

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

mgr Ada Połowska

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 transgenicznych 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^{Δ5,8,11,14,17}) wykazano jednak, że nie wszystkie acylo-CoA zawierające nienasycone kwasy tłuszczowe (potencjalne intermediały 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 endogenny *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.