid Science & Technology* 125: e2200217.

49. Keogh M.R., Courtney P.D., Kinney A.J., Dewey R.E. (2009) Functional characterization of phospholipid *N*-methyltransferases from Arabidopsis and Soybean. *The Journal of Biological Chemistry* 284(23): 15439-47.
50. Kim D.H., Park M.J., Gwon G.H., Silkov A., Xu Z.Y., Yang E.C., Song S., Song K., Kim Y., Yoon H.S. (2014) Chloroplast targeting factor AKR2 evolved from an ankyrin repeat domain coincidentally binds two chloroplast lipids. *Developmental Cell* 30: 598.
51. Kim S.H., Roh K.H., Park J.S., Kim K.S., Kim H.U., Lee K.R., Kang H.C, Kim J.B. (2014) Heterologous reconstitution of omega-3 polyunsaturated fatty acids in Arabidopsis. *BioMed Research International* 2015(2): 768478.
52. Kinney A.J., Cahoon E.B., Damude H.G., Hitz W.D., Kolar C.W., Liu Z.B. (2004) Production of very long chain polyunsaturated fatty acids in oilseed plants. E.I. Dupont De Nemours and Company, WO 2004/071467 A2.
53. Klińska S., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Banaś A. (2019). Acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferases (LPCATs) of *Camelina Sativa* seeds: biochemical properties and function. *Planta* 250: 1655–1670.
54. Klińska S., Kędzierska S., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Banaś A. (2021) *In vitro* growth conditions boost plant lipid remodelling and influence their composition. *Cells* 10(9): 2326.
55. Kroger N. (2007) Prescribing diatom morphology: toward genetic engineering of biological nanomaterials. *Current Opinion in Chemical Biology* 11(6): 662-9.
56. Kroon A. I.P.M. (2007) Metabolism of phosphatidylcholine and its implications for lipid acyl chain composition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemica et Biophysica Acta* 1771(3): 343-52.
57. Lager I., Yilmaz J.L., Zhou X.R., Jasieniecka K., Kazachkov M., Wang P., Zou J., Weselake R., Smith M.A., Bayon S., Dyer J.M., Shockey J.M., Heinz E., Green A., Banas A., Stymne S. (2013) Plant acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferases (LPCATs) have different specificities in their forward and reverse reactions. *The Journal of Biological Chemistry* 288(52): 36902-36914.
58. Lands W.E. (1958) Metabolism of glycerolipids: a comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 231: 883-888.
59. Lavagi I., Estelle M., Weckwerth W., Beynon J., Bastow R. (2012) From bench to bountiful harvests: a road map for the next decade of Arabidopsis research. *The Plant Cell* 24: 2240-2247.

60. Li-Beisson Y., Shorosh B., Beisson F., Andersson M.X., Arondel V., Bates P.D., Baud S., Bird D., DeBono A., Durrett T.P., Franke R.B., Graham I.A., Katayama K., Kelly A.A., Larson T., Markham J.E., Miquel M., Molina I., Nishida I., Rowland O., Samuels L., Schmid K.M., Wada H., Welti R., Xu C. Zallot R., Ohlrogge J. (2010) Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis Book* 8:e0133.
61. Li-Beisson Y., Thelen J., Fedosejevs E., Harwood J. (2019) The lipid biochemistry of eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 74: 31-68.
62. Lung S.C., Weselake R.J. (2006) Diacylglycerol acyltransferase: A key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids* 41(12): 1073-88.
63. Lupette J., Benning C. (2020) Human health benefits of very-long-chain polyunsaturated fatty acids from microalgae. *Biochimie* 178: 15-25.
64. Maeda Y., Nojima D., Yoshino T., Tanaka T. (2017) Structure and properties of oil bodies in diatoms. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 372: 20160408.
65. Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koomneef M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282(5389): 662, 679-82.
66. Melkikh A.V., Bessarab D.S. (2010) Model of active transport of ions through diatom cell biomembrane. *Bulletin of Mathematical Biology* 72: 1912–1924.
67. Mileykovskaya E., Dowhan W. (2005) Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. *Current Opinion in Microbiology* 8: 135–142.
68. Muhlroth A., Li K., Rokke G., Winge P., Olsen Y., Hohmann-Marriott M., Vadstein O., Bones A. (2013) Pathways of lipid metabolism in marine algae, co-expression network, bottlenecks and candidate genes for enhanced production of EPA and DHA in species of Chromista. *Marine Drugs* 11: 4662-4697.
69. Murakami H., Nobusawa T., Hori K., Shimojima M., Ohta H. (2018) Betaine lipid is crucial for adapting to low temperature and phosphate deficiency in *Nannochloropsis*. *Plant Physiology* 177: 181-193.
70. Mus F., Toussaint J.P., Cooksey K.E., Fields M.W., Gerlach R., Peyton B.M., Carlson R.P. (2013) Physiological and molecular analysis of carbon source supplementation and pH stress-induced lipid accumulation in the marine diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 3625–3642.
71. Nakanishi H., Shindou H., Hishikawa D., Harayama T., Ogasawara R., Suwabe A., Taguchi R., Shimizu T. (2006) Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-

- CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1). *Journal of Biological Chemistry* 281: 20140–20147.
72. Napier JA. (2007) The production of unusual fatty acids in transgenic plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 295–319.
  73. Nishizuka Y. (2003) Discovery and prospect of protein kinase C research: Epilogue. *The Journal of Biochemistry* 133: 155-158.
  74. Nymark M., Sharma A., Sparstad T., Bones A., Winge P. (2016) A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. *Scientific Reports* 6: 24951.
  75. O'Brien I.E., Bagauley B.C., Murray B.G., Morris B.A.M., Ferguson I.B. (1998) Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. *The Plant Journal* 13: 803–814.
  76. Oo K.C., Huang A.H.C. (1989) Lysophosphatidate acyltransferase activities in the microsomes from palm endosperm, maize scutellum, and rapeseed cotyledon of maturing seeds. *Plant Physiology* 91: 1288–1295.
  77. Overnell J. (1975) Potassium and photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* as related to washes with sodium chloride. *Physiologia Plantarum* 35: 217–224.
  78. Ozcan D.O., Ovez B. (2022) *Phaeodactylum tricorutum* as a potential feedstock for an integrated biorefinery process under varying cultivation conditions. *Elsevier* 45: 1878-8181.
  79. Pan X., Chen G., Kazachkov M., Greer M.S., Caldo K.M.P., Zou J., Weselake R.J. (2015) *In vivo* and *in vitro* evidence for biochemical coupling of reactions catalyzed by lysophosphatidylcholine acyltransferase and diacylglycerol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 290: 18068–18078.
  80. Petrie J.R., Shrestha P., Zhou X., Mansour M.P., Liu Q., Belide S., Nichols P.D., Singh S.P. (2012) Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA. *Plos One* 7(11): e49165.
  81. Połńska A., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., You L., Hao X, Klińska S, Gong Y., Banaś A. (2021) Diatoms and plants acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferases (LPCATs) exhibit diverse substrate specificity and biochemical properties. *International Journal of Molecular Sciences* 22(16): 9056.
  82. Popko J. (2016) Lipid Composition of the Model Diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Encyclopedia of Lipidomics*.

83. Qi B., Fraser T., Mugford S., Dobson G., Sayanova O., Butler J., Napier J.A., Stobart A.K., Lazarus C.M. (2004) Production of very long chain polyunsaturated omega-3 and omega-6 fatty acids in plants. *Nature Biotechnology* 22: 739-745.
84. Renne M.F. Bao X., Smet C.H.D., Kroon A. I.P.M. (2015) Lipid acyl chain remodeling in yeast. *Lipid Insights* 8(1): 33–40.
85. Robert S.S., Singh S.P., Zhou X., Petrie J.R., Blackburn S.I., Mansour P.M., Nichols P.D., Liu Q., Green A.G (2005) Metabolic engineering of Arabidopsis to produce nutritionally important DHA in seed oil. *Functional Plant Biology* 32: 473-479.
86. Ruiz-Lopez N., Haslam R.P., Usher S.L., Napier J.A., Sayanova O. (2013) Reconstitution of EPA and DHA biosynthesis in Arabidopsis: Iterative metabolic engineering for the synthesis of n-3 LC-PUFAs in transgenic plants. *Metabolic Engineering* 17: 30-41.
87. Ruiz-López N., Sayanova O., Napier J.A., Haslam R.P. (2012) Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. *Journal of Experimental Botany* 63(7): 2397-2410.
88. Rustan A.C., Drevon C (2005) Fatty acids: structures and properties. *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons: Oslo, Norway.
89. Sayanova O., Mimouni V., Ulmann L., Morant-Manceau A., Pasquet V., Schoefs B., Napier J.A. (2017) Modulation of lipid biosynthesis by stress in diatoms. *Philosophical Transactions Royal Society B*. 372: 20160407.
90. Schmid K.M., Ohlrogge J.B. (2002) Lipid metabolism in plants. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*.
91. Somerville C., Browse J., Jaworski J.G., John Ohlrogge J. (2000) Lipids: W: *Biochemistry & molecular biology of plants*. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, eds., American Society of Plant Physiologist., Rockville, Maryland, 456-527.
92. Stahl U., Stalberg K., Stymne S., Ronne H. (2007) A family of eukaryotic lysophospholipid acyltransferases with broad specificity. *FEBS Letters* 582: 305-309.
93. Ståhl U., Stålberg K., Stymne S., Ronne H. (2008) A family of eukaryotic lysophospholipid acyltransferases with broad specificity. *FEBS Letters* 582: 305–309.
94. Tehlivets O., Scheuringer K., Kohlwein S.D. (2007) Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771(3): 255-70.
95. Tesson B., Genet M., Fernandez V., Degand S., Rouxhet P., Jezequel V. (2009) Surface Chemical Composition of Diatoms. *ChemBioChem* 10: 2011-2024.

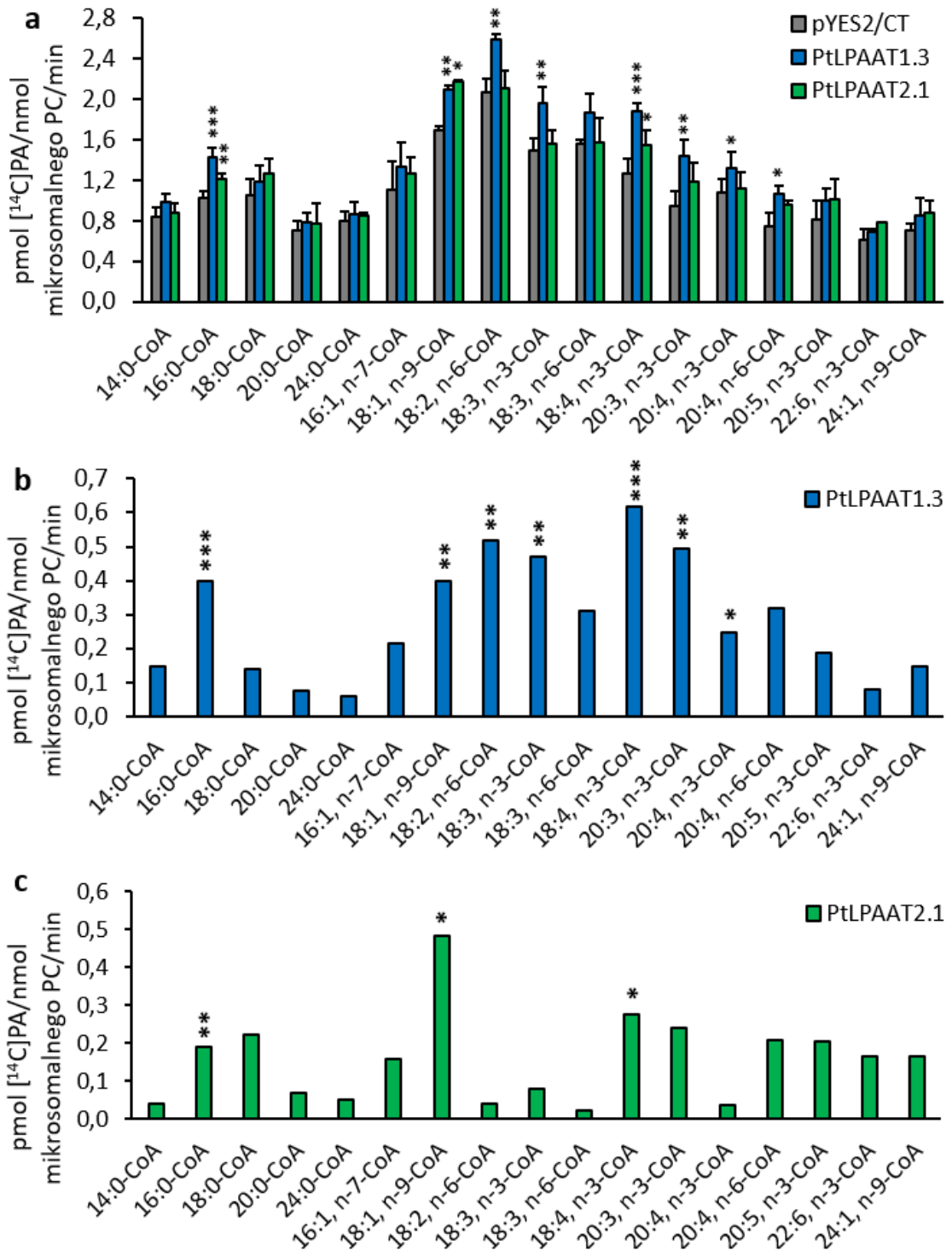


96. Tocher D., Betancor M., Sprague M., Olsen R., Napier J. (2019) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, EPA and DHA: Bridging the gap between supply and demand. *Nutrients* 11(1): 89.
97. Valenzuela R., Valenzuela B.A. (2013) Overview About Lipid Structure. *Lipid Metabolism*.
98. Vance J.E., Steenbergen R. (2005) Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in Lipid Research* 44: 207-234.
99. Vrinten P., Wu G., Truksa M., Qiu X. (2007) Production of polyunsaturated fatty acids in transgenic plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 24: 1.
100. Wada H., Murata N. (2007) The essential role of phosphatidylglycerol in photosynthesis. *Photosynthesis Research* 92: 205-215.
101. Wang L., Shen W., Kazachkov M., Chen G., Chen Q., Carlsson A.S., Stymne C., Weselake R.J., Zou J. (2012) Metabolic interactions between the Lands cycle and the Kennedy pathway of glycerolipids synthesis in *Arabidopsis* developing seeds. *The Plant Cell* 24: 4652-4669.
102. Winter E., Brummel M., Schuch R., Spender F. (1997) Decarboxylation of malonyl-(acyl carrier protein) by 3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthases in plant fatty acid biosynthesis. *Biochemical Journal* 321: 313-318.
103. Wu G., Truksa M., Datla N., Vrinten P., Bauer J., Zank T., Cirpus P., Heinz E., Qui X. (2005) Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. *Nature Biotechnology* 23: 1013-1017.
104. Yang Y.H., Du L., Hosokawa M., Miyashita K., Kokubun Y., Arai H., Taroda H. (2017) Fatty acid and lipid class composition of the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Journal of Oleo Science* 66(4): 363-368.
105. You L., Jouhet J., Maréchal E., Amato A., Hao X., Zhang D., Banaś A., Gong Y. (2023) Acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase from the unicellular diatom *Phaeodactylum tricorutum* (*PtLPCAT1*) is involved in triacylglycerol and galactoglycerolipid synthesis and enhances eicosapentaenoic acid accumulation in recombinant oleaginous yeast. *Plant Biotechnology Journal* 21(2): 238-240.
106. You L., Połońska A., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Richard F., Jouhet J., Maréchal E., Banaś A., Hu H., Pan Y., Hao X., Jin H., Allen A. E., Amato A., Gong Y. (2024) Two plastidial lysophosphatidic acid acyltransferases differentially mediate the biosynthesis of membrane lipids and triacylglycerols in *Phaeodactylum tricorutum*. *New Phytologist* 241(4): 1543-1558.



107. Zhang H., Zeng R., Chen D., Liu J. (2016) A pivotal role of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in regulation of lipid production in *Phaeodactylum Tricornutum*. *Scientific Reports* 6: 31319.
108. Zheng Q., Li J.Q., Kazachkov M., Liu K., Zou J. (2012) Identification of *Brassica Napus* lysophosphatidylcholine acyltransferase genes through yeast functional screening. *Phytochemistry* 75: 21–31.
109. Zulu N., Zienkiewicz K., Vollheyde K., Feussner I. (2018) Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research* 70: 1-16.

## 8. SUPPLEMENT



**Rys. S1.** Aktywność typu LPAAT enzymu *PtLPAAT1* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J11916*) oraz *PtLPAAT2* (kodowanego przez gen *Phatr3\_J43099*) w stosunku do *sn-1*-[<sup>14</sup>C]18:1-LPA oraz siedemnastu różnych donorów kwasów tłuszczowych (acylo-CoA). Jako „tło” traktowano aktywność typu LPAAT mikrosomów uzyskanych z drożdży

delecyjnych  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT. **a** – wykres przedstawiający specyficzność substratową badanych enzymów typu LPAAT bez odjętej aktywności „tła”, którą przedstawiono w postaci szarego słupka, **b** – wykres przedstawiający specyficzność substratową enzymu *PtLPAAT1* po odjęciu aktywności „tła”, **c** – wykres przedstawiający specyficzność substratową enzymu typu *PtLPAAT2* po odjęciu aktywności „tła”.

Aktywność enzymu *PtLPAAT1* mierzono dla frakcji mikrosomalnej uzyskanej z drożdży pochodzących z pojedynczej kolonii komórkowej „3”, a enzymu *PtLPAAT2* z kolonii komórkowej „1”. Aktywność kontrolną zmierzono dla frakcji mikrosomalnej pYES2/CT.4. Wyniki przedstawiono w postaci średniej wraz z odchyleniem standardowym. Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych pustym plazmidem pYES2/CT a aktywnością dla mikrosomów z drożdży  $\Delta ALE1$  transformowanych plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J11916* lub *Phatr3\_J43099*, w stosunku do konkretnego acylo-CoA. Istotność statystyczną wyznaczono przy użyciu testu T Studenta, gdzie \*\*\* -  $p \leq 0,001$ , \*\* -  $p \leq 0,01$ , \* -  $p \leq 0,05$ .

**Tabela S1.** Włączenie [<sup>14</sup>C]16:0 do fosfolipidów naturalnie występujących we frakcjach mikrosomalnych z drożdży *ΔALE1* ze wstawionym pustym plazmidem pYES2/CT lub plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricornutum* przy zastosowaniu warunków reakcji promujących reakcje *backward* z wykorzystaniem [<sup>14</sup>C]16:0-CoA jako donora kwasów tłuszczowych.

Mikrosomy	Czas inkubacji [min]	pmol [ <sup>14</sup> C]PL/nmol mikrosomalnego PC								
		[ <sup>14</sup> C]PC			[ <sup>14</sup> C]PE			[ <sup>14</sup> C]PA		
		- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ
<i>ΔALE1+</i> <i>PtLPCAT1</i>	10	0	8,9 ±2,2	-8,9	0	2,4 ±1,8	-2,4	0	4,6 ±4,4	-4,6
	30	28,8 ±2,8	25,7 ±3,4	3,2	4,8 ±0,7	7,0 ±1,9	-2,2	10,5 ±1,0	10,0 ±2,4	0,4
	60	36,8 ±10,0	39,7 ±5,7	-3,0	3,5 ±3,1	11,8 ±2,8	-8,4	14,3 ±4,1	15,8 ±3,9	-1,5
<i>ΔALE1+</i> pYES2	10	2,4 ±0,9	4,7 ±0,1	-2,2	0	0	0	0	0	0
	30	4,3 ±0,2	11,8 ±2,2	-7,5	0	3,2 ±1,4	-3,2	1,9 ±1,8	3,6 ±3,3	-1,7
	60	4,9 ±2,0	23,3 ±1,1	-18,5	0	9,9 ±1,5	-9,9	4,1 ±1,7	13,6 ±2,2	-9,5

W tabeli (testy „-DTNB” oraz testy „+DTNB”) przedstawiono wyniki średnie ± odchylenie standardowe (n ≥ 3); PC – fosfatydylocholina, PE – fosfatydyloetanolamina, PA – kwas fosfatydowy. -DTNB – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]16:0 do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których poszczególne lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT oraz w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

+DTNB - intensywność włączania [<sup>14</sup>C]16:0 do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których reakcje *backward* katalizowane przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT zostały zablokowane, a lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

Δ – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]16:0 do poszczególnych fosfolipidów w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT; od ilości produktu powstałego w testach „- DTNB” odejmowano ilości produktu powstałego w testach „+DTNB”.

**Tabela S2.** Włączenie [<sup>14</sup>C]18:0 do fosfolipidów naturalnie występujących we frakcjach mikrosomalnych z drożdży *ΔALE1* ze wstawionym pustym plazmidem pYES2/CT lub plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricornutum* przy zastosowaniu warunków reakcji promujących reakcje *backward* z wykorzystaniem [<sup>14</sup>C]18:0-CoA jako donora kwasów tłuszczowych.

Mikrosomy	Czas inkubacji [min]	pmol [ <sup>14</sup> C]PL/nmol mikrosomalnego PC								
		[ <sup>14</sup> C]PC			[ <sup>14</sup> C]PE			[ <sup>14</sup> C]PA		
		- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ
<i>ΔALE1+</i> <i>PtLPCAT1</i>	10	5,8 ±1,1	7,5 ±2,3	-1,8	0	1,7 ±0,5	-1,7	0	0	0
	30	11,9 ±4,8	14,5 ±1,2	-2,6	0	2,7 ±1,7	-2,7	0	2,8 ±2,1	-2,8
	60	32,8 ±6,7	22,7 ±1,3	10,1	1,6 ±1,0	5,2 ±1,0	-3,6	4,6 ±0,5	4,0 ±1,8	0,6
<i>ΔALE1+</i> pYES2	10	0,1 ±0,2	1,3 ±0,5	-1,2	0	0	0	0	0	0
	30	1,5 ±0,7	2,3 ±1,0	-0,8	0	0	0	2,0 ±1,5	0	2,0
	60	1,3 ±1,2	8,0 ±2,3	-6,7	0	3,3 ±2,0	-3,3	1,2 ±2,1	3,5 ±1,5	-2,3

W tabeli (testy „-DTNB” oraz testy „+DTNB”) przedstawiono wyniki średnie ± odchylenie standardowe (n ≥ 3); PC – fosfatydylocholina, PE – fosfatydyloetanolamina, PA – kwas fosfatydowy. -DTNB – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:0 do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których poszczególne lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT oraz w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

+DTNB - intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:0 do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których reakcje *backward* katalizowane przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT zostały zablokowane, a lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

Δ – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:0 do poszczególnych fosfolipidów w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT; od ilości produktu powstałego w testach „-DTNB” odejmowano ilość produktu powstałego w testach „+DTNB”.

**Tabela S3.** Włączenie [<sup>14</sup>C]18:1 do fosfolipidów naturalnie występujących we frakcjach mikrosomalnych z drożdży *ΔALE1* ze wstawionym pustym plazmidem pYES2/CT lub plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricornutum* przy zastosowaniu warunków reakcji promujących reakcje *backward* z wykorzystaniem [<sup>14</sup>C]18:1-CoA jako donora kwasów tłuszczowych.

Mikrosomy	Czas inkubacji [min]	pmol [ <sup>14</sup> C]PL/nmol mikrosomalnego PC								
		[ <sup>14</sup> C]PC			[ <sup>14</sup> C]PE			[ <sup>14</sup> C]PA		
		- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ
<i>ΔALE1+</i> <i>PtLPCAT1</i>	10	38,8 ±4,1	18,3 ±1,5	20,5	9,5 ±1,0	4,9 ±1,2	4,6	6,1 ±1,9	5,9 ±1,4	0,2
	30	97,5 ±7,3	28,7 ±1,2	68,8	26,4 ±2,4	8,8 ±3,6	17,7	15,9 ±1,7	11,2 ±1,2	4,8
	60	132,7 ±18,2	35,7 ±3,8	97,1	31,8 ±6,4	10,0 ±1,8	21,8	20,7 ±2,5	15,5 ±2,4	5,2
<i>ΔALE1+</i> pYES2	10	0	0	0	0	0	0	3,2 ±1,7	4,0 ±2,4	-0,8
	30	1,3 ±1,1	0	1,3	0	0	0	8,3 ±1,7	5,5 ±0,7	2,7
	60	3,3 ±1,7	11,5 ±2,6	-8,1	0	0	0	13,8 ±0,7	16,7 ±2,8	-2,9

W tabeli (testy „-DTNB” oraz testy „+DTNB”) przedstawiono wyniki średnie ± odchylenie standardowe (n ≥ 3); PC – fosfatydylocholina, PE – fosfatydyloetanolamina, PA – kwas fosfatydowy. -DTNB – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:1 do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których poszczególne lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT oraz w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

+DTNB - intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:1 do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których reakcje *backward* katalizowane przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT zostały zablokowane, a lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

Δ – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:1 do poszczególnych fosfolipidów w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT; od ilości produktu powstałego w testach „-DTNB” odejmowano ilość produktu powstałego w testach „+DTNB”.

**Tabela S4.** Włączenie [<sup>14</sup>C]18:2 do fosfolipidów naturalnie występujących we frakcjach mikrosomalnych z drożdży *ΔALE1* ze wstawionym pustym plazmidem pYES2/CT lub plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricornutum* przy zastosowaniu warunków reakcji promujących reakcje *backward* z wykorzystaniem [<sup>14</sup>C]18:2-CoA jako donora kwasów tłuszczowych.

Mikrosomy	Czas inkubacji [min]	pmol [ <sup>14</sup> C]PL/nmol mikrosomalnego PC								
		[ <sup>14</sup> C]PC			[ <sup>14</sup> C]PE			[ <sup>14</sup> C]PA		
		- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ
<i>ΔALE1+</i> <i>PtLPCAT1</i>	10	59,6 ±1,1	31,9 ±1,0	27,7	10,0 ±1,0	9,1 ±1,3	0,9	6,9 ±2,4	12,8 ±3,1	-5,9
	30	112,1 ±17,8	55,1 ±5,2	57,0	31,7 ±6,3	14,3 ±1,5	17,4	16,9 ±4,8	19,5 ±1,1	-2,6
	60	175,3 ±4,4	72,0 ±3,9	103,3	43,2 ±4,6	20,9 ±2,5	22,3	15,3 ±2,1	26,3 ±3,9	-11,0
<i>ΔALE1+</i> pYES2	10	3,3 ±0,9	2,3 ±0,9	1,1	0	0	0	2,0 ±0,7	8,9 ±0,9	-6,8
	30	6,4 ±1,5	7,1 ±1,1	-0,7	0	0	0	6,8 ±1,6	14,4 ±2,5	-7,7
	60	7,5 ±1,3	10,5 ±2,0	-3,0	0	2,5 ±0,7	-2,5	8,7 ±1,6	14,1 ±2,1	-5,3

W tabeli (testy „-DTNB” oraz testy „+DTNB”) przedstawiono wyniki średnie ± odchylenie standardowe (n ≥ 3); PC – fosfatydylocholina, PE – fosfatydyloetanolamina, PA – kwas fosfatydowy. -DTNB – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:2 do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których poszczególne lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT oraz w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

+DTNB - intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:2 do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których reakcje *backward* katalizowane przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT zostały zablokowane, a lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

Δ – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:2 do poszczególnych fosfolipidów w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT; od ilości produktu powstałego w testach „-DTNB” odejmowano ilości produktu powstałego w testach „+DTNB”.

**Tabela S5.** Włączenie [<sup>14</sup>C]18:3 do fosfolipidów naturalnie występujących we frakcjach mikrosomalnych z drożdży *ΔALE1* ze wstawionym pustym plazmidem pYES2/CT lub plazmidem pYES2/CT niosącym gen *Phatr3\_J20460* (kodujący *PtLPCAT1*) pochodzący z *Phaeodactylum tricorutum* przy zastosowaniu warunków reakcji promujących reakcje *backward* z wykorzystaniem [<sup>14</sup>C]18:3-CoA jako donora kwasów tłuszczowych.

Mikrosomy	Czas inkubacji [min]	pmol [ <sup>14</sup> C]PL/nmol mikrosomalnego PC								
		[ <sup>14</sup> C]PC			[ <sup>14</sup> C]PE			[ <sup>14</sup> C]PA		
		- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ
<i>ΔALE1+</i> <i>PtLPCAT1</i>	2	23,9 ±0,7	15,5 ±1,7	8,4	0,7 ±1,3	2,3 ±0,9	-1,5	0	1,1 ±0,8	-0,5
	5	40,9 ±1,8	24,4 ±3,6	16,4	3,7 ±2,3	6,8 ±0,8	-3,1	3,6 ±1,7	6,5 ±0,8	-2,9
	10	56,4 ±4,9	33,8 ±0,4	22,6	11,8 ±1,2	8,0 ±1,2	3,8	6,2 ±1,9	8,2 ±1,0	-1,9
	30	94,7 ±3,1	41,3 ±3,4	53,5	25,9 ±2,9	10,4 ±0,9	15,4	12,1 ±1,5	12,5 ±1,4	-0,4
	60	137,4 ±2,7	77,2 ±7,9	60,3	34,9 ±0,7	18,9 ±0,6	16,0	14,2 ±1,7	19,8 ±2,2	-5,6
<i>ΔALE1+</i> pYES2	2	3,0 ±1,8	3,1 ±1,4	-0,1	0	0	0	0	0	0
	5	3,0 ±0,8	3,9 ±0,8	-0,9	0	0	0	0	0	0
	10	2,7 ±2,1	5,6 ±0,6	-2,9	0	2,0 ±1,4	-2,0	0,9 ±1,5	6,8 ±0,6	-5,9
	30	6,3 ±0,9	8,6 ±2,4	-2,3	0	1,4 ±1,4	-1,4	3,6 ±1,2	11,2 ±4,7	-7,6
	60	8,2 ±0,6	14,4 ±1,3	-6,2	0	2,1 ±1,1	-2,1	5,6 ±0,8	18,0 ±2,4	-12,4

W tabeli (testy „-DTNB” oraz testy „+DTNB”) przedstawiono wyniki średnie ± odchylenie standardowe (n ≥ 3); PC –fosfatydylocholina, PE – fosfatydyloetanolamina, PA – kwas fosfatydowy.

-DTNB – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:3 do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których poszczególne lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT oraz w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

+DTNB - intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:3 do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których reakcje *backward* katalizowane przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT zostały zablokowane, a lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

Δ – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]18:3 do poszczególnych fosfolipidów w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT; od ilości produktu powstałego w testach „-DTNB” odejmowano ilości produktu powstałego w testach „+DTNB”.



**Tabela S6.** Całkowita zawartość PC, w tym procent „nowych” zmodyfikowanych cząsteczek PC, w osadach mikrosomów powstających po odwirowaniu buforu inkubacyjnego wykorzystywanego w reakcjach *forward* modyfikujących skład mikrosomalnego PC. Dla cząsteczek PC zawierających kwas tłuszczowy 18:1 w obydwu pozycjach (*sn-1* i *sn-2*) podano tylko całkowite zawartości PC/test ze względu na brak możliwości identyfikacji jaką zawartość stanowiły nowo zsyntetyzowane PC.

„Nowe„ cząsteczki PC wzbogacające dane frakcje mikrosomalne	Całkowita zawartość PC [nmol/test]	Zawartość endogennego PC [nmol/test]	Zawartość nowych cząsteczek PC [nmol/test]	Zawartość nowych cząsteczek PC [%]
<i>sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)</i> -PC (+PtLPCAT1)	3,74±0,72	1,81±0,35	1,92±0,43	51,3±4,6
<i>sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)</i> -PC (+PtLPCAT1)	3,11±0,52	1,39±0,49	1,72±0,10	56,7±7,5
<i>sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)</i> -PC (+PtLPCAT1)	3,56±0,68	1,74±0,45	1,82±0,45	51,2±7,6
<i>sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)</i> -PC (+PtLPCAT1)	2,70±0,59	1,29±0,23	1,41±0,64	50,5±14,4
<i>sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)</i> -PC (+PtLPCAT1)	2,74±0,27	1,36±0,16	1,38±0,41	49,5±10,9
<i>sn-1-18:1-sn-2-18:1(n-9)</i> -PC (+PtLPCAT1)	3,93±0,42			
<i>sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)</i> -PC (+AtLPCAT2)	3,79±0,69	2,91±0,41	0,88±0,3	22,7±4,6
<i>sn-1-18:1-sn-2-18:1(n-9)</i> -PC (+AtLPCAT2)	2,51±0,47			
<i>sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)</i> -PC (+ALE1)	3,38±0,27	2,85±0,14	0,53±0,14	15,43±2,7
<i>sn-1-18:1-sn-2-18:1(n-9)</i> -PC (+ALE1)	2,24±0,32			

**Tabela S7.** Intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogaconych o nowe „gatunki” PC w zależności od różnych donorów [<sup>14</sup>C]kwasów tłuszczowych - [<sup>14</sup>C]acylo-CoA, dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno.

Donor	Czas inkubacji [min]	pmol [ <sup>14</sup> C]PC/nmol mikrosomalnego PC					
		„Nowe” cząsteczki PC wzbogacające mikrosomalne PC					
Acyl-CoA		<i>sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-3)</i> -PC			<i>sn-1-18:1-sn-2-18:3(n-6)</i> -PC		
		- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ
[ <sup>14</sup> C]16:0-CoA	30	21,9 ±3,3	25,8 ±6,1	0	138,3 ±30,4	43,6 ±12,4	94,7
	60	42,9 ±6,8	29,1 ±3,3	13,9	286,3 ±50,3	68,1 ±18,3	218,2
[ <sup>14</sup> C]18:0-CoA	30	14,5 ±1,3	0	14,5	57,8 ±2,5	33,2 ±6,3	24,6
	60	21,8 ±2,3	0	21,8	82,3 ±17,3	48,1 ±5,6	34,2
[ <sup>14</sup> C]18:1-CoA	30	73,6 ±22,2	13,6 ±1,3	60,0	706,2 ±52,3	718,9 ±22,3	0
	60	160,1 ±30,3	20,9 ±0,8	139,2	447,1 ±40,9	636,6 ±26,1	0
[ <sup>14</sup> C]18:2-CoA	30	88,6 ±9,3	12,2 ±0,3	76,4	681,9 ±138,4	465,7 ±136,9	216,2
	60	244,0 ±33,8	12,4 ±0,6	231,6	941,3 ±164,3	415,5 ±191,6	525,8
[ <sup>14</sup> C]18:3-CoA	30	95,7 ±6,0	0	95,7	537,1 ±25,2	609,1 ±156,3	0
	60	189,0 ±20,2	0	189,0	682,6 ±61,4	660,3 ±63,3	22,3

W tabeli (testy „-DTNB” oraz testy „+DTNB”) przedstawiono wyniki średnie ± odchylenie standardowe (n ≥ 3);

PC –fosfatydylocholina,

-DTNB – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]FA do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których poszczególne lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT oraz w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

+DTNB - intensywność włączania [<sup>14</sup>C]FA do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których reakcje *backward* katalizowane przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT zostały zablokowane, a lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

Δ – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]FA do poszczególnych fosfolipidów w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT; od ilości produktu powstałego w testach „-DTNB” odejmowano ilości produktu powstałego w testach „+DTNB, jeżeli wynik był ujemny to wpisywano 0.

**Tabela S7 cd.** Intensywność remodelowania PC frakcji mikrosomalnych z drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT1* wzbogaconych o nowe „gatunki” PC w zależności od różnych donorów [<sup>14</sup>C]kwasów tłuszczowych - [<sup>14</sup>C]acylo-CoA dodawanych do mieszanin reakcyjnych osobno.

Donor	Czas inkubacji [min]	pmol [ <sup>14</sup> C]PC/nmol mikrosomalnego PC								
		„Nowe” cząsteczki PC wzbogacające mikrosomalne PC								
Acylo-CoA		<i>sn-1-18:1-sn-2-18:4(n-3)-PC</i>			<i>sn-1-18:1-sn-2-20:4(n-3)-PC</i>			<i>sn-1-18:1-sn-2-20:5(n-3)-PC</i>		
		- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ	- DTNB	+ DTNB	Δ
[ <sup>14</sup> C]16:0-CoA	30	34,8 ±7,0	22,2 ±2,8	12,6	42,1 ±2,1	14,1 ±0,9	28,0	19,5 ±0,7	24,5 ±8,0	0
	60	47,1 ±4,5	35,1 ±10,3	12,0	94,8 ±5,3	22,4 ±1,9	72,4	37,6 ±7,7	40,0 ±6,8	0
[ <sup>14</sup> C]18:0-CoA	30	10,9 ±1,8	6,5 ±1,2	4,4	12,9 ±3,6	12,5 ±3,0	0,4	24,5 ±1,0	19,7 ±2,9	4,8
	60	18,1 ±1,2	11,5 ±2,0	6,6	10,1 ±4,1	7,8 ±1,7	2,3	34,1 ±1,4	18,2 ±1,2	15,9
[ <sup>14</sup> C]18:1-CoA	30	391,5 ±25,7	27,3 ±5,9	364,2	202,2 ±13,8	166,0 ±5,8	36,2	232 ±24,9	38,8 ±3,0	193,2
	60	621,9 ±43,9	38,6 ±3,3	583,3	327,3 ±16,3	146,8 ±19,5	180,5	381,8 ±39,9	50,3 ±7,5	331,5
[ <sup>14</sup> C]18:2-CoA	30	92,0 ±17,5	25,4 ±2,6	66,6	56,2 ±9,2	130,8 ±5,8	0	121,4 ±11,4	35,4 ±4,9	86,0
	60	177,3 ±51,8	37,2 ±7,2	140,1	127,9 ±18,5	145,8 ±18,3	0	186,3 ±25,8	54,1 ±5,5	132,2
[ <sup>14</sup> C]18:3-CoA	30	268,6 ±16,5	11,8 ±1,6	256,8	249,0 ±55,0	236,1 ±13,3	12,9	186,5 ±11,4	33,8 ±5,1	152,7
	60	406,6 ±37,0	16,7 ±0,8	389,9	266,2 ±31,5	231,9 ±1,9	34,3	368,8 ±8,5	59,1 ±3,1	309,7

W tabeli (testy „-DTNB” oraz testy „+DTNB”) przedstawiono wyniki średnie ± odchylenie standardowe (n ≥ 3); PC –fosfatydylocholina,

-DTNB – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]FA do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których poszczególne lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT oraz w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

+DTNB - intensywność włączania [<sup>14</sup>C]FA do poszczególnych fosfolipidów w warunkach w których reakcje *backward* katalizowane przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT zostały zablokowane, a lizofosfolipidy powstają w wyniku reakcji innego typu (np. aktywność fosfolipaz czy PDATu).

Δ – intensywność włączania [<sup>14</sup>C]FA do poszczególnych fosfolipidów w wyniku reakcji *backward* katalizowanych przez zawarte w mikrosomach enzymy typu LPLAT; od ilości produktu powstałego w testach „-DTNB” odejmowano ilości produktu powstałego w testach „+DTNB, jeżeli wynik był ujemny to wpisywano 0.

**Tabela S8.** Procent wymiany kwasów tłuszczowych w fosfatydylocholinie zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych drożdży nadeksprymujących *PtLPCAT* na kwasy tłuszczowe pochodzące z różnych cząsteczek [<sup>14</sup>C]acylo-CoA w ciągu godziny inkubacji; A – w wyniku reakcji *backward*; B – w wyniku reakcji *backward* i innych reakcji produkujących LPC (testy bez dodatku DTNB).

„Nowe,” cząsteczki PC wzbogacające dane frakcje mikrosomalne (% puli PC)	Całkowita zawartość PC [nmol/test]	% wymiany kwasów tłuszczowych fosfatydylocholiny zmodyfikowanych frakcji mikrosomalnych na kwasy tłuszczowe pochodzące z odpowiedniego [ <sup>14</sup> C]acylo-CoA w ciągu godziny w wyniku reakcji <i>backward</i> (A) oraz procent całkowitej wymiany (B)									
		[ <sup>14</sup> C]acylo-CoA									
		16:0-CoA		18:0-CoA		18:1-CoA		18:2-CoA		18:3-CoA	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>sn</i> -1-18:1- <i>sn</i> -2- 18:3(n-3)-PC [51,3%]	3,74	1,39	4,29	2,18	2,18	13,9	16,0	23,2	24,4	18,9	18,9
<i>sn</i> -1-18:1- <i>sn</i> -2- 18:3(n-6)-PC [56,7%]	3,11	21,8	28,6	3,42	8,23	0	44,7	52,6	94,1	2,23	68,3
<i>sn</i> -1-18:1- <i>sn</i> -2- 18:4(n-3)-PC [51,2%]	3,56	1,20	4,71	0,66	1,81	58,3	62,2	14,0	17,7	39,0	40,7
<i>sn</i> -1-18:1- <i>sn</i> -2- 20:4(n-3)-PC [50,5%]	2,70	7,24	9,48	0,23	1,01	18,1	32,7	0	12,8	3,43	26,6
<i>sn</i> -1-18:1- <i>sn</i> -2- 20:5(n-3)-PC [49,5%]	2,74	0	3,76	1,59	3,41	33,2	38,2	13,2	18,6	31,0	36,9

W niektórych przypadkach w testach z dodatkiem DTNB wymiana kwasów tłuszczowych w PC była wyższa niż w testach bez dodatku DTNB (przestawionych obecnie jako całkowita wymiana); dane w Tabeli S7.

