



Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Sylwia Klińska

Charakterystyka biochemiczna oraz
określenie roli w remodelowaniu
fosfolipidów wybranych
acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid

Biochemical properties and functions in phospholipid
remodeling of different
acyl-CoA:lysophospholipids acyltransferases

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie nauki biologiczne

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

GDAŃSK 2022

Panu prof. dr hab. Antoniemu Banasiowi

*za ogrom przekazanej wiedzy i umiejętności, cenne uwagi oraz opiekę nad przebiegiem
mojej pracy naukowej,*

Katarzynie Jasienieckiej-Gazarkiewicz oraz Kamilowi Demskiemu

za naukę metod, pomoc w realizacji eksperymentów oraz merytoryczne wskazówki,

Moim Rodzicom Jolancie i Andrzejowi Klińskim,

Paulinie Rapalski oraz Tomaszowi Bąchorowi

za pomoc, wsparcie, cierpliwość i motywację,

z całego serca dziękuję.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	9
ABSTRACT	11
SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	13
WPROWADZENIE I CELE PRACY	17
1. PRZEGLĄD LITERATURY.....	21
1.1. Lipidy – definicja, klasyfikacja, występowanie oraz funkcje	21
1.2. Kwasy tłuszczowe	22
1.2.1. Synteza <i>de novo</i> kwasów tłuszczowych.....	26
1.3. Glicerolipidy.....	31
1.3.1. Biosynteza fosfolipidów oraz glikolipidów	31
1.3.2. Fosfolipidy – budowa, rola oraz alternatywne ścieżki syntezy	34
1.3.2.1. Fosfatydylocholina.....	34
1.3.2.2. Fosfatydyloetanolamina	35
1.3.2.3. Kwas fosfatydowy.....	36
1.3.2.3. Fosfatydyloinozytol, fosfatydyloseryna oraz fosfatydyloglicerol	37
1.3.3. Glikolipidy – budowa, rola oraz alternatywne ścieżki syntezy	39
1.3.4. Lipidy neutralne– budowa, funkcje oraz biosynteza	40
1.3.4.1. Biosynteza triacylogliceroli.....	41
1.4. Remodelowanie lipidów membranowych.....	44
1.4.1. Modyfikacje fosfolipidów oraz galaktolipidów zachodzące pod wpływem procesu remodelowania	44
1.4.2. Potencjalne enzymy uczestniczące w procesie remodelowania	45
1.5. Acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT).....	47
1.5.1. LPCAT – acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina	48
1.5.2. LPAAT – acylotransferazy acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy	49
1.5.3. LPEAT – acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina	50

1.6. <i>Camelina sativa</i> – opis, hodowla oraz właściwości	51
1.6.1. Wykorzystanie <i>Camelina sativa</i> w badaniach naukowych	57
2. MATERIAŁY	60
2.1. Szczepy <i>Escherichia coli</i> oraz <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
2.2. <i>Camelina sativa</i> (lnicznik pospolity).....	60
2.3. Plazmidowe wektory ekspresyjne	61
2.4. Startery do amplifikacji genów kodujących <i>CsLPEAT1</i> oraz <i>CsLPEAT2</i>	61
2.5. Sekwencje wykorzystane do analizy filogenetycznej oraz uliniowania sekwencji aminokwasowych wariantów izoform <i>CsLPEAT1</i> oraz <i>CsLPEAT2</i>	63
2.6. Podłoża hodowlane.....	65
2.7. Wykorzystane w badaniach odczynniki.....	66
2.8. Wykorzystana w badaniach aparatura	73
2.9. Programy komputerowe.....	74
3. METODY.....	75
3.1. Warunki hodowli <i>Camelina sativa</i>	75
3.1.1. Hodowla <i>Camelina sativa</i> na podłożu hodowlanym	75
3.1.2. Hodowla <i>Camelina sativa</i> w kulturach płynnych.....	75
3.2. Izolacja RNA z <i>Camelina sativa</i>	76
3.3. Synteza cDNA.....	77
3.5. Amplifikacja sekwencji <i>CsLPEAT1</i> oraz <i>CsLPEAT2</i>	78
3.6. Elektroforeza agarozowa.....	80
3.7. Oczyszczenie fragmentów DNA z żelu agarozowego.....	80
3.8. Sekwencjonowanie	81
3.9. Analiza bioinformatyczna	81
3.10. Wprowadzenie sklonowanych sekwencji DNA do wektora pDONR221 - reakcja BP	82
3.11. Przeniesienie sklonowanych sekwencji DNA z wektora pDONR221 do wektora wahadłowego pYES-DEST52 – reakcji LR	83

3.12. Transformacja <i>Escherichia coli</i>	84
3.13. Hodowla oraz selekcja <i>Escherichia coli</i>	84
3.14. Transformacja <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
3.15. Hodowla <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
3.16. Analiza acylolipidów w tkankach wegetatywnych oraz generatywnych <i>Camelina sativa</i>	86
3.16.1. Ekstrakcja lipidów z wybranych tkanek roślinnych	86
3.16.2. Oznaczenie całkowitej zawartości acylolipidów w badanym materiale	87
3.16.3. Chromatografia cienkowarstwowa	88
3.16.4. Chromatografia gazowa	89
3.16.5. Cięcie wyekstrahowanej fosfatydyloetanolaminy fosfolipazą A ₂	90
3.17. Reakcje enzymatyczne <i>in vitro</i>	91
3.17.1. Izolacja frakcji mikrosomalnej z tkanek <i>Camelina sativa</i>	91
3.17.2. Izolacja frakcji mikrosomalnej z <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
3.17.3. Synteza [¹⁴ C]acylo-CoA/acylo-CoA wykorzystywanych do reakcji enzymatycznych	93
3.17.4. Warunki reakcji enzymatycznych <i>in vitro</i> typu ‘forward’ – do przodu.....	94
3.17.5. Warunki reakcji enzymatycznych <i>in vitro</i> typu „backward – do tyłu”	100
3.18. Analiza statystyczna	102
4. WYNIKI	103
4.1. Analiza zawartości oraz składu acylolipidów w różnych tkankach <i>Camelina sativa</i>	103
4.1.1. Całkowita zawartości acylolipidów w nasionach <i>Camelina sativa</i> na różnych etapach ich rozwoju oraz skład kwasów tłuszczowych obecnych w tych lipidach	103
4.1.2. Względna zawartość poszczególnych klas lipidów w nasionach <i>Camelina sativa</i> na różnych etapach ich rozwoju	106
4.1.3. Skład kwasów tłuszczowych obecnych w dominujących klasach lipidów nasion <i>Camelina sativa</i> na różnych etapach ich rozwoju	107

4.1.4. Zmiana całkowitej zawartość lipidów polarnych oraz zawartości PC, PE i PA podczas rozwoju nasion <i>Camelina sativa</i> oraz względna zawartości kwasów tłuszczowych w analizowanych fosfolipidach	110
4.1.5. Zawartości acylolipidów w liściach <i>Camelina sativa</i> oraz skład kwasów tłuszczowych tych lipidów	113
4.1.6. Zawartość poszczególnych klas lipidów w liściach <i>Camelina sativa</i>	115
4.1.7. Skład kwasów tłuszczowych obecnych w poszczególnych klasach lipidów liści <i>Camelina sativa</i> hodowanej w warunkach <i>in vivo</i> oraz <i>in vitro</i>	117
4.2. Preferencje enzymów typu LPLAT występujących w tkankach <i>Camelina sativa</i> względem różnych akceptorów grup acylowych	122
4.3. Określanie charakterystyki biochemicznej oraz roli enzymów LPLAT w remodelowaniu fosfolipidów obecnych w nasionach <i>Camelina sativa</i>	126
4.3.1. Optymalizacja reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy LPCAT obecne w nasionach <i>Camelina sativa</i>	127
4.3.2. Specyficzność substratowa w reakcjach <i>forward</i> enzymów LPCAT obecnych w nasionach <i>Camelina sativa</i>	130
4.3.3. Optymalizacja reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy LPEAT obecne w nasionach <i>Camelina sativa</i>	135
4.3.4. Specyficzność substratowa w reakcjach <i>forward</i> enzymów LPEAT obecnych w nasionach <i>Camelina sativa</i>	138
4.3.5. Optymalizacja reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy LPAAT obecne w nasionach <i>Camelina sativa</i>	141
4.3.6. Specyficzność substratowa w reakcjach <i>forward</i> enzymów LPAAT obecnych w nasionach <i>Camelina sativa</i>	144
4.3.7. Aktywność i specyficzność substratowa w reakcjach <i>backward</i> enzymów typu LPLAT obecnych w nasionach <i>Camelina sativa</i>	148
4.3.8. Udział enzymów LPLAT w transferze kwasów tłuszczowych z puli fosfolipidów do puli acylo-CoA w nasionach <i>Camelina sativa</i>	154
4.3.9. Czas całkowitej wymiany kwasów tłuszczowych w puli fosfolipidów obecnych w nasionach <i>Camelina sativa</i>	158

4.4. Wpływ warunków hodowli na właściwości biochemiczne LPLATów obecnych w liściach <i>Camelina sativa</i> oraz na intensywność procesu remodelowania fosfolipidów tych liści.....	161
4.4.1. Aktywność i specyficzność substratowa w reakcjach <i>forward</i> enzymów typu LPLAT obecnych w liściach <i>Camelina sativa</i> z hodowli w warunkach <i>in vivo</i> oraz <i>in vitro</i>	161
4.4.2. Intensywność remodelowania fosfolipidów obecnych w liściach <i>Camelina sativa</i> hodowanej w warunkach <i>in vivo</i> oraz <i>in vitro</i>	165
4.4.3. Czas całkowitej wymiany kwasów tłuszczowych w puli wybranych fosfolipidów liści <i>Camelina sativa</i> z hodowli w warunkach <i>in vivo</i> oraz <i>in vitro</i>	166
4.5. Charakterystyka enzymów LPEAT obecnych w tkankach <i>Camelina sativa</i>	168
4.5.1. Zależność aktywności oraz specyficzności substratowej enzymów LPEAT oraz LPEAT obecnych w tkankach wegetatywnych oraz generatywnych <i>Camelina sativa</i> od temperatury	168
4.5.2. Wpływ temperatury na intensywność procesu remodelowania puli fosfatydyloetanolaminy, obecnej w liściach <i>Camelina sativa</i> hodowanej w warunkach <i>in vivo</i>	173
4.5.3. Analiza filogenetyczna wariantów izoformy CsLPEAT1 oraz CsLPEAT2	176
4.5.4. Uliniowanie sekwencji aminokwasowych poszczególnych wariantów izoformy CsLPEAT1 oraz CsLPEAT2.....	178
4.5.5. Względna i bezwzględna ekspresja genów kodujących CsLPEAT w poszczególnych tkankach <i>Camelina sativa</i>	182
4.6. Charakterystyka biochemiczna poszczególnych izoenzymów CsLPEAT	184
4.6.1. Efekt transformacji szczepu $\Delta ALE1$ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> różnymi wariantami CsLPEAT1 oraz CsLPEAT2.....	185
4.6.2. Optymalizacja parametrów reakcji enzymatycznych katalizowanych przez różne izoenzymy CsLPEAT.....	187
4.6.3. Wpływ temperatury na aktywność oraz specyficzność substratową poszczególnych izoenzymów CsLPEAT	191

4.6.4. Aktywność oraz specyficzność poszczególnych izoenzymów CsLPEAT w stosunku do średnio- oraz bardzo długołańcuchowych donorów grup acylowych	197
4.6.5. Aktywność oraz specyficzność poszczególnych izoenzymów CsLPEAT w stosunku do różnych akceptorów grup acylowych	200
5. DYSKUSJA.....	205
5.1. Profil acylolipidów obecnych w nasionach <i>Camelina sativa</i>	206
5.2. Acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid występujące w nasionach <i>Camelina sativa</i>	207
5.3. Odmienne właściwości biochemiczne poszczególnych enzymów LPLAT obecnych w nasionach <i>Camelina sativa</i>	209
5.4. Aktywność oraz specyficzność substratowa w reakcjach typu <i>forward</i> enzymów LPLAT obecnych w nasionach <i>Camelina sativa</i>	213
5.5. Efektywność remodelowania poszczególnych puli fosfolipidów obecnych w nasionach <i>Camelina sativa</i> , a udział enzymów LPLAT w tym procesie	216
5.6. Wpływ warunków hodowli <i>in vivo</i> oraz <i>in vitro</i> na metabolizm lipidów oraz profil acylolipidów obecnych w liściach <i>Camelina sativa</i>	218
5.7. Wpływ temperatury na preferencje enzymów LPLAT, a ich rola w utrzymaniu ciekło-kryształicznej struktury membran komórkowych liści <i>Camelina sativa</i>	222
5.8. Wzory ekspresji genów kodujących poszczególne izoenzymy LPLAT oraz powiązanie tej ekspresji z aktywnością LPLATów.	226
5.9. Odmienne specyficzności substratowa izoenzymów CsLPEAT, a ich potencjalna rola w tkankach <i>Camelina sativa</i>	229
6. PODSUMOWANIE.....	237
7. PIŚMIENNICTWO	241
8. ANEKS.....	242

STRESZCZENIE

Acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT) są uważane za jedne z kluczowych enzymów uczestniczących w procesie remodelowania, czyli edycji grup acyloowych znajdujących się w puli fosfolipidów oraz w cytoplazmatycznej puli acylo-CoA. Rola ta została przypisana enzymom LPLAT, ponieważ wykazują one dualną aktywność, a zatem są zdolne do przeprowadzania dwóch odmiennych reakcji. W reakcjach typu *forward* enzymy te katalizują dołączenie grupy acylowej do lizofosfolipidu, co w efekcie prowadzi do powstania określonego fosfolipidu. W reakcji typu *backward* odpowiadają one za proces odwrotny, który prowadzi do suplementacji puli acylo-CoA w zmodyfikowane kwasy tłuszczowe, będącej źródłem tych kwasów dla innych acylotransferaz uczestniczących w syntezie lipidów zapasowych (triacylogliceroli) oraz edycji lipidów membranowych. Pomimo potencjalnie, znaczącej roli w procesie remodelowania, badania dotyczące udziału oraz roli enzymów LPLAT w tym procesie są/były słabo zaawansowane.

W związku z brakiem odpowiedniej wiedzy w tym zakresie, celem badań wykonanych w ramach niniejszej pracy było scharakteryzowanie procesu remodelowania zachodzącego w różnych tkankach rośliny oleistej jaką jest *Camelina sativa*. Celem było określenie efektywności tego procesu w nasionach oraz liściach w zależności od różnych czynników takich jak: dojrzałość tkanek, warunki hodowli roślin oraz zmiany temperatury. *C. sativa* obecnie staje się rośliną modelową do badań metabolizmu lipidów, niemniej jednak wciąż wiedza na jej temat jest ograniczona, w związku z czym w pracy podjęta została również próba charakterystyki biochemicznej enzymów LPLAT występujących w jej różnych tkankach. Otrzymane podczas badań wyniki skierowały dalszą uwagę na enzymy LPEAT, których sekwencje nukleotydowe zostały sklonowane, przeanalizowane, a następnie wprowadzone do systemu drożdżowego, który posłużył do określenia ich dokładnej charakterystyki.

Przeprowadzone badania, w pierwszej kolejności skupiające się na nasionach *C. sativa* wykazały, że różne grupy enzymów LPLAT charakteryzują się odmiennymi właściwościami biochemicznymi, jednak zarówno w reakcjach *forward*, jak i *backward* preferują one, jako donory kwasów tłuszczowych, acylo-CoA z 18-węglowymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Wykazano, że enzymy LPCAT, syntetyzujące fosfatydylocholinę (PC), mają potencjał do przeniesienia niemalże wszystkich wielonienasyconych kwasów tłuszczowych produkowanych w puli PC do

cytoplazmatycznej puli acylo-CoA. Dalsze badania odpowiedziały również na pytania dotyczące udziału innych LPLATów w procesie edycji grup acylowych lipidów nasion *C. sativa*. Wykazały one, że enzymy typu LPAAT mogą niezwykle szybko przenosić kwasy tłuszczowe obecne w puli kwasu fosfatydowego (PA) do puli acylo-CoA, podczas gdy remodelowanie puli fosfatydyloetanolaminy za pośrednictwem LPEATów zachodzi znacznie wolniej. Ilość kwasów tłuszczowych przeniesionych z puli PA i PE do puli cytoplazmatycznego acylo-CoA wynosiła odpowiednio około 5% oraz około 2% wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w dojrzałych nasionach.

Wykonane badania udowodniły również, że właściwości biochemiczne oraz udział w remodelowaniu może być zależny od warunków hodowli roślin. Ta część badań jasno pokazała, że wyniki doświadczeń skupiających się na biochemii lipidów, dla roślin hodowanych w warunkach *in vitro*, nie odzwierciedlają efektów obserwowanych w warunkach *in vivo*, a zatem wyniki te nie mogą mieć bezpośredniego przełożenia na warunki naturalne.

Kolejna część pracy dotycząca wpływu temperatury na enzymy LPLAT doprowadziła do niezwykle ważnego odkrycia fizjologicznej roli enzymów LPEAT. Enzymy te okazały się być czujnikami reagującymi na zmiany temperatury. Wyniki tych badań wskazują, że enzymy te pod wpływem zmian temperaturowych modyfikują swoją specyficzność substratową i mogą regulować w ten sposób profil puli PE. Zaobserwowane efekty zostały dodatkowo potwierdzone poprzez sklonowanie genów kodujących poszczególne izoenzymy LPEAT, których charakterystykę biochemiczną i preferencje substratowe w zależności od temperatury zweryfikowano w systemie drożdżowym. Wykazano również, że izoenzymy CsLPEAT1 preferują wykorzystywanie 18:1-LPE, podczas gdy CsLPEAT2 18:2-LPE jako akceptory grup acylowych. Ponadto jedynie warianty CsLPEAT2 były zdolne do wykorzystania bardzo długołańcuchowych donorów grup acylowych. Sklonowane sekwencje wykorzystane zostały również m. in. do analizy filogenetycznej. Odtworzenie ewolucyjnych zależności pomiędzy sekwencjami pozwoliło na wykazanie, że geny kodujące dwa warianty CsLPEAT tj. CsLPEAT1c oraz CsLPEAT2c pochodzą z genomu *Camelina hispida*, natomiast geny kodujące pozostałe warianty CsLPEAT z genomu auto-tetraploidalnej *Camelina neglecta*. Ekspresja genów kodujących poszczególne warianty CsLPEAT wykazała, że w nasionach głównie ekspresowane są geny kodujące warianty CsLPEAT1, podczas gdy w liściach głównie wariant CsLPEAT2b co, sądząc po specyficzności substratowej tych izoenzymów, może korelować z funkcją pełnioną przez te tkanki.

ABSTRACT

Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases (LPLAT) are considered to be the key enzymes involved in the remodeling process. They are responsible for editing of acyl groups in phospholipids and cytoplasmic acyl-CoAs pool. LPLAT enzymes are able to conduct two distinct reactions. In the *forward* reaction these enzymes catalyze the addition of an acyl groups to the lysophospholipids resulting in production of a specific phospholipid. In the *backward* reaction, they are responsible for a reverse process, which may have impact on the supplementation of acyl-CoAs pool with newly synthesized or modified fatty acids. As a consequence, this pool may be a source of substrates for other acyltransferases reactions, for instance synthesis of storage lipids or editing of the membrane lipids. Nevertheless, despite potentially, essential role of LPLAT enzymes in the remodeling process, research on their participation in this mechanism is scarce.

Due to deficit in knowledge in this field, the major aim of my doctoral thesis was to describe the remodeling process occurring in the tissues of oil plant – *Camelina sativa*. The prime objective was to determine the effectiveness of this process in seeds and leaves considering factors such as: seed maturity, plant cultivation conditions and external temperature shocks/fluctuations. Currently, *C. sativa* is becoming the model plant for studying lipid metabolism, yet it has not been fully characterized. Consequently, the first part of my experiments focused on the characterization of biochemical parameters of LPLAT enzymes present in different tissues of this plant. Moreover, the obtained results allowed for a deeper characterization of the LPEAT enzymes. LPEAT encoding genes were cloned, analyzed and inserted into yeast system, in which their preferences and activity were tested.

Primarily, research focused on *C. sativa* seeds. The obtained results showed that LPLAT enzymes are described by different biochemical parameters, but each of them exhibits the highest preference toward acyl-CoAs with 18-carbon unsaturated fatty acids. Analysis of contribution of different classes of LPLAT enzymes in the remodeling process revealed that LPCAT enzymes are able to transfer almost all polyunsaturated fatty acids synthesized in phosphatidylcholine pool to the cytoplasmic acyl-CoA pool. Further experiments provided answers to questions about the involvement of other LPLATs in the acyl editing process in seeds: LPAAT enzymes can transfer fatty acids from phosphatidic acid (PA) to acyl-CoA pool extremely quickly, while remodeling of the phosphatidylethanolamine (PE) pool *via* LPEAT enzymes takes much more time. The

efficiency of fatty acids transfer from PA and PE to cytoplasmic acyl-CoA pool during the whole seed development reached 5% and 2%, respectively, of all the fatty acids present in the lipids of mature seeds.

Conducted research also proved that the biochemical properties and efficiency of the remodeling process depend on the plant cultivation conditions. This part of the research clearly showed that the results from the experiments focusing on the lipid biochemistry conducted on plant derived from *in vitro* condition do not reflect the effects observed for plant cultivated *in vivo*. Therefore, such results cannot be directly applicable in real growth environment.

Last part of the study focused on the impact of different temperatures on the LPLAT enzymes. It led to an extremely significant discovery about physiological role of the LPEAT. These enzymes turned out to act as sensors which respond to temperature changes. The results of these experiments indicate that LPEAT enzymes can modify their substrate preferences and regulate the composition of PE pool, depending on the temperature conditions. Additionally, to confirm the above discovery, genes encoding individual LPEAT isoenzymes have been cloned and their biochemical characteristic and substrate preference in yeast system have been verified. During these experiments it has been also noticed that *CsLPEAT1* prefers the utilization of 18:1-LPE, while the *CsLPEAT2* prefers 18:2-LPE as acyl acceptor. Moreover, only the tested isoenzymes of *CsLPEAT2* were able to utilize very long chain acyl donors. The cloned sequences were also used for comparative and phylogenetic analysis. Phylogenetic analyses revealed that *CsLPEAT1c* and *CsLPEAT2c* originated from *Camelina hispida*, whereas other variants of *CsLPEAT* originated from *Camelina neglecta*. The expression analysis showed that genes encoding isoenzymes of *CsLPEAT1* are mainly expressed in seeds, while encoding *CsLPEAT2b* are predominantly expresses in leaves, what judging by the substrate specificity of these isoenzymes, may correlate with the different functions of these organs.

SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACCase	karboksylaza acetylo-CoA (ang. acetyl-CoA carboxylase)
ACP	białko przenoszące grupy acylowe (ang. acyl carrier protein)
BE-PSS	syntaza fosfatydyloseryny typu wymieniającego zasady (ang. base-exchange-type phosphatidylserine synthase)
BSA	surowicza albumina bydłęca (ang. bovine serum albumin)
CDP	cytdynodifosforan (ang. cytidine diphosphate)
CoA	koenzym A (ang. coenzyme A)
CPT	choliotransferaza CDP-cholina:diacyloglicerol (ang. CDP-choline:diacylglycerol cholinephosphotransferase)
Cs	<i>Camelina sativa</i>
DAF	dni od zakwitnięcia (ang. day after flowering)
DAG	diacyloglicerol (ang. diacylglycerol)
DGAT	acyltransferaza acylo-CoA:diacyloglicerol (ang. acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase)
DGD	syntaza digalaktozyldiacyloglicerolu (ang. digalactosyldiacylglycerol synthase)
DGDG	digalaktozyldiacyloglicerol (ang. digalactosyldiacylglycerol)
DGK	kinaza diacyloglicerolu (ang. diacylglycerol kinase)
DGTA	transacylaza diacyloglicerol:diacyloglicerol (ang. diacylglycerol:diacylglycerol tranacylase)
DTNB	kwasy 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy)
EPT	etanoloaminotransferaza CDP-etanoloamina:diacyloglicerol (ang. CDP-ethanolamine:diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase)
ER	retikulum endoplazmatyczne (ang. endoplasmatic reticulum)
ENR	reduktaza enoilo-ACP (ang. enoyl-ACP reductase)
FAD	desaturaza kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid desaturase)
FAS	syntaza kwasów tłuszczowych (ang. fatty acid synthase)
FatA	tioesteraza acylo-ACP typu A (ang. fatty acid thioesterase type A)
FatB	tioesteraza acylo-ACP typu B (ang. fatty acid thioesterase type B)
FAX1	białka eksportujące kwasy tłuszczowe (ang. fatty acid export 1)
G3P	3-fosfoglicerol (ang. glicero-3-phosphate)
GC	chromatografia gazowa (ang. gas chromatography)

GPAT	acylotransferaza acylo-CoA:3-fosfoglicerol (ang. glycerol-3-phosphate acyltransferase)
GPCAT	acylotransferaza acylo-CoA:glicerofosfocholina (ang. glycerophosphocholine acyltransferase)
HAD	dehydrataza 3-D-hydroksyacylo-ACP (ang. 3-hydroxyacyl-ACP dehydratase)
KASI	syntaza 3-ketoacylo-ACP typu I (ang. 3-ketoacyl-ACP synthase I)
KASII	syntaza 3-ketoacylo-ACP typu II (ang. 3-ketoacyl-ACP synthase II)
KAS III	syntaza 3-ketoacylo-ACP typu III (ang. 3-ketoacyl-ACP synthase III)
KAR	reduktaza β -ketoacylo-ACP (ang. ketoacyl-ACP reductase)
KT / FA	kwasy tłuszczowe (ang. fatty acid)
LACS9	syntetaza długołańcuchowych acylo-CoA 9 (ang. long-chain acyl-coenzyme A synthetase 9)
LPA	kwaz lizofosfatydowy (ang. lysophosphatidic acid)
LPC	lizofosfatydylocholina (ang. lysophosphatidylcholine)
LPE	lizofosfatydyloetanolamina (ang. lysophosphatidylethanolamine)
LPG	lizofosfatydyloglicerol (ang. lysophosphatidylglycerol)
LPI	lizofosfatydyloinozytol (ang. lysophosphatidylinositol)
LPL	lizofosfolipid (ang. lysophospholipids)
LPS	lizofosfatydyloseryna (ang. lysophosphatidylserine)
LPAAT	acylotransferaza acylo-CoA:kwaz lizofosfatydowy (ang. acyl-CoA: lysophosphatidic acid acyltransferase)
LPCAT	acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydylocholina (ang. acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferase)
LPEAT	acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina (ang. acyl-CoA: lysophosphatidylethanolamine acyltransferase)
LPGAT	acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydyloglicerol (ang. acyl-CoA: lysophosphatidylglycerol acyltransferase)
LPIAT	acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydyloinozytol (ang. acyl-CoA: lysophosphatidylinositol acyltransferase)
LPLAT	acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfolipid (ang. acyl-CoA:lysophospholipids acyltransferase)

LPSAT	acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfatydyloseryna (ang. acyl-CoA:lysophosphatidylserine acyltransferase)
MAG	monoacyloglicerol (ang. monoacylglycerol)
MCAT	transacylaza malonylowa (ang. malonylo-CoA acyl carrier protein transacylase)
MDG	transferaza monogalaktozydiodiacyloglicerolu (ang. monogalactosyldiacylglycerol transferase)
MGDG	monogalaktozydiodiacyloglicerol (ang. monogalactosyldiacylglycerol)
MS	pożywka Murashige & Skoog (ang. medium Murashige & Skoog)
PA	kwask fosfatydowy (ang. phosphatidic acid)
PAP	fosfataza kwasu fosfatydowego (ang. phosphatidic acid phosphatase)
PC	fosfatydylocholina (ang. phosphatidylcholine)
PDAT	acylotransferaza fosfolipid:diacyloglicerol, (ang. phospholipid:diacylglycerol acyltransferase)
PDCT	cholinofosfotransferaza fosfatydylocholina:diacyloglicerolu (ang. phosphatidylcholine:diacylglycerol cholinephosphotransferase)
PDHC	kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (ang. pyruvate dehydrogenase complex)
PE	fosfatydyloetanolamina (ang. phosphatidylethanolamine)
PG	fosfatydyloglicerol (ang. phosphatidylglycerol)
PGPS	syntetaza fosforanu fosfatydyloglicerolu (ang. phosphatidylglycerolphosphate synthase)
PGPP	fosfataza fosforanu fosfatydyloglicerolu (ang. phosphatidylglycerolphosphate phosphatase)
PI	fosfatydyloinozytol (ang. phosphatidylinositol)
PIS	syntaza fosfatydyloinozytolu (ang. phosphatidylinositol synthase)
PL	fosfolipid (ang. phospholipid)
PLA₂	fosfolipaza A ₂ (ang. phospholipase A ₂)
PLC	fosfolipaza C (ang. Phospholipase C)
PLD	fosfolipaza D (ang. Phospholipase D)
PS	fosfatydyloseryna (ang. phosphatidylserine)

PSD	dekarboksylaza fosfatydyloseryny (ang. phosphatidylserine decarboxylase)
PSS	syntaza fosfatydyloseryny (ang. phosphatidylserine synthase)
PUFA	wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. polyunsaturated fatty acids)
SAD	desaturaza stearylo-ACP (ang. stearyl-ACP desaturase)
SLS	syntaza sulfolipidowa (ang. sulfolipid synthase)
SQDG	sulfochinowozylodiacylglicerol (ang. sulfoquinovosyl diacylglycerol)
TAG	triacylglicerol (ang. triacylglycerol)
TGD	trigalaktozylodiacylglicerol (ang. trigalactosyldiacylglycerol)
TLC	chromatografia cienkowarstwowa (ang. thin layer chromatography)
UDP	urydynodifosforan (ang. uridyldiphosphate)

Stosowane terminy:

Izoenzymy – grupa enzymów występująca w obrębie danego organizmu, katalizująca tą samą reakcję i posiadająca odmienną strukturę pierwszorzędową. W niniejszej pracy izoenzymami zostały określone poszczególne enzymy o aktywności LPEAT tj.: LPEAT1a.1, LPEAT1a.2, LPEAT2a, LPEAT2b oraz LPEAT2c.

Izoformy – białka pełniące takie same funkcje katalityczne różniące się jednak strukturą pierwszorzędową; w skład każdej izoformy może wchodzić od jednego do kilku izoenzymów o zbliżonej strukturze pierwszorzędowej np.: enzymy LPEAT występują w komórkach roślinnych w dwóch izoformach – LPEAT1 i LPEAT2.

Warianty – określenie odnoszące się do występowania różnych wersji sekwencji nukleotydowych kodujących dane białko lub izoformy tego białka; w pracy określenie wariant było również zamiennie stosowane jako izoenzym należący do danej izoformy; np. izoforma LPEAT2 w komórkach *Camelina sativa* kodowana jest przez trzy warianty genowe: *LPEAT2a*, *LPEAT2b* oraz *LPEAT2c*, białka kodowane przez te warianty genowe czasami zmianie były nazywane jako warianty danej izoformy.

LPEAT – dużymi literami oraz kursywą opisane zostały geny

LPEAT – dużymi literami opisane zostały poszczególne białka

WPROWADZENIE I CELE PRACY

Proces remodelowania (edycji grup acylowych) fosfolipidów to jeden z fundamentalnych mechanizmów zachodzących u wszystkich żywych organizmów w tym roślin, zwierząt, czy nawet mikroorganizmów. U roślin oleistych proces ten jest niezwykle istotny do utrzymania płynności membran biologicznych, mającej kluczowe znaczenie dla poprawnej fizjologii komórki i zachodzących w niej procesów. Ponadto modyfikacja puli kwasów tłuszczowych w puli fosfolipidów jest niezwykle ważnym procesem, gdyż związki te stanowią istotny substrat pośredni w procesie biosyntezy triacylogliceroli, czyli lipidów zapasowych, a co więcej jeden z fosfolipidów – fosfatydylocholina jest miejscem syntezy wieloniensyconych kwasów tłuszczowych. Niemniej jednak mimo tak istotnego udziału procesu remodelowania w poprawne funkcjonowanie komórek i metabolizm lipidów, wiedza na temat tego mechanizmu wciąż jest uboga.

Jednymi z enzymów, którym przypisuje się kluczową rolę w tym procesie są acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT). Enzymy te są głównie zlokalizowane w retikulum endoplazmatycznym, gdzie odpowiadają za syntezę fosfolipidów. Związki te są produkowane w reakcjach typu *forward* – „do przodu”, podczas których do lizofosfolipidów dołączane są grupy acylowe pochodzące z cytoplazmatycznej puli acylo-CoA. W zależności od wykorzystywanego lizofosfolipidu enzymy te będą syntetyzowały inne fosfolipidy, a także będą posiadały inne nazwy. Enzymy te w reakcjach typu *backward* – „do tyłu” katalizują reakcje odwrotne, podczas których grupy acylowe są odłączane od fosfolipidów i przenoszone na wolny koenzym A. Ze względu na swoją dualną aktywność enzymy LPLAT uważane są za potencjalnie odpowiedzialne za proces remodelowania zarówno profilu kwasów tłuszczowych występujących w puli fosfolipidów, jak i cytoplazmatycznej puli acylo-CoA, co w efekcie prowadzi do wzbogacania tych puli w *de novo* syntetyzowane lub zmodyfikowane kwasy tłuszczowe.

Dotychczas zdolność do katalizowania reakcji w obie strony została potwierdzona wyłącznie dla enzymów LPCAT (odpowiedzialnych za remodelowanie fosfatydylocholiny) obecnych w roślinnych frakcjach mikrosomalnych. Dla pozostałych enzymów typu LPLAT, takich jak LPEAT oraz LPAAT, które uczestniczą odpowiednio w edycji puli fosfatydyloetanolaminy oraz kwasu fosfatydowego, zdolność ta została zaobserwowana jedynie po wprowadzeniu genów kodujących te białka do systemów

drożdżowych. W związku z tym, pierwszym podjętym problemem w ramach niniejszej pracy było zweryfikowanie zdolności tych enzymów, obecnych w nasionach *Camelina sativa*, do przeprowadzania tych reakcji. Celem tego etapu badań było również wykonanie charakterystyki biochemicznej enzymów LPLAT obecnych w nasionach Inianki. *C. sativa* pomimo swoich unikatowych agronomicznych oraz przemysłowych właściwości, dopiero na przestrzeni ostatnich lat staje się powszechnie używaną rośliną modelową do badań dotyczących metabolizmu lipidów roślin oleistych, a więc oczywistym zamiarem było wypełnienie luki wiedzy na temat tych enzymów.

Kolejnym niezwykle ważnym celem niniejszej pracy było określenie roli enzymów LPLAT, obecnych w nasionach *C. sativa*, w procesie remodelowania. Udział tych enzymów w edycji grup acylowych puli fosfolipidów, a szczególnie puli acylo-CoA, która kolejno może być wykorzystywana przez inne acylotransferazy w syntezie lipidów zapasowych był dotychczas zapełnienie nieznanym. Zatem wykonane przeze mnie badania miały na celu odpowiedzieć na pytania dotyczące intensywności zachodzenia tego procesu w nasionach na różnych etapach ich rozwoju. Ponadto moim zadaniem było określenie ile kwasów tłuszczowych może być przenoszonych przez enzymy LPLAT do puli acylo-CoA, a ile z nich jest włączana do tych puli w wyniku reakcji innych takich jak aktywność fosfolipazy A₂, czy enzymu PDAT (acylotransferazy fosfolipid:diacyloglicerol).

Jak już wspomniano, wiedza na temat enzymów LPLAT i ich roli w tkankach *C. sativa* była znikoma, w związku z czym kolejnym oczywistym celem badań było scharakteryzowanie tych enzymów w tkankach wegetatywnych takich jak liście. Do badań wykorzystane zostały zarówno liście roślin hodowanych w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro*. Ze względu na fakt, że kompozycja profilu kwasów tłuszczowych w liściach jest równie ważna jak w nasionach, mimo że pełnią one odmienną rolę w tych tkankach, przeprowadzone zostały również badania dotyczące procesu remodelowania. Pod uwagę wzięto różne warunki hodowli i ich wpływ na aktywność enzymów LPLAT oraz intensywność wymiany grup acylowych w fosfolipidach obecnych w tych tkankach.

Rozważając fakt, że profil kwasów tłuszczowych obecnych w liściach roślin, a dokładnie we frakcji ich lipidów polarnych, głównie fosfolipidów, w pewnym stopniu odpowiada za adaptację do zewnętrznych warunków temperaturowych, kolejnym celem badań było zweryfikowanie czy enzymy LPLAT również uczestniczą w tych procesach. Wstępne wyniki badań wykazały, że jedynie enzymy LPEAT reagują zmianą specyficzności substratowej na zmiany temperatury. W związku z tym dalsza część badań

skupiała się właśnie na tych enzymach i miała na celu określenie wpływu temperatury na aktywność i specyficzność substratową tych enzymów oraz intensywność procesu remodelowania fosfolipidów obecnych w liściach.

W niniejszej pracy, ze względu na zaobserwowane efekty wpływu temperatury na specyficzność substratową enzymów LPEAT postawiono sobie także za zadanie scharakteryzowanie osobno każdego z izoenzymów LPEAT1 oraz LPEAT2 (na podstawie danych literaturowych każdy z nich występuje w trzech wariantach). Postanowiono sklonować i wprowadzić sekwencje nukleotydowe kodujące te izoenzymy do systemu drożdżowego, a następnie określić ich charakterystykę biochemiczną oraz specyficzność substratową (głównie w zależności od temperatury). Dane te przede wszystkim miały potwierdzić lub zaprzeczyć zaobserwowanemu wpływowi temperatury na specyficzność substratową enzymów LPEAT oraz po raz pierwszy określić parametry biochemiczne tych enzymów obecnych w tkankach lnicznika, na temat których brak było jakichkolwiek informacji.

Równoległe część badań dotycząca enzymów LPEAT skupiała się na poznaniu ich pochodzenia filogenetycznego oraz scharakteryzowaniu sekwencji aminokwasowych. Ponadto wyznaczony został wzór ekspresji genów kodujących poszczególne izoenzymy w różnych tkankach *C. sativa*, który zakładano, że wraz z wynikami dotyczącymi preferencji i aktywności poszczególnych izoenzymów pozwoli na określenie roli tych białek w tkankach roślinnych.

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy umożliwiają dokładniejsze poznanie charakterystyki biochemicznej, w tym preferencji substratowych oraz aktywności w reakcjach typu *forward* oraz *backward* enzymów LPLAT obecnych w różnych tkankach *C. sativa*. Ponadto dostarczają fundamentalnej wiedzy na temat dotychczas mało poznanego procesu remodelowania zachodzącego w różnych tkankach rośliny oleistej, który okazuje się być zależny nie tylko od miejsca jego przebiegu, ale również od warunków hodowlanych czy również stresu temperaturowego.

Przedstawione w pracy badania zostały zrealizowane w ramach projektu OPUS13 finansowanego z Narodowego Centrum Nauki, którego kierownikiem jest prof. dr hab. Antoni Banaś. Tytuł projektu: „Rola acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina (LPEAT) w regulacji wzrostu roślin”. Numer projektu: 2017/25/BNZ3/00721.



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

Część z badań została również zrealizowana w ramach grantu otrzymanego z dofinansowania badań naukowych dla uczestników Interdyscyplinarnych Przyrodniczo-Matematycznych Studiów Doktoranckich MWB UG i GUMed, którego byłam kierownikiem. Tytuł projektu: „Wpływ hodowli *in vitro* oraz *in vivo* na akumulację acylolipidów i aktywność acylotransferaz acyl-CoA:lizofosfolipid w liściach *Camelina sativa*”. Numer projektu: 539-N113-B931-21.



Znacząca część wyników przedstawionych w niniejszej pracy została już opublikowana w wysoko punktowanych, recenzowanych czasopismach naukowych:

1. **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.
2. **Klińska S.**, Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Demski K. Banaś A. (2020). Editing of phosphatidic acid and phosphatidylethanolamine by acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases in developing *Camelina sativa* seeds. *Planta*. 10: 4.
3. **Klińska S.**, Demski K., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Banaś A. (2021a). LPEATs Tailor Plant Phospholipid Composition through Adjusting Substrate Preferences to Temperature. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 8137.
4. **Klińska S.**, Kędzierska S., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Banaś A. (2021b). In Vitro Growth Conditions Boost Plant Lipid Remodelling and Influence Their Composition. *Cells*. 10: 2326.

1. PRZEGLĄD LITERATURY

1.1. Lipidy – definicja, klasyfikacja, występowanie oraz funkcje

Lipidy to grupa hydrofobowych związków organicznych nierozpuszczalnych w wodzie, zwana również tłuszczowcami, które nazwę oraz hydrofobowe właściwości zawdzięczają między innymi obecności kwasów tłuszczowych w swojej strukturze. Lipidy są związkami występującymi powszechnie we wszystkich organizmach żywych. W tkankach roślinnych możemy podzielić je na trzy nadrzędne grupy: glicerolipidy, sfingolipidy oraz sterole (Heldt i Piechulla, 2011).

Glicerolipidy to związki, których budowa oparta jest na szkielecie glicerolowym, do którego w pozycjach *sn*-1 i/lub *sn*-2 i/lub *sn*-3 mogą być przyłączone kwasy tłuszczowe; wówczas związki te tworzą pulę lipidów zapasowych takich jak np.: triacyloglicerole. W pozycji *sn*-3 może jednak również być przyłączona zasada azotowa za pośrednictwem reszt kwasu fosforanowego tworząc w ten sposób fosfolipidy (glicerofosfolipidy), bądź grupa cukrowa, która jest charakterystyczna dla galaktolipidów. Do puli fosfolipidów zaliczane są związki takie jak: fosfatydylocholina, kwas fosfatydowy (PA; ang. phosphatidic acid), fosfatydyloetanolamina (PE; ang. phosphatidylethanolamine), fosfatydyloglicerol (PG; ang. phosphatidylglycerol), fosfatydyloseryna (PS; ang. phosphatidylserine), fosfatydyloinozytol (PI; ang. phosphatidylinositol). Natomiast dwoma głównymi galaktolipidami występującymi w tkankach roślinnych są monogalaktozydylodiacylglicerole (MGDG; ang. monogalactosyldiacylglycerol) oraz digalaktozydylodiacylglicerole (DGDG; ang. digalactosyldiacylglycerol). Do puli glicerolipidów zaliczane są również sulfolipidy, które podobnie, jak galaktolipidy, zawierają w pozycji *sn*-3 resztę cukrową, która w przypadku sulfolipidów posiada dodatkowo resztę kwasu siarkowego. Reprezentantem tej grupy związków występującym w tkankach roślinnych jest sulfochinowozylodiacylglicerol (SQDG; ang. sulfoquinovosyl diacylglycerol), (van de Loo i in., 1993; Somerville i in., 2000; Dörmann, 2005). Oprócz znacznego zróżnicowania strukturalnego glicerolipidów ich rozmieszczenie w tkankach, organellach oraz pomiędzy listkami lipidowej dwuwarstwy błony może być różnorodne. Każdy z tych związków ma określoną lokalizację oraz przypisaną rolę jaką pełni w danym kompartmentie komórkowym (Harayama i Riezman, 2018; van Meer i in., 2008). Wybrane związki należące do różnych grup glicerolipidów zostaną dokładnie omówione w dalszej części pracy.

Kolejna grupa związków zaliczana do lipidów to sfingolipidy, których struktura opiera się na łańcuchu sfingozyny posiadającym od dwóch do trzech grup hydroksylowych oraz jedną grupę aminową. Poprzez wiązanie amidowe do łańcucha sfingozyny dołączony jest kwas tłuszczowy. Są to związki występujące głównie w plazmalemmie oraz membranach retikulum endoplazmatycznego, stanowią do 5% wszystkich lipidów obecnych w tkankach roślinach.

W przeciwieństwie do dwóch poprzednich grup acylolipidów, sterole, należące także do lipidów roślinnych, to związki, w których budowie nie znajdują się kwasy tłuszczowe (oprócz ich estrów z kwasami tłuszczowymi). Ich szkielet opiera się na cząsteczce steranu (czterech sprzężonych pierścieniach – cyklopentanoperhydrofenantrenu). Sterole to bardzo szeroka grupa związków, która stanowi istotny składnik membran wielu organelli regulując ich właściwości, między innymi płynność (Heldt i Piechulla, 2011).

1.2. Kwasy tłuszczowe

Kwasy tłuszczowe występują bardzo powszechnie we wszystkich organizmach, zaczynając od bakterii, a kończąc na ludzkim organizmie. Stanowią nadrzędny składnik budulcowy lipidów zapasowych, membranowych, metabolitów wtórnych, cząsteczek sygnałowych, czy koenzymów. Odpowiednia zawartość i proporcja kwasów tłuszczowych ma również kluczowe znaczenie w utrzymaniu ciekło-kryształicznej struktury błon komórkowych, a co za tym idzie zapewnienie prawidłowej fizjologii komórki (Kates i in., 1984).

Kwasy tłuszczowe to najbardziej rozpowszechniona forma występowania węgla w postaci zredukowanej. Są to związki zwane również kwasami karboksylowymi, których struktura składa się z pojedynczej grupy karboksylowej (COOH) połączonej z łańcuchem węglowodorowym, tworząc w ten sposób związki o ogólnym wzorze R-COOH. Kwasy tłuszczowe mogą występować w postaci „wolnej” tworząc pulę związków o ogólnej nazwie „wolne kwasy tłuszczowe”, bądź mogą wchodzić w skład puli acylolipidów, czyli związków bardziej złożonych takich jak już wspomniane glicerolipidy.

Każdy z kwasów tłuszczowych posiada swoją: nazwę systematyczną – nadawaną na podstawie wyjściowego węglowodoru budującego kwas tłuszczowy oraz nazwę zwyczajową – najczęściej używaną i zwykle pochodzącą od źródła ich odkrycia. Ponadto każdy z nich posiada swój unikalny skrót (symbol numeryczny) oparty na wzorze

$A:BA\Delta^{x,y,z}$, gdzie A określa ilość atomów węgla, B ilość wiązań podwójnych, a x, y i z oznaczają numery atomów węgla, licząc od grupy karboksylowej, za którymi znajdują się wiązania podwójne. Na przykład kwas linolowy $18:2\Delta^{9,12}$ to kwas, który będzie posiadał 18 atomów węgla oraz dwa wiązania nienasycone, jedno występujące pomiędzy 9 i 10, a drugie między 12 i 13 atomem węgla.

Również powszechnie uznanym systemem opisu pozycji wiązania podwójnego jest określanie jego położenia licząc atomy węgla względem grupy metylowej. W tym systemie stosuje się symbol „ ω – omega” i odpowiednią cyfrę 3, 6 bądź 9, które oznaczają położenie wiązania odpowiednio pomiędzy 3 i 4, 6 i 7 i/lub 9 i 10 atomem węgla, licząc od grupy metylowej.

Dodatkowe oznaczenia nomenklatury kwasów tłuszczowych to określenia dotyczące konfiguracji wiązań podwójnych, które mogą występować w pozycji „*cis*” lub „*trans*”, gdzie odpowiednio atomy wodoru znajdują się po tej samej stronie cząsteczki, bądź po przeciwnych. Poniżej w tabeli 1 przedstawione zostały nazwy systematyczne i zwyczajowe kwasów tłuszczowych omawianych w pracy. Dodatkowo na Rys. 1 zaprezentowane zostały struktury chemiczne pięciu głównych kwasów tłuszczowych występujących w roślinach.

Głównym oraz odnawialnym rezerwuarem kwasów tłuszczowych są rośliny, które są zdolne do syntezy około 450 różnych kwasów tłuszczowych (Cahoon i Li-Beisson, 2020). Ze względu na mechanizm biosyntezy tych związków w tkankach roślinnych, który zostanie omówiony w kolejnym podrozdziale, zawierają one zwykle parzystą liczbę atomów węgla (od 8 do 24) oraz mogą posiadać zarówno wiązania nasycone, jak i nienasycone. Wiązania podwójne (nienasycone), głównie występują w konfiguracji *cis* i są od siebie oddzielone przynajmniej jedną grupą metylenową (Berg i in. 2011; Somerville i in. 2000). W tkankach roślinnych dominuje pięć głównych kwasów tłuszczowych, które są zwane „typowymi” kwasami tłuszczowymi. Zawierają one 16 lub 18 atomów węgla oraz mogą posiadać do trzech wiązań podwójnych. Są to kwasy, takie jak: palmitynowy (16:0), stearynowy (18:0), oleinowy (18:1 Δ 9), linolowy (18:2 Δ 9,12) oraz linolenowy (18:3 Δ 9,12,15), przedstawione również na Rys 1. Wybrane gatunki roślin posiadają także zdolność do biosyntezy i akumulacji „nietypowych” kwasów tłuszczowych, które mogą być akumulowane w innych strukturach niż „typowe” kwasy oraz mogą posiadać dłuższe lub krótsze łańcuchy węglowe, inną liczbę i miejsce występowania wiązań podwójnych, czy dodatkowe grupy funkcyjne takie jak grupy: epoksydowe (kwas wernolowy), acetylenowe (kwas tarynowy, kwas krepenny), czy

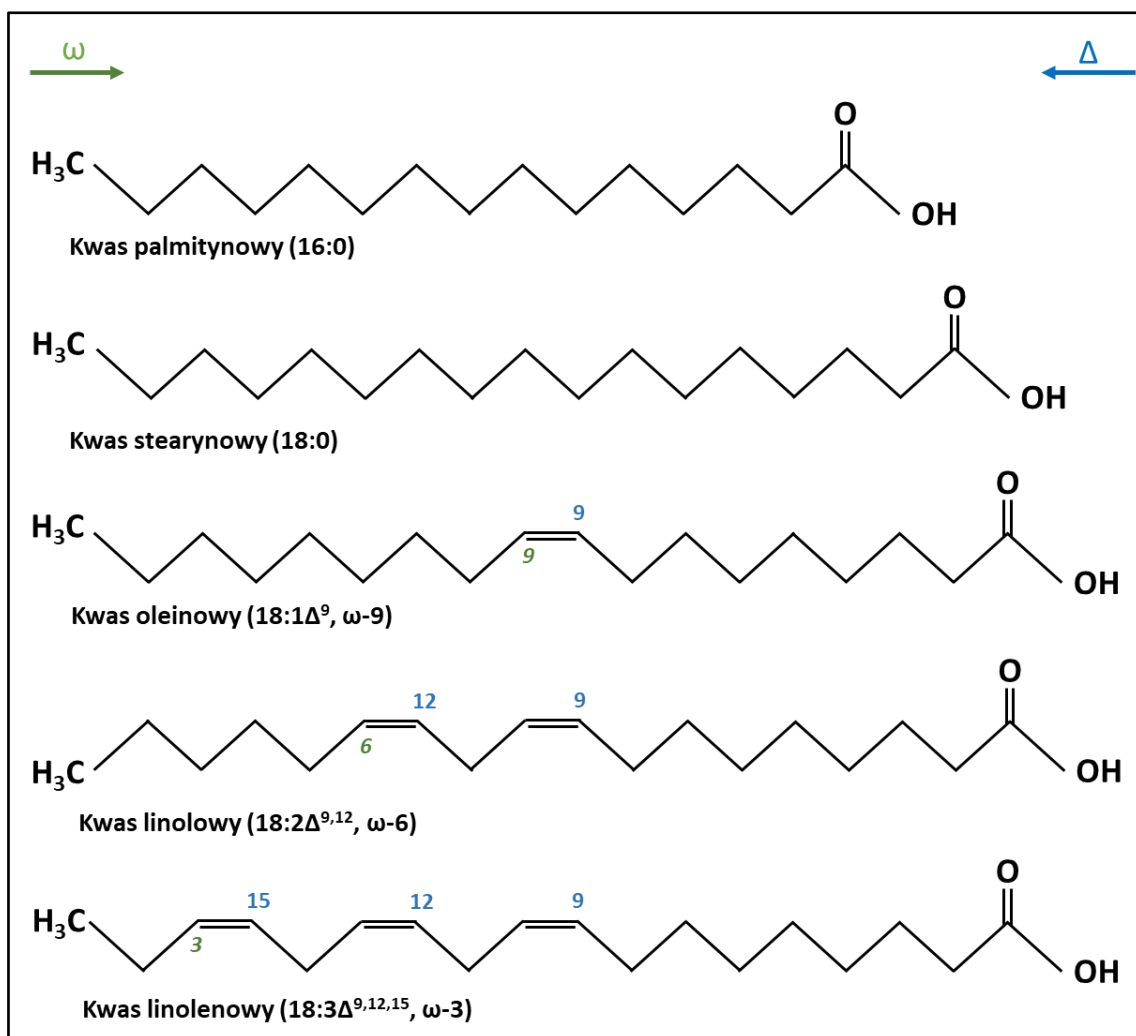
hydroksylowe (kwas rycynolowy, kwas leskerolowy); (Somerville i in. 2000; Cahoon i Li Beisson, 2020).

Rośliny należące głównie do tzw. roślin oleistych posiadają zdolność do magazynowania kwasów tłuszczowych w postaci lipidów zapasowych, a dokładnie triacylogliceroli, które gromadzone są głównie w nasionach. W tej postaci, kwasy tłuszczowe stanowią rezerwuar energetyczny dla roślin. Kwasy tłuszczowe występują również w innych strukturach takich jak fosfolipidy, glikolipidy, woski, kutyna czy suberyna, przez co wpływają na poprawną fizjologię komórki roślinnej m. in. na prawidłowy wzrost i rozwój roślin, regulację podstawowych procesów biochemicznych oraz zapewniają ochronę przed czynnikami zarówno abiotycznymi, jak i biotycznymi (Ohlrogge i Browse, 1995).

Równocześnie kwasy tłuszczowe są cennym źródłem związków powszechnie wykorzystywanych przez ludzi w przemyśle do produkcji lubrykantów, farb, biopaliw oraz kosmetyków, gdzie zarówno „typowe” jak i „nietypowe” kwasy tłuszczowe znajdują swoje liczne zastosowania (Beaudoin i Napier, 2004). Kwasy tłuszczowe wykorzystywane są również w celach konsumpcyjnych, gdzie stanowią bardzo ważny składnik pokarmowy podstawowej diety ludzi i niektórych zwierząt. Kwasy tłuszczowe są głównym źródłem energii, a część z nich pełni również ważną rolę prozdrowotną wpływając na zmniejszenie ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych oraz neurodegeneracyjnych (Zárate i in., 2017).

Tabela 1. Kwasy tłuszczowe występujące w tkankach roślinnych.

Kwasy tłuszczowe obecne w tkankach roślinnych		
Symbol numeryczny	Nazwa systematyczna	Nazwa zwyczajowa
Nasycone kwasy tłuszczowe		
8:0	oktanowy	kaprylowy
10:0	dekanowy	kaprynowy
12:0	dodekanowy	laurynowy
14:0	tetradekanowy	mirystynowy
16:0	heksadekanowy	palmitynowy
18:0	oktadekanowy	stearynowy
20:0	eikozanowy	arachidowy
22:0	dokozaanowy	behenowy
24:0	tetrakozaanowy	lignocerynowy
Jednonienasycone kwasy tłuszczowe		
18:1	oktadekenowy	oleinowy
20:1	eikozenowy	gondolowy
22:1	dokozenowy	erukowy
24:1	tertakozenowy	nerwonowy
Wielonienasycone kwasy tłuszczowe		
16:3	heksadekatrienowy	-
18:2	oktadekadienowy	linolowy
18:3	oktadekatrienowy	linolenowy
20:2	ikozadienowy	-
20:3	ikozatrienowy	-



Rys. 1. Struktury chemiczne kwasów tłuszczowych głównie omawianych w niniejszej pracy. Kolorem niebieskim oznaczono położenie wiązania podwójnego licząc od grupy karboksylowej, oznaczonego jako delta (Δ). Kolorem zielonym oznaczono położenie wiązania podwójnego od licząc od grupy metylowej, oznaczonego symbolem omega (ω).

1.2.1. Synteza *de novo* kwasów tłuszczowych

Mechanizm biosyntezy *de novo* kwasów tłuszczowych, to proces który w niemalże identyczny sposób przebiega w każdym z żyjących organizmów. Poszczególne różnice dotyczą głównie struktury produkowanych kwasów tłuszczowych, sublokalizacji komórkowej tego procesu oraz budowy dwóch głównych enzymów uczestniczących w biosyntezie tych związków, czyli kompleksu enzymatycznego syntazy kwasów tłuszczowych (FAS; ang. fatty acid synthase) oraz karboksylazy acetylo-CoA (ACCCase; ang. acetyl-CoA carboxylase). W przypadku organizmów eukariotycznych proces ten

zachodzi w cytoplazmie, wyjątek stanowią rośliny, u których biosynteza kwasów tłuszczowych odbywa się głównie w plastydach (zgodnie ze schematem przedstawionym na Rys. 2). Rośliny nie są zdolne do transportu kwasów tłuszczowych na duże odległości, zatem szlak biosyntezy tych związków u roślin nie jest przyporządkowany danej tkance, a enzymy odpowiedzialne za produkcję tych związków występują we wszystkich komórkach (Ohlrogge i Jaworski, 1997; Heldt i Piechulla, 2011).

Podstawowym substratem do biosyntezy kwasów tłuszczowych jest cząsteczka acetylo-CoA, która jest syntetyzowana wyłącznie w plastydach, gdyż cząsteczki acetylo-CoA nie mogą być transportowane pomiędzy kompartmentami komórkowymi. Stężenie tego związku jest utrzymywane na niskim, ale stałym poziomie tak aby zapewnić ciągłość syntezy kwasów tłuszczowych (Post-Beittenmiller i in., 1992; Ohlrogge i Browse, 1995). Ze względu na ograniczoną ilość acetylo-CoA w komórce, niezbędne jest zachodzenie ciągłych procesów, które będą odpowiedzialne za tworzenie puli acetylo-CoA. Pierwszy z nich to powstawanie tego związku z pirogronianu w wyniku aktywności plastydowego kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDHC; ang. pyruvate dehydrogenase complex). Drugim źródłem puli acetylo-CoA jest bezpośrednia reakcja przekształcania cząsteczek octanu w acetylo-CoA pod wpływem aktywności syntetazy acetylo-CoA i wykorzystaniu ATP (Ohlrogge i Browse, 1995; Heldt i Piechulla, 2011).

Cząsteczki acetylo-CoA w pierwszej kolejności ulegają karboksylacji do malonylo-CoA, w reakcji katalizowanej przez karboksylazę acetylo-CoA (ACCcase, ang. acetyl-CoA carboxylase) w obecności CO₂ oraz ATP. Kolejno grupa malonylowa przenoszona jest na białko przenoszące grupy acylowe (ACP; ang. acyl carrier protein), w wyniku aktywności transacylazy malonylowej (MCAT; ang. malonylo-CoA acyl carrier protein transacylase), co ostatecznie prowadzi do powstania malonylo-ACP (Heldt i Piechulla, 2011)

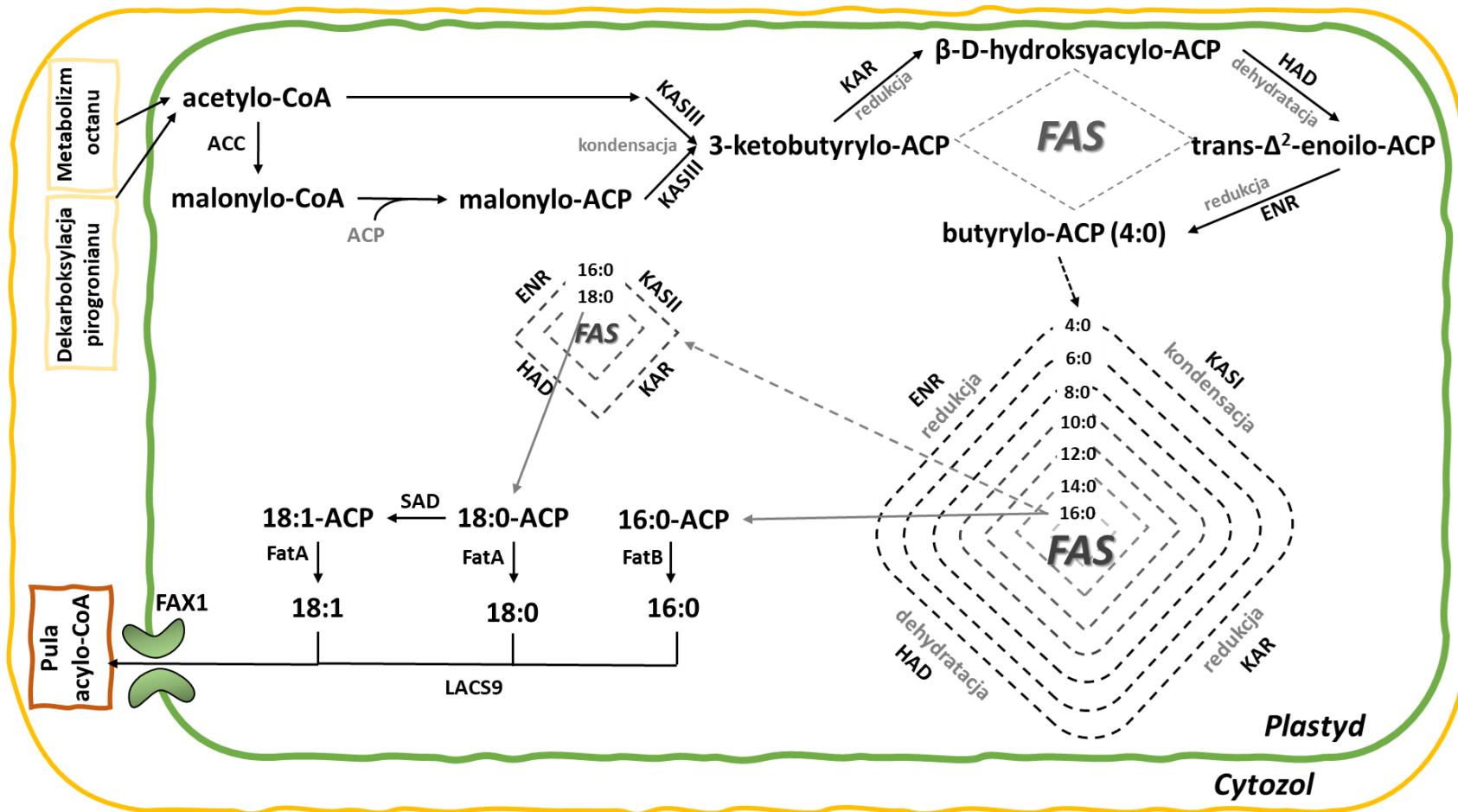
Kolejne etapy biosyntezy kwasów tłuszczowych są katalizowane przez kompleks enzymów FAS, który u roślin składa się z oddzielnych jednostek białkowych, funkcjonujących jak szlak metaboliczny (Brown i in., 2006). Kompleks FAS ma za zadanie elongację łańcucha węglowodorowego w sposób cykliczny kolejno przeprowadzając reakcję: kondensacji, redukcji, dehydratacji oraz ponownej redukcji. Pierwsza reakcja kondensacji polega na połączeniu acetylo-CoA (startera) z malonylo-ACP i jest katalizowana przez syntazę 3-ketoacylo-ACP III (KAS III; ang. 3-ketoacyl-ACP synthase). Podczas tej reakcji powstaje 3-ketobutyrylo-ACP. W kolejnym etapie związek ten redukowany jest do β -D-hydroksyacylo-ACP, w wyniku

aktywności reduktazy 3-ketoacylo-ACP (KAR; ang. ketoacyl-ACP reductase). Następnie dochodzi do etapu dehydratacji, katalizowanej przez dehydratazę 3-D-hydroksyacylo-ACP (HAD; ang. 3-hydroxyacyl-ACP synthase) oraz kolejnej redukcji przeprowadzanej przez reduktazę enoilo-ACP (ENR; ang. enoyl-ACP reductase), co prowadzi ostatecznie do powstania butyrylo-ACP (Clough i in., 1992; Somerville i in., 2000; Heldt i Piechulla, 2011; Li-Beisson i in., 2013).

W efekcie powstały acylo-ACP jest kolejno podawany procesowi elongacji katalizowanej przez kompleks FAS, z tym wyjątkiem, że za kolejne etapy kondensacji odpowiadać będzie syntaza 3-ketoacylo-ACP I (KAS I), która akceptuje acylo-CoA posiadające od 4 do 16 atomów węgla. W momencie powstania palmitoilo-ACP w wyniku aktywności kompleksu FAS, od części powstałych cząsteczek odłączona zostanie grupa ACP w wyniku reakcji katalizowanej przez tioestrazę (FatA (B); ang. fatty acid thioesterase A (B)) prowadząc do powstania wolnego kwasu palmitynowego (16:0). Pozostała część palmitoilo-ACP może podlegać kolejnemu cyklowi szlaku FAS, w którym tym razem reakcję kondensacji będzie katalizować KASII. Produktem kolejnego cyklu jest stearylo-ACP, którego część może ulec desaturacji pod wpływem desaturazy stearylo-ACP (SAD; ang. stearoyl-ACP desaturase). Ostatecznie od obu związków odłączona jest grupa ACP w wyniku aktywności odpowiedniej tioesterazy, kończąc proces syntezy łańcucha węglowego kwasu tłuszczowego. Trzy główne, wolne kwasy tłuszczowe syntetyzowane w stromie plastydu to kwasy: palmitynowy (16:0), stearynowy (18:0) oraz oleinowy (18:1), które kolejno mogą być przetransportowane do cytozolu zaraz po dołączeniu cząsteczki koeznyemu A w wyniku reakcji katalizowanej przez białko LACS9 (ang. long-chain acyl-coenzyme A synthetase 9), a następnie poprzez białko błonowe FAX1 eksportujące kwasy tłuszczowe (ang. fatty acid export 1); (Somerville i in., 2000; Heldt i Piechulla, 2011; Li-Beisson i in., 2013).

Kwasy tłuszczowe związane z cząsteczką CoA tworzą cytoplazmatyczną pulę acylo-CoA, która jest głównym rezerwuarem grup acylowych wykorzystywanych przy syntezie większości lipidów roślinnych zarówno membranowych, jak i zapasowych. Znacząca część kwasów tłuszczowych po przedostaniu się do cytoplazmy poddawana jest dalszym modyfikacją. Część z kwasów tłuszczowych jest przenoszona do puli fosfolipidów, głównie fosfatydylocholinę w wyniku aktywności acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydylocholina (LPCAT; ang. acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase), gdzie podlegają takim procesom jak desaturacja czy dodawanie nowych grup funkcyjnych (Kennedy, 1961). Proces desaturacji w puli fosfatydylocholinę

katalizowany jest przez desaturazy kwasów tłuszczowych FAD2 oraz FAD3 (ang. fatty acid desaturase 2/3), które kolejno odpowiadają za przekształcenie kwasu oleinowego w linolowy, a następnie w kwas linolenowy (Browse i in., 1993; Okuley i in., 1994). Zmodyfikowane kwasy tłuszczowe mogą ponownie zostać wprowadzone do wspomnianej puli cytoplazmatycznego acylo-CoA w wyniku reakcji fosfolipazy A₂ (PLA₂; ang. phospholipase A₂) lub odwrotnej reakcji prowadzonej przez enzymy LPCAT (Lands, 1958; Lager i in., 2013). Innym typem modyfikacji, któremu podlegają kwasy tłuszczowe znajdujące się w puli acylo-CoA jest elongacja prowadząca do powstania bardzo długołańcuchowy kwasów tłuszczowych posiadających powyżej 18 atomów węgla. Proces wydłużania łańcuchów węglowych jest katalizowany przez kompleks enzymatyczny zwany elongazą kwasów tłuszczowych, znajdujący się na błonach retikulum endoplazmatycznego (Ozseyhan i in., 2018). W przypadku kwasów tłuszczowych, które pozostają w plastydach, mogą one również podlegać dalszym modyfikacją takim jak desaturacja, wówczas gdy znajdują się w acylolipidach (Shanklin i Cahoon, 1998). W plastydach znajdują się cztery charakterystyczne dla tego kompartmentu komórkowego desaturazy: FAD4, 5, 6, 7 oraz 8 – analog desaturazy FAD7 indukowany chłodem (ang. fatty acid desaturase 4, 5, 6, 7, 8); (Gao i in., 2009; Li-Beisson i in., 2013).



Rys. 2. Schemat syntezy *de novo* kwasów tłuszczowych.

ACC – karboksylaza acetylo-CoA, ACP – białko przenoszące grupy acylowe, ENR – reduktaza enoilo-ACP, Fat (A,B) – tioestruza acylo-ACP, FAS – kompleks enzymatyczny syntazy kwasów tłuszczowych, FAX1 – białko błonowe, HAD – dehydrataza 3-D-hydroksyacylo-ACP, KAR – reduktaza 3-ketoacylo-ACP, KAS (I, II, III) – syntaza 3-ketoacylo-ACP, LACS – syntetaza długołańcuchowych acylo-CoA, SAD – desaturaza stearylo-ACP.

1.3. Glicerolipidy

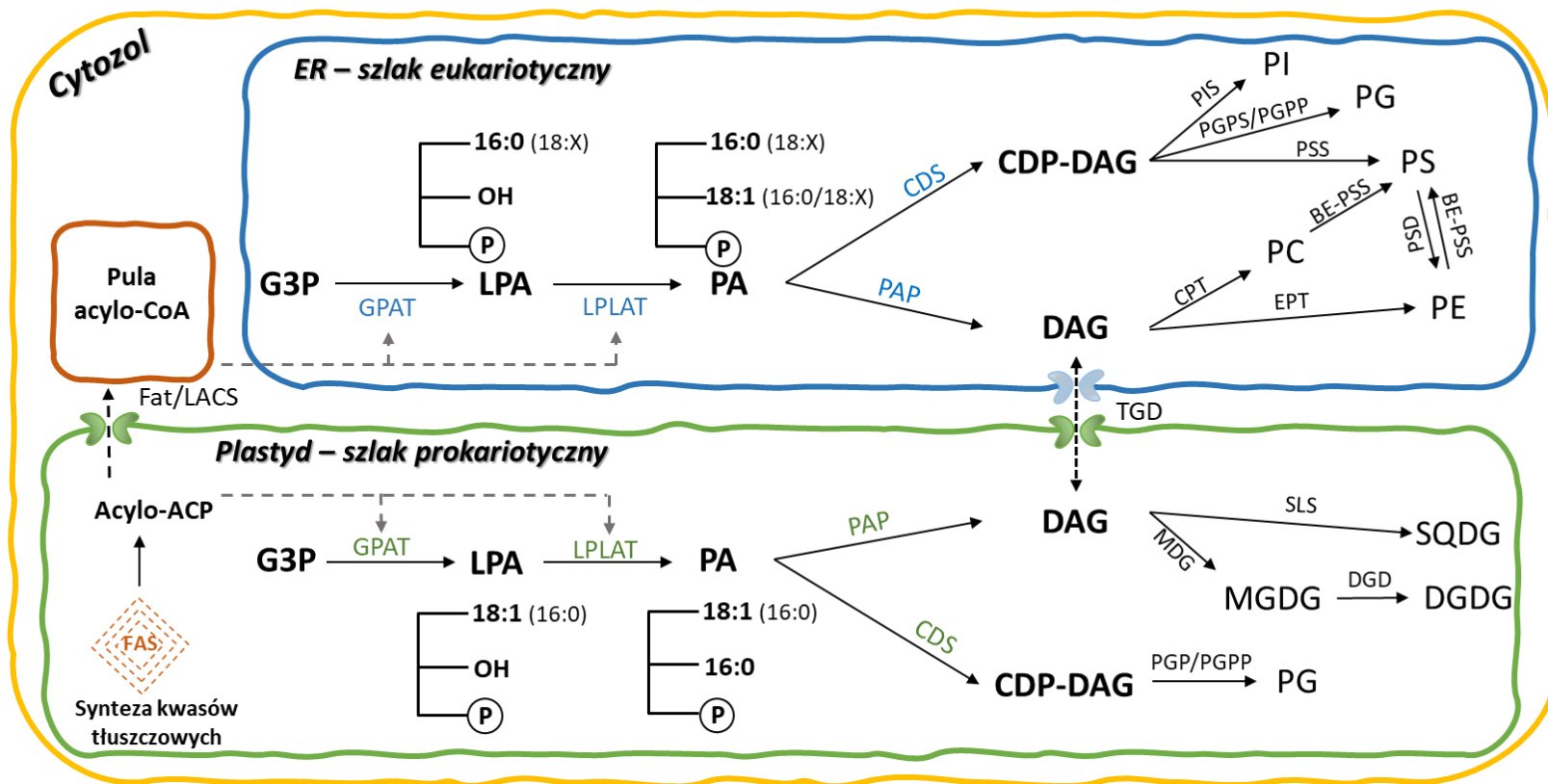
1.3.1. Biosynteza fosfolipidów oraz glikolipidów

Główny etap biosyntezy zarówno fosfolipidów, glikolipidów, a także lipidów neutralnych związany jest z biosyntezą *de novo* puli diacyloglicerolu (DAG; ang. diacylglycerol). Pula DAG może być syntetyzowana za pośrednictwem dwóch szlaków charakteryzujących się innym miejscem występowania, specyficnością substratową zaangażowanych w nich enzymów oraz typem glicerolipidu, który ostatecznie zostanie syntetyzowany. Pierwszy z nich – szlak eukariotyczny odpowiada głównie za produkcję fosfolipidów, a wszelkie reakcje przebiegające w tym cyklu zachodzą w retikulum endoplazmatycznym. Drugi ze szlaków, zachodzący w plastydach, to szlak prokariotyczny odpowiedzialny za syntezę galaktolipidów, sulfolipidów oraz fosfatydyloglicerolu (Kennedy, 1961; Ohlrogge i Browse, 1995).

Pierwszy etap syntezy jest taki sam dla obu szlaków, dochodzi podczas niego do acylacji pozycji *sn*-1 szkieletu glicerolowego (glicero-3-fosforanu, G3P, ang. glycerio-3-phosphate) w wyniku aktywności acylotransferazy glicero-3-fosforanu (GPAT; ang. glycerio-3-phosphate acyltransferase). Powstały w tej reakcji kwas lizofosfatydowy (LPA; ang. lysophosphatidic acid) kolejno jest przekształcany do kwasu fosfatydowego poprzez acylotransferazę acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy (LPAAT; ang. acyl-CoA:lysophosphatidic acid acyltransferase). W przypadku reakcji katalizowanych przez GPAT i LPAAT zachodzących w plastydach donorami kwasów tłuszczowych są cząsteczki acylo-ACP, syntetyzowane i gromadzone również w tych organellach, natomiast dla tych reakcji zachodzących w ER są to cząsteczki acylo-CoA, znajdujące się w puli cytoplazmatycznego acylo-CoA. Enzymy GPAT i LPAAT charakteryzują się również inną specyficnością substratową w zależności od ich miejsca występowania. W przypadku reakcji katalizowanej w plastydach GPAT odpowiada za przyłączanie do pozycji *sn*-1 głównie kwasu oleinowego (18:1), natomiast w przypadku syntezy w ER do szkieletu glicerolowego przyłączany jest przede wszystkim kwas palmitynowy (16:0). Pozycja *sn*-2, acylowana przez LPAAT w plastydach posiadać będzie wyłącznie kwas palmitynowy, natomiast w ER głównie oleinowy (Frentzen, 1998; Dörmann, 2005). Ostatnim etapem biosyntezy *de novo* diacyloglicerolu jest reakcja defosforylacji PA, katalizowana przez fosfatazę kwasu fosfatydowego (PAP; ang. phosphatidate phosphatase). Wszystkie z opisanych powyżej reakcji tworzą szlak Kennedy'ego (Kennedy, 1961), którego schemat przebiegu został przedstawiony na Rys. 3.

Powstała w ten sposób *de novo* pula DAG, w ER, może być dodatkowo wzbogacana przez cząsteczki diacyloglicerolu pochodzące z innych reakcji takich jak: aktywność fosfolipazy C (PLC; ang. phospholipase C) lub aktywność cholinofosfotransferazy fosfatydylocholina:diacyloglicerolu (PDCT; ang. phosphatidylcholine:diacylglycerol cholinephosphotransferase) i cholinotransferazy CDP-cholina:diacyloglicerolu (CPT; ang. CDP-choline:diacylglycerol cholinephosphotransferase), które odpowiadają za przekształcanie puli DAG do PC i odwrotnie. Pula DAG znajdująca się w retikulum endoplazmatycznym może być przenoszona do plastydów i zostać wykorzystana do produkcji lipidów chloroplastowych zawierających nienasycone 18-węglowe kwasy tłuszczowe w pozycji *sn*-2. Transfer puli DAG odbywa się również w kierunku odwrotnym, w szczególności u roślin, które produkują kwas heksadekatrienowy (16:3); (Slack i in., 1983; Ohlrogge i Browse, 1995; Somerville i in., 2000; Li-Beisson i in., 2013). Za przenoszenie cząsteczek DAG, a także innych lipidów polarnych pomiędzy ER i plastydami odpowiadają białka transportowe – permeazy TGD (ang. trigalactosyldiacylglycerol); (Xu i in., 2003; Lu i in., 2007).

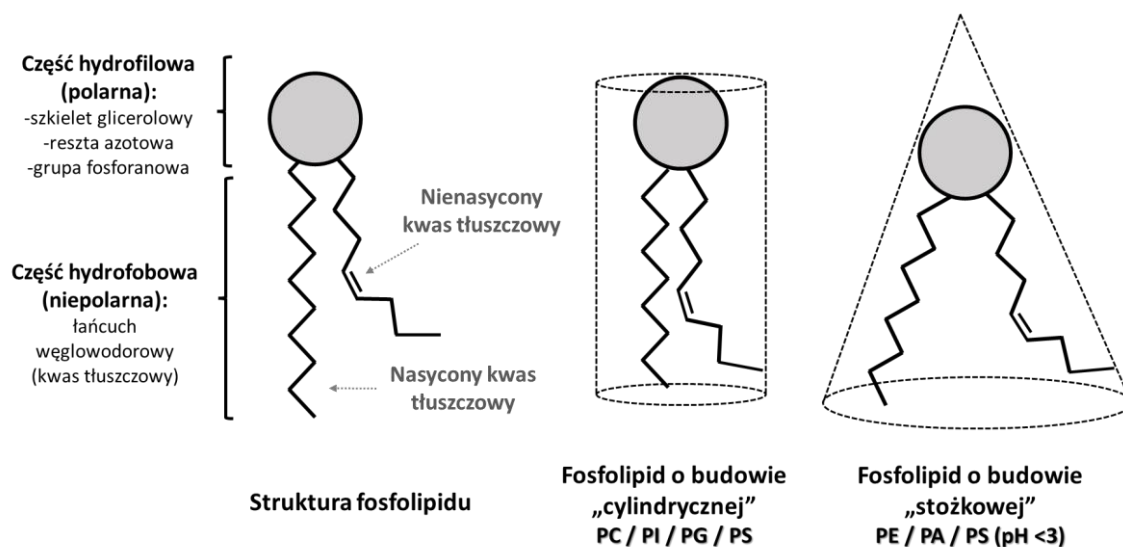
Diacyloglicerol jest produktem pośrednim oraz etapem, gdzie szlak syntezy lipidów membranowych i zapasowych rozgałęzia się. Dalsza synteza lipidów membranowych: galaktolipidów i fosfolipidów odbywająca się w plastydach lub cytozolu wymaga aktywacji jednego z substratów: diacyloglicerolu lub polanej grupy, w reakcji zależnej od ATP. W szlaku „CDP-diacyloglicerolu” aktywowany jest diacyloglicerol do CDP-DAG (cytdynodifosforan diacyloglicerolu; ang. cytidine diphosphate diacylglycerol) w wyniku reakcji katalizowanej przez syntazę CDP-DAG (CDS, ang. CDP-diacylglycerol synthases). W ten sposób syntetyzowane mogą zostać fosfolipidy takie jak: PS, PI, czy PG. W drugim szlaku „diacyloglicerolu” aktywowaną cząsteczką jest grupa polarna np. cholina do CDP-choliny oraz etanoloamina do CDP-etanoloaminy, odpowiednio dla syntezy PC oraz PE. Synteza galaktolipidów oraz sulfolipidów zachodzi również na drodze tego szlaku z tym, że do syntezy MGDG oraz SQDG niezbędna jest aktywowana UDP-galaktoza lub UDP-sulfochinowoza (UDP – urydynodifosforan). Synteza drugiego z galaktolipidów – DGDG, odbywa się na drodze przekształcenia dwóch cząsteczek MGDG pod wpływem aktywności syntazy digalaktosyldiacyloglicerolu (DGD; ang. digalactosyldiacylglycerol synthase); (Somerville i in., 2000; Gibellini i Smith, 2010; Li-Beisson i in., 2013). Szlaki za pośrednictwem, których powstają powyżej wymienione fosfo- oraz glikolipidy zostały przedstawione na Rys. 3. Inne procesy enzymatyczne prowadzące do powstania tych związków zostaną one omówione w dalszej części pracy.



Rys. 3. Schemat syntezy *de novo* fosfolipidów oraz glikolipidów za pośrednictwem szlaku prokariotycznego zachodzącego w plastydach oraz eukariotycznego zachodzącego w retikulum endoplazmatycznym (ER).

BE-PSS – syntaza fosfatydyloseryny typu wymieniającego zasady, CDS – syntaza CDP:diacyloglicerolu, CDP-DAG –cytdynodifosforan diacyloglicerolu CPT – cholinotransferaza CDP-cholina:diacyloglicerolu, DAG – diacyloglicerol, DGD – syntaza digalaktozyliodacyloglicerolu, DGDG – digalaktozyliodacyloglicerol, EPT – etanolaminotransferaza CDP-etanolamina:diacyloglicerol, Fat – tioestraza acylo-ACP, FAS – syntaza kwasów tłuszczowych, G3P – glicero-3-fosforan, GPAT – acylotransferaza glicero-3-fosforanu, LACS – syntetaza długołańcuchowych acylo-ACP, LPA – kwas lizofosfatydowy, LPLAT – acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfolipid, MDG - transferaza monogalaktozyliodacyloglicerolu, MGDG – monogalaktozyliodacyloglicerolu, PA – kwas fosfatydowy, PAP – fosfataza kwasu fosfatydowego, PC – fosfatydylocholina, PE – fosfatydyloetanolamina, PG – fosfatydyloglicerol, PGPP – fosfataza fosforanu fosfatydyloglicerolu, PGPS – syntetaza fosforanu fosfatydyloglicerolu, PI – fosfatydyloinozytol, PIS – syntaza fosfatydyloinozytolu, PS – fosfatydyloseryna, PSD - dekarboksylaza fosfatydyloseryny, PSS - syntaza fosfatydyloseryny, SLS - syntaza sulfolipidowa, SQDG – sulfochinowozyliodacyloglicerol.

1.3.2. Fosfolipidy – budowa, rola oraz alternatywne ścieżki syntezy



Rys. 4. Schemat struktury fosfolipidów oraz kształtów, które mogą przyjmować.

1.3.2.1. Fosfatydylocholina

Fosfatydylocholina jest dominującym fosfolipidem występującym w roślinnych membranach komórkowych, gdzie jej zawartość może stanowić nawet do 50% wszystkich lipidów membranowych. Wyjątek stanowią membrany plastydowe, gdzie PC zajmuje maksymalnie do 14% wszystkich acylolipidów (Browse i Somerville, 1994; Welti i in., 2002). Grupa cholinowa występująca w PC jest stosunkowo dużą, obojętnie naładowaną grupą, która nadaje całej cząsteczce cylindryczny kształt oraz wpływa na jej tendencję do tworzenia dwuwarstwy lipidowych bez krzywizn (Rys.4.); (Harayama i Riezman, 2018; Yu i in., 2021).

Ze względu na swoje powszechne występowanie, fosfatydylocholina podobnie, jak i poniżej omawiana fosfatydyloetanolamina są głównymi składnikami budulcowymi membran biologicznych, co więcej ich kompozycja kwasów tłuszczowych oraz stosunek ilościowy regulują płynności tych struktur (Birner i in., 2001; Dörmann, 2005). Fosfatydylocholina pełni także niezwykle ważną rolę w modyfikacji kwasów tłuszczowych. Modyfikacja ta polega na wzbogacaniu ich puli w związki bardziej nienasycone bądź posiadające dodatkowe grupy funkcyjne (Kennedy, 1961). Zmodyfikowane kwasy tłuszczowe mogą być przenoszone do cytoplazmatycznej puli acylo-CoA, gdzie następnie służą jako substrat dla dalszych etapów biosyntezy lipidów

membranowych oraz zapasowych. Reakcja ta może być regulowana przez aktywność PLA₂ lub aktywności typu *backward* enzymów LPCAT. Enzymy te w reakcjach typu *forward* odpowiadają natomiast za syntezę puli fosfatydylocholiny, katalizując dołączenie grupy acylowej z puli acylo-CoA do lizofosfatydylocholiny (Stymne i Stobart, 1984). Pula PC może być przekształcana w główny produkt pośredni syntezy lipidów – diacyloglicerol, w wyniku reakcji prowadzonej przez CPT oraz PDCT (Slack i in., 1983; Lu i in., 2009). Enzymy te mogą również odpowiadać za reakcję odwrotną katalizującą syntezę PC. Zmodyfikowane kwasy tłuszczowe, obecne w puli PC mogą także być bezpośrednio włączane do puli lipidów zapasowych – triacylogliceroli w wyniku aktywności enzymów PDAT (acylotransferaza fosfolipid:diacyloglicerol, ang. phospholipid:diacylglycerol acyltransferase), które katalizują reakcję dołączenia do pozycji *sn-3* diacyloglicerolu grupy acylowej pochodzącej z fosfatydylocholiny lub fosfatydyloetanolaminy (Banaś i in., 2000; Dahlqvist i in., 2000).

1.3.2.2. Fosfatydyloetanolamina

Fosfatydyloetanolamina jest drugim najpowszechniej występującym fosfolipidem u roślin. Jej zawartość jest zależna od miejsca występowania i może wahać się w granicach 25-37% wszystkich lipidów membranowych (Browse i Somerville, 1984; de Kroon, 2007; Welti i in., 2002). PE ze względu na obecność w swojej strukturze małej cząsteczki jaką jest etanolamina tworzy struktury stożkowe (ang. conical shape; Rys. 4), które ostatecznie wpływają na skłonność do tworzenia przez PE struktur o negatywnych krzywiznach tworzących błonę lipidową składającą się z pojedynczej warstwy. Dodatkowo jej struktura prowadzi do powstawania struktur heksagonalnych (De Kruijff, 1997; Harayama i Riezman, 2018; Yu i in., 2021).

Wiele badań dotyczących fosfatydyloetanolaminy wykazało jej znaczącą rolę fizjologiczną zarówno w komórkach prokariotycznych, jak i eukariotycznych. Przede wszystkim ze względu na swoją budowę i możliwość tworzenia heksagonalnych struktur uczestniczy ona w regulacji tworzenia struktur przestrzennych membran umożliwiając ich fałdowanie oraz mając wpływ na ich fuzję i rozszczepianie (De Kruijff, 1997). PE odpowiada również za tworzenie się poprawnych struktur, fałdowanie i aktywność peryferyjnych białek znajdujących się w membranach, a także rozmieszczenie białek transbłonowych. W komórkach drożdży obecność PE jest niezbędna do prawidłowego działania kompleksów oddechowych i ubichinonu (Birner i in., 2001; Gibellini i Smith,

2010). Kolejną z właściwości PE jest jej rola w procesie autofagii, podczas której odpowiada za elongację i poprawne formowanie autofagosomu, a także jest miejscem, poprzez które do pęcherzyka autofagosomalnego przyłączane jest jedno z ważniejszych białek tego procesu Atg8 (Ichimura i in., 2000; Kabeya i in., 2000; Nakatogawa i in., 2007). Dodatkowo badania przeprowadzone przez Rockenfeller i in. (2015) wykazały, że zwiększona zawartość PE w organizmie *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* oraz w komórkach ssaczych wpływa pozytywnie na regulację procesu autofagii oraz wydłuża długość życia. Te doniesienia zostały także potwierdzone dla organizmu roślinnego – *Arabidopsis thaliana* (Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2021). Ostatnie badania, przeprowadzone na komórkach ssaczych, dowodzą znaczącej roli PE w procesie śmierci komórkowej zależnej od DHA (kwasu dokozaheksaenowego; ang. docosahexanoic acid) oraz w procesie ferroptozy (D’Herde i in., 2017; Eto i in., 2020). Fosfatydyloetanolamina jest wykorzystywana również jako donor grup acylowych przy produkcji triacylogliceroli w reakcji katalizowanej przez enzymy PDAT (Banaś i in., 2000; Dahlqvist i in., 2000).

W komórkach eukariotycznych PE może być syntetyzowane w wyniku trzech różnych reakcji. Dominującym procesem jest szlak „diacyloglicerolu”, w którym etanolaminofosfotransferaza CDP-etanolamina:diacyloglicerolu odpowiada za syntezę PE (EPT; ang. CDP-ethanolamine:diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase). Drugą z możliwości jest biosynteza katalizowana przez dekarboksylazę fosfatydyloseryny (PSD; ang. phosphatidylserine decarboxylase), podczas której seryna znajdująca się w cząsteczce fosfatydyloseryny ulega przekształceniu do etanolaminy w wyniku odłączenia grupy karboksylowej (Nerlich i in., 2007). Ostatnią z możliwości produkcji PE w komórkach roślinnych jest aktywność LPEAT, czyli acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina (ang. acyl-CoA:lysophosphatidylethanolamine acyltransferase), która przeprowadza reakcję taką jak LPCAT, z tym, że grupa acylowa jest dołączana do lizofosfatydyloetanolaminy (Stålber i in., 2009).

1.3.2.3. Kwas fosfatydowy

Kwas fosfatydowy występuje w tkankach roślinnych w bardzo ograniczonych ilościach. Stanowi on do 1% wszystkich acylolipidów membranowych i do 2% fosfolipidów obecnych w liściach (Welti i in., 2002; Colin i Jaillais, 2020). Kwas

fosfatydowy o strukturze stożkowej z ładunkiem anionowym podobnie jak PE wchodzi w skład membran pojedynczych (Harayama i Riezman, 2018).

Ograniczona ilość tego fosfolipidu w komórkach roślinnych jest głównie spowodowana jego rolą jaką pełni podczas biosyntezy lipidów membranowych oraz zapasowych, będąc bezpośrednim substratem do produkcji diacyloglicerolu w szlaku Kennedy'ego (Kennedy, 1961). Kwas fosfatydowy pełni także bardzo ważną funkcję jako specyficzny czujnik do monitorowania środowiska pozakomórkowego. Uczestniczy w transdukcji sygnału w warunkach stresu abiotycznego oraz biotycznego, podczas którego w wyniku aktywacji fosfolipazy D (PLD; ang. phospholipase D) akumulowana jest zwiększona ilość PA (Testerink i Munnik, 2011). Ponadto pośredniczy w sygnalizacji hormonalnej oraz reguluje procesy związane z rozwojem różnych tkanek oraz struktur komórkowych (Yao i Xue, 2018).

Kwas fosfatydowy jest głównie produkowany w wyniku aktywności enzymów LPAAT, opisanych w podrozdziale 1.3.1. Również, jak wspomniano powyżej fosfolipid ten może być produkowany jako efekt aktywności fosfolipazy D, która hydrolizuje wiązanie fosfodiesterowe zarówno PE, jak i PC (Pappan i in., 1998). Inną z możliwości powstawania PA jest aktywność kinazy diacyloglicerolu (DGK; ang. diacylglycerol kinase), która przeprowadza fosforylację diacyloglicerolu przy wykorzystaniu ATP (Arisz i in., 2009).

1.3.2.3. Fosfatydyloinozytol, fosfatydyloseryna oraz fosfatydyloglicerol

Zarówno fosfatydyloinozytol, fosfatydyloseryna, jak i fosfatydyloglicerol występują w bardzo ograniczonych ilościach w komórkach roślinnych. Największą zawartość PI oraz PS zaobserwowano w nasionach oraz korzeniach, gdzie oba fosfolipidy stanowiły razem odpowiednio około 13 i 19%. W przypadku liści jest to około 3%. PG występuje głównie w tkankach zielonych stanowiąc w granicach od 10 do 14% wszystkich lipidów membranowych. W pozostałych tkankach jego zawartość wynosi około 4% (Browse i Somerville, 1994; Miquel i Browse, 1992; Welti i in., 2002; Li-Beisson i in., 2013). Wszystkie z wymienionych fosfolipidów są lipidami anionowymi należącymi do związków o budowie cylindrycznej tworzących dwuwarstwę lipidową. W przypadku PS jej struktura może ulec zmianie na budowę stożkową w środowisku o $\text{pH} < 3$ (Hope i Cullis, 1980; Li i in., 2015; Harayama i Riezman, 2018; Yu i in., 2021).

Fosfatydyloinozytol pomimo swojej znikomej zawartości występuje w membranach wszystkich struktur komórkowych (Dörmann, 2005). Pełni on rolę nie tylko jako materiał budulcowy błony, ale także jest prekursorem trifosforanu fosfatydyloinozytolu, który odgrywa znaczącą rolę w transdukcji sygnału jako cząsteczka sygnałowa (Meijer i Munnik, 2003). W komórkach roślinnych synteza tego fosfolipidu odbywa się jedynie w retikulum endoplazmatycznym na drodze szlaku „CDP-diacyloglicerolu”, podczas którego do aktywowanej cząsteczki DAG dołączany jest myo-inozytol pod wpływem reakcji katalizowanej przez syntazę fosfatydyloinozytolu (PIS; ang. phosphatidylinositol synthase), (Xue i in., 2000; Löffke i in., 2008; Li-Beisson i in., 2013). Fosfatydyloinozytol może powstawać również w reakcji katalizowanej przez LPIAT (acylotransferazę acylo-CoA:lizofosfatydyloinozytol; ang. acyl-CoA:lizophosphatidylinositol), należący do grupy enzymów LPLAT. Dotychczas obecność tego typu enzymów została potwierdzona w komórkach eukariotycznych, w tym również w tkankach roślinnych *A. thaliana* (Baker, 1973; Lee i in., 2008; Coulon i in., 2020).

Fosfatydyloseryna występuje głównie w membranach poza plastydowych, szczególnie w cytozolowym listku plazmalemmy, której nadaje ujemny ładunek i odpowiada za zwiększenie ładunku powierzchniowego tej membrany oraz powstanie gradientu potencjału (Platre i in., 2018). Synteza fosfatydyloseryny u roślin może odbywać się poprzez wymianę wolnej grupy L-seryny z etanoloaminą lub choliną obecną odpowiednio w cząsteczce PE, bądź PC. Reakcja ta katalizowana jest przez syntazę fosfatydyloseryny typu wymieniającego zasady (BE-PSS; ang. base-exchange-type phosphatidylserine synthase); (Marshall i Kates, 1974; Moore, 1975). Inną z możliwości syntezy PS jest szlak „CDP-diacyloglicerolu” zachodzący w ER, podczas którego w reakcji katalizowanej przez syntazę fosfatydyloseryny (PSS; ang. phosphatidylserine synthase) wykorzystany zostaje aktywny DAG oraz L-seryna (Delhaize i in., 1999). Podobnie, jak w przypadku PI, PS również może być syntetyzowany przy pomocy enzymów należących do LPLATów – LPSAT (acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydyloseryna; ang. acyl-CoA:lysophosphatidylserine acyltransferase) jednakże ich obecność nie została dotychczas potwierdzona w komórkach roślinnych, aczkolwiek enzym ten może występować w komórkach eukariotycznych (Holub, 1980).

Fosfatydyloglicerol, trzeci z omawianych fosfolipidów, występuje w ER, mitochondriach oraz plastydach. W dwóch pierwszych organellach PG występuje w niewielkich ilościach, podczas gdy w plastydach jest dominującym fosfolipidem. Pełni on tam fundamentalną rolę jaką jest stabilizacja i integralność fotosystemu I oraz II.

Jego obecność jest także niezbędna do prawidłowego przebiegu reakcji fotosyntezy, ponieważ wraz z galaktolipidami i białkami formuje kompleksy lipidowo-białkowe barwników fotosyntetycznych (Gombos i in., 2002; Sato i in., 2004; Dörmann, 2005; Kobayashi i Wada, 2016). W tkankach roślinnych PG jest syntetyzowane w plastydach w szlaku „CDP-diacyloglicerolu” w reakcji katalizowanej kolejno przez dwa enzymy: syntetazę fosforanu fosfatydyloglicerolu (PGPS; ang. phosphatidylglycerolphosphate synthase) oraz fosfatazę fosforanu fosfatydyloglicerolu (PGPP; ang. phosphatidylglycerolphosphate phosphatase); (Müller i Frentzen, 2001; Li-Beisson i in., 2013). Tak jak w przypadku poprzednich omawianych fosfolipidów, PG może być syntetyzowane przez enzymy z grupy LPLAT – LPGAT (acylotransferazę acylo-CoA:lizofosfatydyloglicerol). Dotychczas obecność tego enzymu potwierdzono jedynie w komórkach ssaczy (Yang i in., 2004).

1.3.3. Glikolipidy – budowa, rola oraz alternatywne ścieżki syntezy

Do glikolipidów zaliczamy galaktolipidy, których głównymi reprezentantami są MGDG oraz DGDG, a także sulfolipidy, których jedynym przedstawicielem w tkankach roślinnych jest SQDG. Galaktolipidy są dominującymi lipidami występującymi w liściach, gdzie MGDG może stanowić nawet do 50%, a DGDG do 15% wszystkich glicerolipidów. SQDG stanowi natomiast zaledwie do 3% wszystkich roślinnych acylolipidów i występuje również jedynie w tkankach zielonych (Miquel i Browse, 1992; Browse i Somerville, 1994; Welte i in., 2002; Li-Beisson i in., 2013).

Glikolipidy są głównymi składnikami błon tylakoidowych, gdzie pełnią istotną rolę fizjologiczną jaką jest udział w procesie fotosyntezy. Badania krystalograficzne wykazały obecność MGDG zarówno w strukturach fotosystemów I i II, jak i w kompleksie cytochromu b_6 , podczas gdy DGDG oraz SQDG są obecne wyłącznie w fotosystemie II (Douce i Joyard, 1980; Stroebel i in., 2003; Guskov i in., 2009). Kobayashi i in. (2007) wykazali znaczący wpływ obecności MGDG na poprawny rozwój liści oraz tylakoidów. W przypadku SQDG jego rola fizjologiczna podobnie jak DGDG związana jest z adaptacją do niekorzystnych warunków środowiskowych. Warunki te modyfikowały zarówno ich zawartość, proporcje, jak i skład kwasów tłuszczowych (Yu i in., 2002; Janik i in., 2013).

Tak jak opisano w poprzednim rozdziale (1.3.1) synteza glikolipidów odbywa się głównie za pośrednictwem szlaku „diacyloglicerolu”, gdzie aktywowanym substratem

jest reszta cukrowa. Synteza MGDG katalizowana jest przez transferazę monogalaktozydylacyloglicerolu (MDG, ang. monogalactosyldiacylglycerol transferase), natomiast SQDG przez syntazę sulfolipidową (SLS, ang. sulfolipid synthase). W przypadku DGDG, synteza odbywa się za pośrednictwem DGD (Somerville i in., 2000; Gibellini i Smith, 2010; Li-Beisson i in., 2013).

1.3.4. Lipidy neutralne– budowa, funkcje oraz biosynteza

Do puli lipidów neutralnych zaliczane są cząsteczki, które do szkieletu glicerowego mają dołączone jedynie kwasy tłuszczowe. Jeśli tylko jeden kwas tłuszczowy jest dołączony wiązaniem estrowym do cząsteczki glicerolu mówimy o monoacyloglicerolach (MAG; ang. monoacylglycerol), w przypadku obecności dwóch kwasów tłuszczowych mówimy zaś o diacyloglicerolach (DAG; ang. diacylglycerol). Oba związki pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych oraz składników budulcowych membran komórkowych. Ponadto są prekursorami w syntezie lipidów zapasowych, przy czym DAG, jak już wspomniano w poprzednich rozdziałach, stanowi niezwykle ważny produkt pośredni również w biosyntezie lipidów membranowych (Kennedy, 1961; Li-Beisson i in., 2013).

Do najbardziej złożonej i rozpowszechnionej struktury lipidów neutralnych należą triacyloglicerole (TAG; ang. triacylglycerol) posiadające trzy łańcuchy kwasów tłuszczowych zestryfikowanych ze szkieletem glicerolowym, które stanowią główny rezerwuar materiału zapasowego i energii. Triacyloglicerole są magazynowane przez rośliny w nasionach, gdzie mogą stanowić nawet do 90% ich całkowitej masy. Ponadto mogą występować także w innych strukturach takich jak owoce, starzejące się liście czy ziarna pyłku. W pozostałych organach występują w znikomych ilościach (Kaup i in., 2002; Weselake, 2005; Li-Beisson i in. 2013). Triacyloglicerole docelowo są magazynowane często w postaci ciałek tłuszczowych (oleosomów). Struktury te składają się z triacylogliceroli, otoczonych pojedynczą błoną zbudowaną z fosfolipidów, zawierającą dodatkowo także białka. Głównymi białkami znajdującymi się w tych strukturach są oleozyny, sterolozyny i kalozyny (Jolivet i in., 2004).

1.3.4.1. Biosynteza triacylogliceroli

Głównym substratem pośrednim w syntezie triacylogliceroli są diacyloglicerole powstające w szlaku „eukariotycznym” w membranach retikulum endoplazmatycznego (Somerville i in., 2000). Podczas tego szlaku, zwanego „szlakiem Kennedy’ego”, który zaprezentowano na Rys. 5 (oraz poprzednio na Rys. 3), dochodzi do przeniesienia grup acylowych z cytoplazmatycznej puli acylo-CoA kolejno na glicero-3-fosforan, a następnie kwas lizofosfatydowy w wyniku aktywności enzymów GPAT oraz LPAAT. Powstały kwas fosfatydowy ulega defosforylacji przez fosfatazę kwasu fosfatydowego prowadząc po biosyntezy *de novo* puli DAG (Kennedy, 1961). Jak opisano już w poprzednim rozdziale dotyczącym syntezy fosfolipidów oraz glikolipidów (1.3.1) pula DAG może powstawać również w wyniku innych reakcji katalizowanych np. przez PDCT oraz CPT, które uczestniczą w przekształceniu puli PC, odpowiedzialnej za desaturację kwasów tłuszczowych (Slack i in., 1983; Ohlogge i Browse, 1995; Somerville i in., 2000; Li-Beisson i in., 2013).

Powstałe w ten sposób pule DAG stanowią substrat do syntezy lipidów membranowych oraz zapasowych – triacylogliceroli. Dalsza biosynteza TAG może odbywać się za pośrednictwem trzech różnych reakcji enzymatycznych.

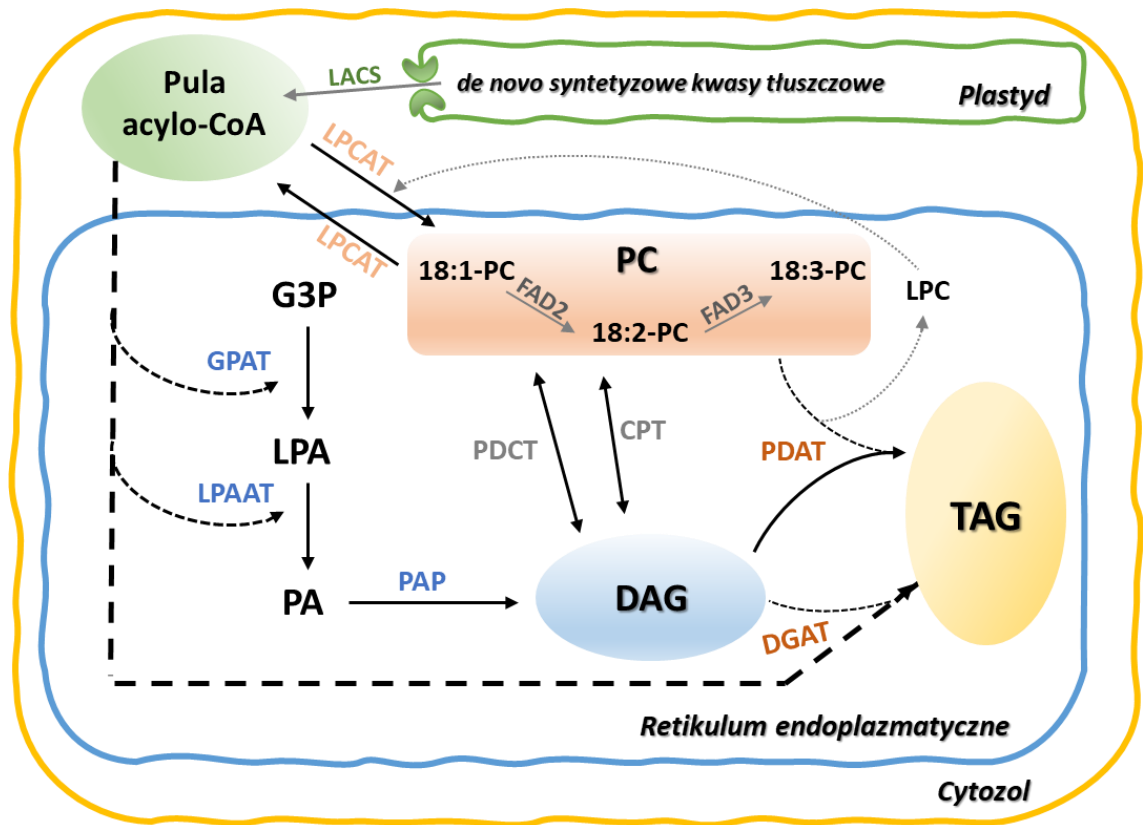
Pierwsza z reakcji katalizowana jest przez acyltransferazę acylo-CoA:diacyloglicerol (DGAT, ang. acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase), która odpowiada za acylację pozycji *sn*-3 szkieletu glicerolowego DAG grupami acylowymi podchodzącymi z cytoplazmatycznej puli acylo-CoA. Jest to enzym wykazujący największy zakres specyficzności substratowej spośród wszystkich enzymów ze szlaku Kennedy’ego, wpływając w ten sposób na różnorodność kwasów tłuszczowych występujących ostatecznie w puli TAG (Vance i Vance, 2008). W komórkach roślinnych enzymy te mogą występować w dwóch ortologicznych wariantach charakteryzujących się inną specyficznością substratową względem donora i akceptora, innym miejsce występowania, a także fizjologiczną rolą podczas działania niekorzystnych warunków zewnętrznych (Shockey i in., 2006; Bates i in., 2013; Yuan i in., 2017b).

Drugą z możliwości syntezy TAG jest również acylacja pozycji *sn*-3 diacyloglicerolu, jednakże w reakcji katalizowanej przez PDAT, gdzie donorem grup acylowych jest fosfatydylocholina lub fosfatydyloetanolamina. Jako produkt uboczny tej reakcji powstaje odpowiednio lizofosfatydylocholina lub lizofosfatydyloetanolamina, które mogą zostać wykorzystane jako substraty do reakcji katalizowanych przez enzymy LPCAT lub LPEAT (Banaś i i., 2000; Dahlqvist i in., 2000). Pula PC wykorzystywana

jako źródło grup acylowych wzbogaca bezpośrednio triacyloglicerole w kwasy wielonienasycone oraz „nietypowe” kwasy tłuszczowe. Badania przeprowadzone przez Bates i in. (2013) wykazały, że ponad 66% kwasów tłuszczowych obecnych w triacyloglicerolach pochodzi pośrednio (w wyniku aktywności enzymów PDCT, CPT, LPCAT) lub bezpośrednio (za pośrednictwem enzymu PDAT) z puli PC. Enzymy PDAT mogą występować w różnych izoformach wykazujących charakterystyczną lokalizację tkankową, a co za tym idzie również mogą wykazywać odmienną rolę (Yuan i in., 2017a).

Ostatnią z możliwości syntezy puli TAG jest reakcja katalizowana przez transacylazę diacyloglicerol:diacyloglicerol (DGTA, ang. diacylglycerol:diacylglycerol tranacylase), której istnienie zostało zasugerowane na podstawie badań przeprowadzonych na nasionach słonecznika, jednakże do dziś jej istnienie nie zostało potwierdzone (Stobart i in., 1997).

Badania przeprowadzone na tkankach roślinnych, głównie nasionach magazynujących TAG, pochodzących z różnych gatunków roślin nie wykazały jednoznacznie dominującej roli enzymów typu PDAT lub typu DGAT w syntezie tych związków we wszystkich badanych tkankach. Ich względne znaczenie w tym procesie wciąż pozostaje niejasne, jednak postuluje się, że rola każdego z tych enzymów jest zależna od gatunku rośliny, w której występują (Banaś i in., 2013). Oba z enzymów pełnią z pewnością znaczącą rolę we wzbogacaniu puli triacylogliceroli w „nietypowe” kwasy tłuszczowe (Dahlqvist i in., 2000; Bungal i in., 2008).



Rys. 5. Schemat syntezy triacylogliceroli.

CPT – cholinofosfotransferaza CDP-cholina:diacyloglicerol, DAG – diacyloglicerol, DGAT – acylotransferaza acylo-CoA:diacyloglicerol, FAD(2, 3) – deasturazy kwasów tłuszczowych, G3P – glicero-3-fosforan, GPAT – acylotransferaza glicero-3-fosforanu, LACS – syntetaza długołańcuchowych acylo-CoA, LPA – kwas lizofosfatydowy, LPAAT – acylotransferaza acylo-CoA: kwas lizofosfatydowy, LPC – lizofosfatydylocholina, LPCAT – acylotransferaza acylo-CoA: lizofosfatydylocholina, PA – kwas fosfatydowy, PAP – fosfataza kwasu fosfatydowego, PC – fosfatydylocholina, PDAT – acylotransferaza fosfolipid:diacyloglicerol, PDCT – cholinofosfotransferaza fosfatydylocholina:diacyloglicerol, TAG – triacyloglicerol.

1.4. Remodelowanie lipidów membranowych

Wszystkie z wymienionych i opisanych powyżej związków tworzą razem bardziej złożoną strukturę jaką są membrany błon komórkowych, będące podstawowym składnikiem obecnym w żywych organizmach. Zgodnie z modelem płynnej mozaiki kluczową cechą membran jest ich dwuwarstwowa budowa, gdzie w każdej z warstw lipidy oraz białka są luźno upakowane (tzw. płynna struktura), co pozwala na ich rotację oraz zmianę miejsca położenia (Singer i Nicolson, 1972). Nadrzędną rolą membran biologicznych jest oddzielenie środowiska zewnętrznego od środowiska komórkowego, a ich właściwości odpowiadają za prawidłowy transport i syntezę biomolekuł, transdukcję energii oraz sygnalizację komórkową (Los i Murata, 2004; van Meer i in., 2008). Dodatkowo każdy z lipidów występujący w membranach może wykazywać unikatową dla siebie rolę, która została opisana w poprzednim rozdziale (1.3). Dotychczas przeprowadzone badania pozwoliły na wnikliwe poznanie mechanizmów biosyntezy komponentów lipidowych membran, jednakże wiedza dotycząca procesów remodelowania tych związków jest wciąż znikoma. Poznanie tych procesów jest wyjątkowo ważne, ponieważ zjawisko remodelowania jest niezwykle istotnym mechanizmem uczestniczącym w adaptacji do zmieniających się właściwości fizykochemicznych zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz komórki.

1.4.1. Modyfikacje fosfolipidów oraz galaktolipidów zachodzące pod wpływem procesu remodelowania

Proces remodelowania dotyczy głównie modyfikacji puli fosfolipidów oraz galaktolipidów, a dotychczasowe badania sugerują, że przebudowa tych związków pełni kluczową rolę w utylizacji utlenionych lub uszkodzonych łańcuchów acylowych, uwalnianiu lipidów sygnałowych oraz co najważniejsze w odpowiedzi na stres, szczególnie wywołany czynnikami abiotycznymi takimi jak niska oraz wysoka temperatura, deficyt azotu lub fosforanów, susza oraz zasolenie (Reszczyńska i Hanaka, 2020; Yu i in., 2021). Pod wpływem tych czynników zmiany zachodzące w glicerolipidach dotyczą modyfikacji ich składu kwasów tłuszczowych (edycji grup acylowych), czy zmian proporcji występujących fosfolipidów lub galaktolipidów.

Edycja grup acylowych wpływa głównie na płynność membran biologicznych. Zwiększona zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych, pożądana przy wysokich temperaturach, zmniejsza płynność błony poprzez ściślejsze upakowanie prostych,

nasyconych łańcuchów acylowych wraz ze sterolami. Z drugiej strony zwiększona zawartość kwasów nienasyconych o konformacji „cis” zapobiegająca ciasnemu upakowaniu grup acylowych jest niezbędna do utrzymania płynności membran w niskich temperaturach. Zmiana kompozycji grup acylowych w zależności od warunków temperaturowych została już udowodniona w wielu badaniach przeprowadzonych na organizmach roślinnych (Kates i in., 1984; Welti i in., 2002; Falcone i in., 2004; Qin i in., 2020). Podobne modyfikacje odnotowano również dla roślin hodowanych w warunkach stresu solnego oraz suszy, gdzie odpowiednio zaobserwowano zwiększoną zawartość kwasu linolowego oraz linolenowego (Zhang i in., 2017; Duarte i in., 2018; Sui i in., 2018).

Alternatywną drogą remodelowania puli lipidów jest modyfikacja proporcji występujących w membranach fosfolipidów oraz galaktolipidów. Każdy z glicerolipidów posiada swoje indywidualne cechy wpływając na tendencję do tworzenia się struktur jednowarstwowych lub dwuwarstwowych, w tym heksagonalnych oraz o budowie cylindrycznej i stożkowej. Modyfikacje zachodzące w puli fosfolipidów pod wpływem różnych stresów środowiskowych dotyczą głównie puli PC, PE oraz PG. Modyfikacje te nie są jednak charakterystyczne dla danego stresora, a w głównej mierze zależą od gatunku rośliny oraz konkretnych parametrów stresowych jakie były analizowane (Yu i in., 2021). Najwyraźniejsze i powtarzalne wśród różnych gatunków roślin są zmiany dotyczące puli galaktolipidów, dla których zawartość MGDG malała, a DGDG zwiększała się pod wpływem niskich i wysokich temperatur oraz suszy (Yu i in., 2021).

Inną z możliwości edycji składu lipidowego, który występuje w przypadku niedoboru fosforanów, jest mechanizm przekształcania fosfolipidów w glikolipidy. Proces ten dotyczy głównie konwersji PC, PE oraz PG do DGDG oraz SQDG (Essigmann i in., 1998; Härtel i in., 2000).

1.4.2. Potencjalne enzymy uczestniczące w procesie remodelowania

Badania dotyczące remodelowania lipidów skupiają się głównie na fosfolipidach, ponieważ to ich skład kwasów tłuszczowych podlega modyfikacją w przypadku działania niekorzystnych warunków. Większość z nich skupia się na puli fosfatydylocholiny, ponieważ jak już wspomniano w poprzednich rozdziałach grupy acylowe wchodzące w jej skład ulegają licznym modyfikacją np. przekształcane są do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA, ang. polyunsaturated fatty acids) w wyniku aktywności

desaturaz (Somerville i in., 2000). Pula PC może być wykorzystywana również bezpośrednio jako substrat do produkcji lipidów zapasowych stanowiąc źródło DAG z kwasami tłuszczowymi innymi niż te włączane podczas szlaku Kennedy'ego (Kennedy, 1961; Banaś i in., 2000).

W związku z powyższym, na szczególną uwagę zasługują enzymy typu LPLAT, głównie te o aktywności LPCAT, które katalizują reakcję dołączenia grupy acylowej do lizofosfatydylocholiny (LPC) prowadząc do powstania PC, a także przeprowadzają reakcję odwrotną wyprowadzając w ten sposób zmodyfikowane kwasy tłuszczowe do cytoplazmatycznej puli acylo-CoA, będącej głównym źródłem grup acylowych dla większości reakcji syntezy lipidów (Stymne i Stobart, 1984; Lager i in., 2013). Również taką zdolność posiadają pozostałe enzymy LPLAT: typu LPAAT oraz LPEAT (Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2016), jednakże badania nad ich rolą w procesie remodelowania dotychczas nie zostały przeprowadzone. Ze względu na szczególną rolę enzymów LPLAT w edycji grup acylowych oraz główny podmiot prezentowanych w tej pracy badań, ich dokładna charakterystyka zostanie opisana w kolejnym rozdziale (1.5).

Inną grupą enzymów, których rola w remodelowaniu lipidów jest dość dobrze poznana są fosfolipazy. Są to enzymy hydrolizujące różne wiązania obecne w cząsteczkach fosfolipidów. Ekspresja genów, które je kodują jest silnie skorelowana z warunkami środowiskowymi (Welti i in., 2002; Hong i in., 2016). Fosfolipazy A₁ oraz A₂ odpowiadają za hydrolizę łańcuchów acylowych z pozycji *sn*-1 lub *sn*-2 fosfolipidów prowadząc do powstania lizofosfolipidów. Reakcja ta jest szczególnie ważna, ponieważ współtowarzyszy reakcji odwrotnej prowadzonej przez enzymy LPLAT, wspomagając w ten sposób suplementację puli acylo-CoA w zmodyfikowane kwasy tłuszczowe (Lands, 1958). Fosfolipazy typu B odpowiadają za hydrolizę wiązań estrowych glicerolu z kwasami tłuszczowymi z obu pozycji *sn*-1 oraz *sn*-2 fosfolipidów, zaś fosfolipazy C i D opowiadają za hydrolizę wiązania fosfodiesterowego, prowadząc odpowiednio do powstania DAG oraz PA (Hong i in., 2016).

W reedycji puli fosfatydylocholiny ważną rolę pełni także omówiona już cholinofosfotransferaza fosfatydylocholina:diacyloglicerol odpowiedzialna za przekształcenie PC do puli DAG, i odwrotnie. Kolejnym istotnym procesem może być reakcja katalizowana przez acylotransferazę acylo-CoA:glicerofosfocholina (GPCAT, ang. glycerophosphocholine acyltransferase), która odpowiada za proces transacylacji grup acylowych z różnych lizofosfolipidów m.in.: LPC i LPE, na glicero-3-fosfocholinę

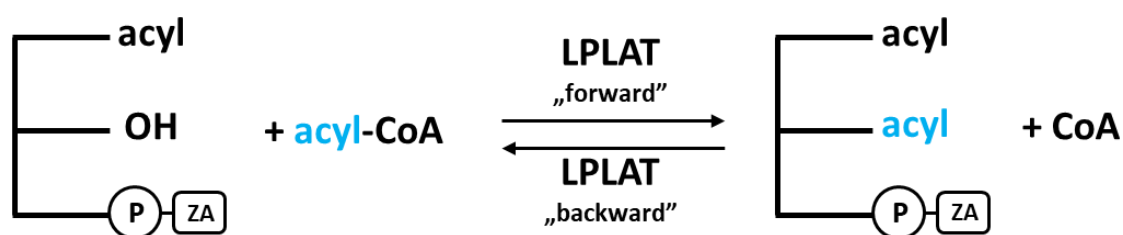
(GPC, ang. glycerophosphocholine), co sugerują możliwą rolę tych enzymów w wymianie grup acylowych obecnych pulą PC i PE (Głąb i in., 2016).

W przypadku galaktolipidów, dotychczas wykazano, że ich skład może być edytowany poprzez zwiększoną aktywność „szlaku prokariotycznego” w niskich temperaturach oraz odwrotnie, poprzez zwiększoną aktywność „szlaku eukariotycznego” w wysokich temperaturach, podczas którego pula powstałego DAG może być transportowana do plastydów i tam wykorzystywana do biosyntezy glikolipidów (Li i in., 2015; Li i in., 2016). Za inne, znane procesy regulujące skład galaktolipidów odpowiedzialne są enzymy AGAP1 (ang. acylated galactolipid-associated phospholipase1) przenoszące kwasy tłuszczowe z MGDG na reszty cukrowe innego MGDG tworząc w ten sposób acylo-MGDG i lyso-MGDG, które jest natychmiast hydrolizowane (Nilsson i in., 2015) oraz białka SFR2 (ang. sensitive to freezing2) wykazujące aktywność transferazy galaktozylowej galaktolipid:galaktolipid prowadzącej do powstania DGDG z cząsteczek MGDG podczas stresu chłodu (Moellering i in., 2010).

1.5. Acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT)

Acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid są enzymami, które występują we wszystkich organizmach żyjących. Uczestniczą w reakcji dołączania grupy acylowej głównie do pozycji *sn*-2 szkieletu glicerolowego lizofosfolipidu, co w efekcie prowadzi do powstania odpowiedniego fosfolipidu (tak jak pokazano na Rys. 6). W ten sposób są one odpowiedzialne bezpośrednio za syntezę pewnej frakcji fosfolipidów, a także włączone są pośrednio w syntezę lipidów zapasowych. Ponadto najprawdopodobniej wykazują istotną rolę w procesie remodelowania lipidów (1.4.2). Za ich istotny udział w tym procesie odpowiada zdolność do przeprowadzania reakcji nie tylko typu „*forward* – do przodu”, ale także „*backward* – do tyłu”, podczas której grupa acylowa jest odłączana od fosfolipidu i dołączana do cząsteczki koenzymu A, wzbogacając w ten sposób cytoplazmatyczną pulę acylo-CoA w nowe, zmodyfikowane kwasy tłuszczowe. W przeciwieństwie do reakcji katalizowanej przez fosfolipazy typu A, które również mogą odłączać cząsteczki acylowe od fosfolipidów, reakcja prowadzona przez enzymy LPLAT jest korzystniejsza energetycznie, ponieważ nie wymaga obecności ATP przy tworzeniu acylo-CoA (Stymne i Stobart, 1984; Lager i in., 2013; Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2016).

Wśród enzymów typu LPLAT można wyróżnić poszczególne ich grupy, których specyficzność jest szczególnie związana z jednym z akceptorów grup acylowych, od którego zależeć będzie ich nazwa. Enzymy, które wykazują największą specyficzność względem lizofosfatydylocholine, będą się nazywać LPCAT, czyli acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina. Odpowiednio, enzymy LPEAT będą wykorzystywały głównie jako akceptor kwasów tłuszczowych lizofosfatydyloetanolaminę, a enzymy LPAAT kwas lizofosfatydowy (Shindou i Shimizu, 2009). Badania przeprowadzone przez Jasieniecka-Gazarkiewicz i in. (2015) wykazały jednak, że enzymy te mimo swoich preferencji względem danego donora mogą również wykorzystywać w mniejszym stopniu inne lizofosfolipidy. Ponadto ich specyficzność substratowa może dotyczyć zarówno donora, jak i akceptora kwasów tłuszczowych oraz może się ona zmieniać w reakcjach typu *forward* ora *reverse* (Lager i in., 2013).



Rys. 6. Schemat reakcji typu „*forward*” oraz „*backward*” katalizowanej przez acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT). P – grupa fosforanowa, ZA – zasada azotowa.

1.5.1. LPCAT – acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydylocholina

Dotychczas najwięcej badań dotyczący enzymów LPLAT zostało przeprowadzonych w celu poznania charakterystyki biochemicznej oraz roli enzymów o aktywności LPCAT. Ich główną funkcją jest synteza puli fosfatydylocholine, która jest uważana za fosfolipid odpowiedzialny za produkcję nietypowych oraz wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które następnie są przenoszone do puli acylo-CoA, z której mogą trafić do innych lipidów. To właśnie na podstawie badań nad tymi enzymami w roku 1984 wykazano możliwość przeprowadzania reakcji typu *backward* przez enzymy LPLAT (Stymne i Stobart). Ponadto inna grupa naukowców w roku 2013 wykazała, że grupy acylowe mogą być wymieniane (w reakcjach typu *backward*) zarówno w pozycji *sn-1*, jak i *sn-2* lizofosfatydylocholine, z tym że wymiana ta jest około 9 razy bardziej

efektywna w stosunku do pozycji sn-2 (Lager i in.). Na podstawie powyżej opisanych właściwości, enzymom tym przypisywana jest znacząca rola w procesie remodelowania.

Liczne badania nad enzymami typu LPCAT wykazały, że wyróżniają się one najwyższą aktywnością spośród wszystkich grup enzymów LPLAT, jednakże ich specyficzność substratowa w reakcjach typu *forward* głównie zawężona jest do 18C nienasyconych kwasów tłuszczowych występujących jako donory grup acylowych. Taka specyficzność substratowa została odnotowana dla LPCATów obecnych w tkankach m. in. soi (*Glycine max* L.), krokosza (*Carthamus tinctorium* L.), lnu (*Linum usitatissimum*), słonecznika (*Helianthus annuus* L.) czy rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*), przy czym właściwość ta została także potwierdzona w systemie drożdżowym po sklonowaniu genów kodujących enzymy LPCAT obecne w słoneczniku, rzodkiewniku oraz krokoszu (Stymne i Glad, 1981; Stymne i Stobart, 1984; Stymne i Stobart, 1985; Ståhl i in., 2008; Lager i in., 2013; Mapelli-Braham i in., 2020). Jako pierwsze, w roku 2008, sklonowane zostały dwa geny (*Atlg63050* i *Atlg12640*) kodujące enzymy o potencjalnej aktywności LPLAT pochodzące z *A. thaliana*. Na podstawie testów enzymatycznych potwierdzono ich aktywność typu LPCAT, a enzymy kodowane przez wyizolowane sekwencje kolejno nazwano LPCAT1 oraz LPCAT2 (Ståhl i in., 2008). Badania dotyczące fizjologicznej roli tych enzymów nie wykazały, aby delekcja genów kodujących LPCAT1 oraz LPCAT2 wpływała na zmiany we wzroście i rozwoju roślin *A. thaliana* (Wang i in., 2012).

1.5.2. LPAAT – acylotransferazy acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy

Drugą grupą acylotransferaz typu acylo-CoA:lizofosfolipid są enzymy LPAAT wykazujące preferencję w stosunku do kwasu lizofosfatydowego. Ich główną rolą jest uczestniczenie w szlaku Kennedy'ego podczas produkcji puli PA (Kennedy, 1961). Spośród wszystkich LPLATów, to właśnie enzymy typu LPAAT zostały jako pierwsze odkryte w komórkach *Escherichia coli* (Rock, 1984). W tkankach roślinnych po raz pierwszy aktywność enzymatyczną typu LPAAT wykazano dla frakcji mikrosomalnej otrzymanej z nasion rącznika pospolitego w roku 1977 (Vick i Beevers). Kolejno aktywność tą opisano dla wielu innych roślin m. in. dla krokosza, rzepaku (*Brassica napus*), perły prerii (*Limnanthes alba*), czy kokosa (*Cocos nucifera*); (Ichihara i in. 1987; Oo i Huang, 1989; Lassner i in., 1995; Knutzon i in., 1995). Powyższe badania wykazały, że enzymy te cechują się bardzo szeroką selektywnością względem donorów grup

acylowych i są charakterystyczne dla danego gatunku. Dla przykładu LPAATy obecne w nasionach perły prerii wykazywały wysoką aktywność w stosunku do kwasu erukowego (22:1), podczas gdy te same enzymy obecne w bielmie kokosa preferowały kwas laurynowy (12:0), natomiast te występujące w nasionach krokosza czy rzepaku selektywnie wybierały kwasy nienasycone 18-węglowe (Ichihara i in. 1987; Lassner i in., 1995; Knutzon i in., 1995). Tak wyspecjalizowana specyficzność substratowa czyni enzymy LPAAT obiektem zainteresowań przy próbach modyfikacji składu kwasów tłuszczowych, uwzględniając ich znaczącą rolę w szlaku syntezy lipidów zapasowych. Z tego też względu sklonowano wiele sekwencji cDNA kodujących enzymy o aktywności LPAAT z takich roślin jak perła prerii, rzepak, migdał (*Prunus dulcis*), palma kokosowa oraz palma olejowa (*Sygarus cocoides*); (Oo i Huang, 1989; Brown i in., 1995; Knutzon i in., 1995; Bourgis i in., 1999). Jednakże dopiero analiza przeprowadzona na podstawie podobieństwa sekwencji do innych organizmów wykonana przez Kim i Huang w 2004 roku wykazała, że w organizmie *A. thaliana* występuje nawet pięć różnych izoform tego enzymu, z czego aktywność typu LPAAT została potwierdzona jedynie dla dwóch: LPAAT2 oraz LPAAT3 (Kim i in., 2005). Na podstawie tych badań wykazano także znaczącą rolę izoformy LPAAT2 w rozwoju nasion; delecja genu kodującego tą izoformę była letalna dla roślin.

1.5.3. LPEAT – acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina

Acylotransferazy typu LPEAT należą do najmniej poznanych enzymów LPLAT. Podobnie jak w przypadku LPAATów rola tych enzymów w procesie remodelowania nie została jeszcze zbadana. Dotychczasowe badania dotyczące LPEATów skupiały się jedynie na poznaniu ich charakterystyki biochemicznej oraz roli fizjologicznej w rozwoju *A. thaliana*. Pierwsze z badań, przeprowadzone dopiero w roku 2009, polegające na sklonowaniu dwóch genów *At1g80950* oraz *At2g45670*, a następnie wprowadzeniu ich do systemu drożdżowego pozwoliły na potwierdzenie możliwości występowania enzymów o aktywności LPEAT u roślin (Stalber i in.). Badania przeprowadzone przez ten szwedzko-amerykański zespół naukowców wykazały, że enzymy te posiadają wysoką specyficzność w stosunku do LPE, jednakże izoforma LPEAT1 również w pewnym stopniu wykorzystywała LPA, jako akceptor kwasów tłuszczowych. Dodatkowo wykazali oni, że oba z enzymów charakteryzują się wysoką selektywnością względem palmitynowej grupy acylowej. Kolejne badania skupiające się na enzymach typu LPEAT

zostały opublikowane dopiero w roku 2017, kiedy to Jasieniecka-Gazarkiewicz i in. podjęli próbę zbadania linii *A. thaliana* posiadających nadekspresję genów kodujących odpowiednio LPEAT1 oraz LPEAT2, a także linii z wyłączoną ekspresją tych genów pojedynczo, a także obu naraz. Wyniki tych badań jasno pokazały, że LPEATy są niezbędne do prawidłowego rozwoju roślin, ponieważ delecja kodujących ich genów prowadziła do redukcji wzrostu zarówno części nadziemnej, jak i podziemnej, zmniejszonego rozmiaru liści oraz do zmniejszenia ilości acylolipidów w liściach oraz nasionach. Natomiast rośliny posiadające nadekspresję tych genów wykazywały odwrotny wzór fenotypu. Kolejne z badań przeprowadzone na tych samych liniach wykazały, że mutanty z obniżoną aktywnością enzymów LPEAT charakteryzują się wydłużoną długością życia, co głównie było manifestowane przez opóźniony proces starzenia i proces kwitnienia. Dla nadekspresorów obserwacje były odwrotne. Ponadto uwzględniając rolę PE, w procesie autofagii, badania te jasno pokazały, że proces ten jest intensywniejszy u roślin posiadających nadekspresję, a u roślin z wyłączoną ekspresją genów kodujących enzymy LPEAT intensywność tego procesu jest zredukowana (Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2021). Na podstawie powyżej wspomnianych badań określono także, że enzymy LPEAT1 lokalizują się głównie w retikulum endoplazmatycznym, natomiast LPEAT2 w strukturach Golgiego oraz późnych endosomach.

1.6. *Camelina sativa* – opis, hodowla oraz właściwości

Camelina sativa, powszechnie znana jako lnicznik pospolity, bądź lnianka oraz rydz jest jadalną rośliną oleistą, której rdzenne pochodzenie przypisuje się rejonom od Finlandii, aż po Rumunię obejmując również tereny wschodniej strony Uralu. Pierwsze wzmianki dotyczące uprawy tej rośliny wskazują na jej wykorzystanie już w epoce Brązu, kiedy nasiona lnicznika najprawdopodobniej były źródłem oleju jadalnego, a także oleju do lamp oraz do użytku medycznego. Jej intensywna uprawa trwała aż do lat 20. XX wieku, szczególnie na terenach Europy oraz Rosji. Niestety dynamiczny rozwój badań nad innymi roślinami oleistymi wpłynął ostatecznie na zredukowanie ilości upraw *C. sativa* na rzecz innych gatunków dających wyższy plon takich jak słonecznik czy rzepak (Zubr, 1997; Zanetti i in., 2021). W Ameryce Północnej po raz pierwszy hodowlę lnicznika rozpoczęto w roku 1863 w Manitoba, w Kanadzie, gdzie roślina ta była uprawiana systematycznie jednak jedynie na małą skalę. Ponowny wzrost

zainteresowania lnicznikiem i początek jego upraw do celów komercyjnych rozpoczął się dopiero pod koniec lat 90. XX wieku (CIFA, Government of Canada, 2017; Ehrensing i Guy, 2008). Również w tym momencie nastąpił dynamiczny rozwój badań nad lnicznikiem pospolitym. Od końca lat 90. co roku średnio ukazywało się 5 publikacji zawierających hasło *Camelina sativa*, a po roku 2015 liczba ta wzrosła do średnio 100 publikacji rocznie. Dotychczas ponad 30% z nich jest wydawana przez Europejskich autorów, w których dominują zespoły naukowe pochodzące z Polski (SCOPUS; Zanetti i in., 2021). Tak intensywny wzrost zainteresowania lnicznikiem wynika z jej istotnych cech agronomicznych, przemysłowych oraz właściwości żywieniowych.

Lnicznik pospolity jest rośliną dwuliścienną z rodziny *Brassicaceae*, należąca do roślin jednorocznych, których wysiew może odbywać się zarówno wiosną, jak i jesienią w zależności od odmiany. *C. sativa* charakteryzuje się znaczną plastycznością morfologiczną w zależności od warunków hodowli, które mogą mieć wpływ na wielkość rośliny oraz liczbę pędów bocznych (Zubr, 1997; Martinelli i Galasso, 2011). Nasiona lnicznika zaczynają kiełkować już po kilku dniach. Po rozwinięciu się pierwszych prawdziwych liści na pierwszym węźle, kolejne liście rozwijają się naprzemiennie na nowo tworzących się węzłach formując ostatecznie rozetę. Liście zwykle przyjmują kształt lancetowaty, bez ogonka, o długości do 8 cm. W momencie rozpoczęcia kwitnienia, liście sukcesywnie zaczynają więdnąć. Lnicznik posiada jedną główną łodygę oraz jej liczne rozgałęzienia, których może być nawet do 30. Wraz z procesem dojrzewania łodyga staje się zdrewniała. Kwiatostan złożony jest z maleńkich bladeżółtych kwiatów posiadających cztery płatki, z których kolejno rozwijają się łuszczyzny zawierające nasiona. Kolor łuszczyzn ulega zmianie wraz z dojrzewaniem nasion rozpoczynając od jasno zielonego poprzez żółto-czerwony, aż do całkowitego wyschnięcia, gdy stają się słomkowo-żółte. Poszczególne łuszczyzny zawierają średnio od 10 do 20 nasion. Cały cykl życiowy lnicznika trwa w granicach 85-100 dni, a jego wysokość ostatecznie oscyluje w granicach od 65 do 110 cm (Putnam i in., 1993; Zubr, 1997; Ehrensing i Guy, 2008; Martinelli i Galasso, 2011). Obecnie dostępnych jest wiele odmian *C. sativa*, a do najbardziej popularnych i wykorzystywanych w uprawie należą: Suneson, Blaine Creek, Celine oraz Calena. Natomiast w badaniach biochemicznych oraz biotechnologicznych szczególne zainteresowanie wzbudzają odmiany: Celine, DH55 oraz Suneson (Malik i in., 2018; Ehrensing i Guy, 2008). Etapy rozwoju części nadziemnej oraz wyznaczone na potrzeby pracy badawczej stadia rozwojowe nasion testowanej odmiany Suneson przedstawiono na poniższych zdjęciach (Rys. 7).

Krótki cykl rozwojowy lnicznika jest istotną cechą agronomiczną. Równie ważną cechą jest zawartość oleju, która stanowi średnio 38-43% oraz ilość białek wynosząca 27-32%, całkowitej masy nasion. Ponadto wydajność pozyskania oleju z lnicznika jest na poziomie porównywalnym do innych powszechnie uprawianych odmian roślin oleistych takich jak *Brassica juncea* oraz *Brassica napa* i wynosi od 400 do 850 kg/ha (Putnam i in., 1993; Blackshaw i in., 2011). Pod wpływem niekorzystnych warunków środowiskowych takich jak susza plon lnicznika przewyższa znacząco plon otrzymywany z uprawy *B. juncea* oraz *Brassica carinata* (Enjalbert i in., 2013). Lnicznik charakteryzuje się również wysoką odpornością na kluczowe czynniki biotyczne oraz abiotyczne, które mogą zaburzać poprawny rozwój roślin uprawnych. Roślina ta może być hodowana w niskich temperaturach bez znaczącego wpływu na plon oraz w warunkach przejściowych niedoborów wody (Putnam i in., 1993; Ehrensing and Guy, 2008). Ponadto może być ona uprawiana na glebach marginalnych z niską zawartością fosforu oraz azotu, co jest niezwykle ważną właściwością dającą możliwość wykorzystania *C. sativa* do systemu płodozmianu lub uprawy na terenach nienadających się do hodowli innych roślin przeznaczony do konsumpcji (Bansal i Durrett, 2016).

Lnicznik wykazuje naturalną odporność na insekty takie jak: pchełki ziemne (*Phyllotreta cruciferae*) oraz wołki (*Centorhynchus obstrictus*). Uprawy lnicznika są również odporne na groźne, dla powszechnie uprawianego rzepaku, fitomykozy takie jak czerń krzyżowych wywoływana przez *Alternaria brassicae* oraz suchą zgniliznę kapustnych powodowaną przez grzyb *Leptosphaeria maculans* (Conn i in., 1988; Sharma i in., 2002; Li i in., 2005). Niektóre z genotypów *C. sativa* są dodatkowo odporne na zgniliznę twardzikową (*Sclerotinia sclerotiorum*), mączniaka rzekomego (*Peronospora parasitica*) oraz brązową zgniliznę korzeni (Séguin-Swartz i in., 2009).

Ze względu na powyżej wymienione właściwości, uprawa lnicznika raczej nie wymaga wykorzystywania pestycydów, co wynika z jego odporności na typowe patogeny infekujące uprawy roślin oleistych. Nie wymaga także stosowania herbicydów prawdopodobnie ze względu na zdolność do produkcji substancji allelopatycznych hamujących wzrost innych roślin oraz chwastów (Lovett i Jackson, 1980; Ehrensing i Guy, 2008). Jednakże, badania z roku 2006, przeprowadzone przez Saucke i Ackermann podważają występowanie zjawiska allelopatii w stosunku do niektórych gatunków roślin. W przypadku nawozów sugeruje się, że ich stosowanie jest zbędne, jednakże zależy ono przede wszystkim od poziomu składników odżywczych w glebie. Dodatkowa suplementacja już niewielkich ilości głównie nawozów azotowych, siarkowych oraz

fosforanowych, zwiększa produkcję lipidów zapasowych przez te rośliny (Zubr, 1997; Ehrensing i Guy, 2008; Wysocki i in., 2013).

Szczególnie ważną cechą umożliwiającą wykorzystanie oleju z nasion lnianki (olej rydzowy) do celów przemysłowych oraz konsumpcyjnych jest wysoka zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które mogą stanowić około 50% wszystkich kwasów tłuszczowych (Rodríguez-Rodríguez i in., 2013; Marmon i in., 2017). Dominującym kwasem tłuszczowym występującym w nasionach lnianki jest kwas linolenowy (18:3) należący do kwasów omega-3, którego zawartość może wynosić nawet do 40% wszystkich kwasów tłuszczowych. Drugim najobficiej występującym kwasem jest kwas linolowy (18:2, omega-6) należący również do puli kwasów PUFA. Oba związki są niezwykle ważne i pożądane w diecie ludzkiej ze względu na ich znaczący udział biosyntezie długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów nienasyconych (LC-PUFA, ang. long chain polyunsaturated fatty acid), które wpływają na redukcję ryzyka wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy typu 2, stanów zapalnych, czy nawet rozwoju nowotworu (Calder, 2015; Zárate i in., 2017). Olej rydzowy posiada bezpieczną dla organizmu ludzkiego zawartość kwasu erukowego (poniżej 5% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych) oraz niską zawartość glukozylianów (Zubr, 1997; Ehrensing i Guy, 2008; Rodríguez-Rodríguez i in., 2013). Ponadto olej z nasion lnianki ma wysoką zawartość antyoksydantów w postaci α -tokoferolu, czyli witaminy E, która pełni nie tylko istotną rolę w prewencji chorób przewlekłych oraz serca, ale również wpływa na zwiększoną trwałość i stabilność oleju rydzowego w porównaniu do innych olei zawierających kwasy omega-3 (Brigelius-Flohé i Traber, 1999; Abramovič i in., 2007). Nasiona lnianki są także bogatym źródłem witamin z grupy B (Zubr, 2010).

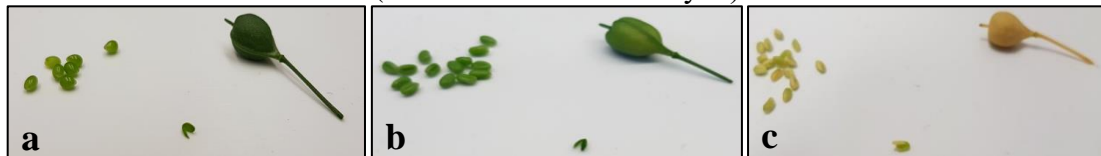
Niestety, pomimo unikatowych właściwości spożywczych produkowanego oleju, *C. sativa* w celach konsumpcyjnych wciąż jest hodowana na małą skalę. Jednakże jej olej znajduje szerokie zastosowanie przy produkcji biopaliw zarówno samochodowych, jak i samolotowych, produkcji chemikaliów takich jak żywice, kleje, farby czy kosmetyki, a pozostałości po ekstrakcji oleju (makuchy) znajdują zastosowanie jako źródło paszy dla krów, kurczaków czy akwakultur (Berti i in., 2016; Zanetti i in., 2021). Produkcja estrów metylowych z kwasów tłuszczowych obecnych w oleju nasion lnianki jest tak samo wydajna jak produkcja tych związków z oleju nasion rzepaku. Jednakże biorąc pod uwagę możliwość hodowli lnianki na obszarach marginalnych oraz możliwość redukcji produkcji, w procesie spalania, dwutlenku węgla o ponad 50% oraz innych toksycznych gazów takich jak tlenki azotu w porównaniu do paliw kopalnianych, olej rydzowy staje

się świetnym źródłem bio-oleju napędowego (Bernardo i in., 2003; Lebedevas i in., 2012). Istotnym aspektem jest również wykorzystanie pozostałych części roślin, które mogą służyć jako źródło karmy dla zwierząt, a zdrewniałe łodygi mogą służyć do produkcji miotel (Campbell, 2018).

Stadia rozwojowe roślin *Camelina sativa*



Stadia rozwojowe nasion *Camelina sativa* (nasiona-zarodek-łuszczyzna)



Rys. 7. Różne stadia rozwojowe części nadziemnej oraz nasion *Camelina sativa*.

A – rozwój hipokotylu oraz liścieni (2 dni od wysiania); **B-D** – rozwój liści prawdziwych (odpowiednio 9, 14 oraz 21 dni od wysiania); **E** – pąk kwiatowy 0 DAF (około 35 dni od wysiania); **F-G** – pąk kwiatowy wraz z rozwijającymi się kwiatami; **H** – rozwijające się łuszczyzny; **I** – dojrzałe, wysuszone łuszczyzny. **a** – I stadium rozwojowe nasion (17-19 DAF); **b** – II stadium rozwojowe nasion (24-16 DAF); **c** – III stadium rozwojowe nasion (31-33 DAF).

1.6.1. Wykorzystanie *Camelina sativa* w badaniach naukowych

Ze względu na szerokie spektrum zastosowania lnicznika w różnych gałęziach przemysłu, od początku XX wieku wzrosło również zainteresowanie tą rośliną w badań skupiających się nie tylko na jej poznaniu, ale i również podjęto wiele prób modyfikacji genetycznych lnicznika, tak aby uzyskać cechy zwiększające jego wartość przemysłową. Poza licznymi badaniami określającymi wymagania środowiskowe oraz właściwości nasion lnicznika, pierwszym kluczowym doniesieniem, z punktu widzenia biotechnologii, było opracowanie wydajnej metody transformacji lnicznika. Metoda ta opiera się na podstawowym sposobie transformacji techniką „floral dip”, opracowaną dla *A. thaliana*, przy czym dodatkowo jest ona wspomagana zastosowaniem próżni (Lu i Kang, 2008). Kolejne istotne badanie przeprowadzone przez Yemests i in. w roku 2013 pozwoliło na określenie odpowiednich parametrów takich jak ilość sacharozy, składników odżywczych oraz fitohormonów stosowanych do hodowli *in vitro* transformowanych roślin oraz eksplantatów. Znaczący wpływ na dalszy rozwój badań biotechnologicznych miało zsekwencjonowanie genomu *C. sativa* DH55 oraz wykonanie badań transkryptomu nasion (Nguyen i in., 2013; Kagale i in., 2014). Na ich podstawie utworzone zostały bazy danych genomowych (<http://www.camelinadb.ca>) oraz danych transkryptomocnych (<http://www.camelinagenome.org>). W powyższych badaniach wykazano również ponad 90% podobieństwo genów zaangażowanych w metabolizm lipidów oraz 80% podobieństwo transkryptomu *C. sativa* z *A. thaliana*. Ostatni rozwój badań nad techniką CRISPR/Cas9, wykorzystywaną do stabilnych modyfikacji genomu, również wpłynął na rozwój algorytmów takich jak CRISPOR (<http://crispore.tefor.net>) oraz Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder>) umożliwiających wyszukiwanie i projektowanie sekwencji gRNA, rozpoznawanych przez białko Cas9, czyli miejsc gdzie ma zostać wprowadzona pożądana zmiana (Bae i in., 2014; Haeussler i in., 2016). Głównym wyzwaniem podczas wprowadzania zmian do genomu lnicznika jest jego heksaploidalna struktura, jednakże badania wykazały znaczące podobieństwo zarówno genomiczne jak i transkryptomocne wszystkich trzech subgenomów (Nguyen i in., 2013; Kagale i in., 2014). Tak złożona struktura genomowa *C. sativa* ($n = 20, N^6N^7H$) została stworzona w wyniku hybrydyzacji powstałej uprzednio auto-allotetraploidalnej *Camelina neglecta* ($n = 13, N^6N^7$) z *Camelina hispida* ($n = 7, H$); (Mandáková i in., 2019). Zgromadzona dotychczas wiedza wraz z dostępnymi bazami danych oraz cechami lnicznika takim jak niskie wymagania glebowe, wielkość nasion

oraz możliwość realnego wykorzystania w przemyśle sprawia, że z sukces może być on rośliną modelową wykorzystywaną do badań nad metabolizmem lipidów.

Dotychczas podjęto wiele prób, które miały na celu między innymi modyfikację zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych, zwiększenie ilości produkowanych nasion oraz oleju, a także produkcję terpenów i wosków w tkankach *C. sativa* (Malik i in., 2018). Po raz pierwszy wyniki dotyczące modyfikacji genetycznej lnicznika zostały opublikowane w roku 2011 przez amerykański zespół, który poprzez wykorzystanie oligonukleotydów antysensownych do sekwencji kodującej FAD2 doprowadził do powstania odmiany *C. sativa* produkującej zwiększoną zawartość kwasu oleinowego, a zmniejszoną ilość PUFA, co wpłynęło na wzrost stabilności oksydacyjnej oleju (Kang i in., 2011). W kolejnych latach nastąpił dynamiczny wzrost ilości doniesień naukowych dotyczących modyfikacji genetycznych lnicznika pospolitego. Jednym z największych osiągnięć było zmodyfikowanie tej rośliny, tak aby jej nasiona zawierały wysoką zawartość kwasów omega-3: DHA (kwas dokozaheksaenowy) oraz EPA (kwas eikozapentaenowy), odpowiednio wynoszących 14% i 12% wszystkich kwasów tłuszczowych, czyli na poziomie porównywalnym do ilości tych związków znajdujących się w tłuszczu ryb morskich (Ruiz-Lopez i in., 2014). Obecnie, utworzona wówczas linia *C. sativa* poddawana jest licznym testom polowym, co daje ogromną nadzieję na możliwość wykorzystania tej odmiany na większą skalę i zminimalizowanie ekspansywnej hodowli akwakultur (Han i in., 2020). Innym przykładem modyfikacji lnicznika w celu zwiększenia jego przydatności przemysłowej było otrzymanie odmian produkujących kwasy omega-7, do których należy kwas oleopalmitynowy (16:1 Δ^9) oraz kwas wakcenowy (18:1 Δ^{11}), które są pożądane przy produkcji biopaliw ze względu na ich podwyższoną stabilność oksydacyjną, zredukowaną emisję tlenków azotu oraz efektywniejszy udział w procesie zapłonu (Durrett i in., 2008; Nguyen i in., 2015; Rodríguez-Rodríguez i in., 2021). Inny zespół naukowców uzyskał transgeniczną *C. sativa* zdolną do produkcji „nietypowych” kwasów tłuszczowych takich jak kwas rycynolowy oraz kwas leskerolowy. Synteza tych związków była możliwa dzięki wprowadzeniu genu kodującego hydroksylazę oraz genu kodującego elongazę wydłużającą kwasy hydroksylowe (Snapp i in., 2014). Poza modyfikacjami dotyczącymi wartości użytkowej olejów, stworzono odmianę lnicznika produkującą w nasionach nawet do 14% biopolimeru – PHB (polihydroksymaślan). Modyfikacja ta była możliwa poprzez wprowadzenie do genomu lnicznika trzech genów kodujących enzymy odpowiedzialnie za ten proces w komórkach bakteryjnych (Malik i in., 2015). Podjęto

również badania prowadzące do uzyskania odmian produkujących zwiększoną ilość wosków w nasionach lnicznika (Iven i in., 2016; Ruiz-Lopez i in., 2016). Po roku 2014, w którym Doudna i Charpaentier opublikowały badania dotyczące systemu edycji genomu CRISPR/Cas9, znacząco rozwinęły się badania na roślinami transgenicznymi, w tym lnicznika, przy wykorzystaniu tej techniki. Szczególnie ważnymi badaniami były doświadczenia przeprowadzone przez Morineau i in. (2017), które wykazały, że efektywność tej metody jest silnie skorelowana z tym w ilu subgenomach *C. sativa* dojdzie do modyfikacji wybranego genu. Naukowcy ci, wykazali, że w przypadku wyłączenia genu kodującego desaturazę FAD2 możliwe jest otrzymanie nasion o zawartości kwasu oleinowego w zakresie od 10% do nawet 62%, w zależności od tego czy utworzony został pojedynczy, podwójny, czy potrójny mutant, co odpowiednio tyczy się mutacji genów na poszczególnych subgenomach.

2. MATERIAŁY

2.1. Szczepy *Escherichia coli* oraz *Saccharomyces cerevisiae*

W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy wykorzystywane były komórki kompetentne *Escherichia coli* DH5 α , które służyły do namnażania oraz długotrwałego przechowywania pustych plazmidów oraz plazmidów posiadających badane sekwencje genowe.

Do określenia charakterystyki biochemicznej enzymów, kodowanych przez sekwencje znajdujące się na badanych plazmidach, wykorzystany został szczep *Saccharomyces cerevisiae* Δ ALE1. Białko Ale1 w komórkach drożdżowych wykazuje aktywność acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid specyficznej względem LPC oraz LPE (Stahl i in., 2008). Jako szczep referencyjny, który użyto do syntezy radioaktywnych standardów: [14 C]PC, [14 C]PE oraz [14 C]PA wykorzystano szczep dziki BY4742.

Tabela 2. Szczepy bakterii oraz drożdży wykorzystanych w przedstawionych badaniach.

Szczep <i>E. coli</i>	Genotyp
DH5 α	F $^-$ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK $^-$, mK $^+$) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1
Szczep <i>S. cerevisiae</i>	Genotyp
BY4742 [wild type]	BY4742; MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0
Δ ALE1 [BY4742 Δ ALE1]	BY4742; MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0; YOR175c::kanMX

2.2. *Camelina sativa* (lnicznik pospolity)

Do badań wykorzystano rośliny *C. sativa* odmiany Suneson (Montana 0305), która została opracowana przez Duane L. Johnson, a następnie udostępniona do użytku przez Montana State University w 2007 roku. Odmiana ta charakteryzuje się przeciętną wydajnością, jednak jej nasiona zawierają średnio o 2-3% więcej oleju od pozostałych

odmian *C. sativa*. Ponadto charakteryzuje się ona najwyższą zawartością kwasu linolenowego (18:3).

W badaniach przedstawionych w pracy wykorzystano nasiona lnicznika, wskazanej odmiany, otrzymane od prof. Edgara B. Cahoon (The University of Nebraska-Lincoln, USA).

2.3. Plazmidowe wektory ekspresyjne

W pracy wykorzystane zostały dwa plazmidy, które były użyte do wprowadzenia sklonowanych sekwencji systemem Gateway kolejno do plazmidu pDONR221, a następnie do pYES-DEST52. Oba plazmidy zostały zakupione od firmy Thermo Fisher Scientific.

Wektor pDONR221 to wektor o wielkości 4,7 kb posiadający gen oporności na kanamycynę. Wykorzystywany jest do reakcji rekombinacji BP, pozwalającej na wprowadzenie sklonowanej sekwencji, produktu PCR do wektora. Plazmid wraz ze wstawioną pożądaną sekwencją może być namnażany w komórkach *E. coli* DH5a.

Wektor pYES-DEST52 to wektor wahadłowy o wielkości 7,6 kb, którego gospodarzem może być zarówno w *E. coli*, jak i *S. cerevisiae*. Zawiera on promotor *GAL1* (promotor galaktozowy) do kontroli ekspresji genów oraz marker selekcyjny *URA3* (gen syntezy uracylu) niezbędny do utrzymania plazmidów w komórkach drożdżowych. Dodatkowo niesie on gen oporności na ampicylinę co umożliwia jego selekcję w komórkach bakteryjnych.

2.4. Startery do amplifikacji genów kodujących *CsLPEAT1* oraz *CsLPEAT2*

Sekwencje starterów zostały zaprojektowane przy pomocy programu OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies), a następnie syntetyzowane na zamówienie przez Serwis Sekwencjonowania i Syntezy DNA IBB PAN. Otrzymane rozwoły oligonukleotydów o stężeniu 100 μ M przed wykorzystaniem w reakcjach PCR były rozcieńczane do stężenia roboczego – 5 μ M.

W tabeli 3 przedstawione zostały sekwencje wykorzystane do amplifikacji transkryptów *CsLPEAT1* oraz *CsLPEAT2*. Obie pary starterów posiadały dodatkowo dołączone sekwencje attB1 (dla starterów *forward* – przednich) oraz attB2 (dla starterów *reverse* – wstecznych), które są niezbędne do przeprowadzenia klonowania przy

wykorzystaniu systemu Gateway. Do poszukiwania wariantów *LPEAT1* oraz *LPEAT2* wykorzystane zostały tylko pojedyncze pary starterów ze względu na bardzo wysokie podobieństwo sekwencji ich wariantów. Efektywność wyszukania innych wariantów była kolejno sprawdzana poprzez sekwencjonowanie sklonowanych sekwencji przez firmę Eurofins Genetics.

W tabeli 4 znajduje się wykaz sekwencji starterów wykorzystanych do ilościowej reakcji polimerazy DNA (qPCR). Jako geny referencyjne do normalizacji poziomu ekspresji badanych wariantów *LPEAT* wykorzystane zostały geny kodujące β -aktynę (*ACT2*) oraz aktywator fosfatazy typu 2A (*TIP41*).

Tabela 3. Startery wykorzystane do reakcji PCR w celu amplifikacji genów kodujących *CsLPEAT*, które następnie zostały wprowadzone do plazmidu pDONR221 przy wykorzystaniu systemu Gateway. Fragmenty starterów, które zostały podkreślone to sekwencje attB1 oraz attB2, odpowiednio dołączone do starterów przednich, oznaczonych na końcu literą F oraz wstecznych oznaczonych literą R.

Nazwa startera	Sekwencja nukleotydowa (orientacja zapisanej sekwencji: 5' – 3')	Temperatura przyłączenia startera
<i>CsLPEAT1.F</i>	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGT</u> GTTTACCTTTTACGGCGAATCTA	61,9 °C
<i>CsLPEAT1.R</i>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTC</u> GTGTAATCAAACATTTGGCTTTT	61,6 °C
<i>CsLPEAT2.F</i>	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAC</u> ATTCGACCACAAAGCAAAAAGGC	58,1 °C
<i>CsLPEAT2.R</i>	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAA</u> AGTTTGCTCAGAACTAGAGG	58,9 °C

Tabela 4. Startery wykorzystane do reakcji qPCR. Startery przednie oznaczono na końcu literą F, a startery wsteczne literą R. Oznaczenia literowe a, b oraz c określają inny wariant *LPEAT1* lub *LPEAT2* występujący na innym subgenomie.

Nazwa startera	Sekwencja referencyjna	Sekwencja nukleotydowa (orientacja zapisanej sekwencji 5' – 3')	Temperatura przyłączenia startera
CsACT2.F	XM_010489499.1	ACAATTTCCCGCTCTGCTGTTGTG	60,2 °C
CsACT2.R	XM_010489499.1	AGGGTTTCTCTCTTCCACATGCCA	60,3 °C
CsTIP41.F	XM_019233743.1	TTGGCGAGAATGCATTAGTCCTT	56,8 °C
CsTIP41.R	XM_019233743.1	ATTGTCCGCCAGTTCATCTTCATA	56,4 °C
CsLPEAT1a.F	XM_010431575.2	GACGACGACGACGAGAAA	54,4 °C
CsLPEAT1a.R	XM_010431575.2	TAAATGAAAGAAAGGGCTTCAG	51 °C
CsLPEAT1b.F	XM_010419341.2	AAAGCTGAAATCTTCACGG	50,6 °C
CsLPEAT1b.R	XM_010419341.2	CAAAGAAAGAAAGGGGCTT	50,6 °C
CsLPEAT1c.F	XM_010474544.2	CTAGAGACGACGAGGAGGAG	55,6 °C
CsLPEAT1c.R	XM_010474544.2	CTCTGATTCCATTGTTCTTCTTCTA	52,5 °C
CsLPEAT2a.F	XM_010519887.1	AAGCAAAAAGGCTGTGTCAATC	54,5 °C
CsLPEAT2a.R	XM_010519887.1	TTCTGGTTGATCGACGGATGG	57 °C
CsLPEAT2b.F	XM_010509827.2	TGATCCATCATCAACCAGAG	51,7 °C
CsLPEAT2b.R	XM_010509827.2	AAGAACAGGAGGCTCTGT	53 °C
CsLPEAT2c.F	XM_010508235.2	AGCAAAAAGGCTGTGAGTAC	53,1 °C
CsLPEAT2c.R	XM_010508235.2	TGGATGATTGATGATGGATCAAC	53 °C

2.5. Sekwencje wykorzystane do analizy filogenetycznej oraz uliniowania sekwencji aminokwasowych wariantów izoform CsLPEAT1 oraz CsLPEAT2

Sklonowane sekwencje zostały poddane analizie filogenetycznej oraz zostały uliniowane wraz z sekwencją referencyjną. Jako sekwencje referencyjne wykorzystano sekwencje aminokwasowe kodujące białka o aktywności odpowiednio LPEAT1 oraz LPEAT2 występujące w *A. thaliana*. Do przeprowadzenia obu analiz wykorzystano sekwencje aminokwasowe, które zostały określone dla sklonowanych sekwencji

genowych przy wykorzystaniu programu MEGA X. Do konstrukcji drzewa filogenetycznego wykorzystano sekwencje aminokwasowe kodujące LPEAT1 oraz LPEAT2 znajdujące się w innych pokrewnych organizmach roślinnych takich jak: *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, *Capsella rubella*, *Eutrema salsugineum*, oraz *Raphanus sativus*. Ich sekwencje aminokwasowe zostały pobrane z baz danych NCBI (numery referencyjne wykorzystanych sekwencji podane zostały w tabeli 5).

Tabela 5. Lista sekwencji referencyjnych wykorzystana do analizy porównawczej oraz filogenetycznej.

Oznaczenie genu	Sekwencja referencyjna	Gatunek pochodzenia
CsLPEAT1b	XM_010419341.2	<i>Camelina sativa</i>
CsLPEAT1c	XM_010474544.2	<i>Camelina sativa</i>
AtLPEAT1	AT1G80950.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AlLPEAT1	XP_020889625.1	<i>Arabidopsis lyrata</i>
BnLPEAT1.1	XP_013702411.1	<i>Brassica napus</i>
BnLPEAT1.2	XP_013648598.1	<i>Brassica napus</i>
BoLPEAT1	XP_013591940.1	<i>Brassica oleracea</i>
BrLPEAT1	XP_009104503.2	<i>Brassica rapa</i>
EsLPEAT1	XP_006389853.1	<i>Eutrema salsugineum</i>
RsLPEAT1	XP_018457802.1	<i>Raphanus sativus</i>
AtLPEAT2	AT2G45670.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AlLPEAT2	XP_002882025.1	<i>Arabidopsis lyrata</i>
BnLPEAT2.1	XP_013734815.1	<i>Brassica napus</i>
BnLPEAT2.2	XP_022571765.1	<i>Brassica napus</i>
BoLPEAT2	XP_013631253.1	<i>Brassica oleracea</i>
BrLPEAT2	XP_009133738.1	<i>Brassica rapa</i>
EsLPEAT2	XP_006397746.1	<i>Eutrema salsugineum</i>
RsLPEAT2	XP_018484721.1	<i>Raphanus sativus</i>

2.6. Podłoża hodowlane

▪ Podłoża stosowane do hodowli *E. coli* DH5a

- **LA** – Luria-Bretani Agar, pH 7,5 [g/l H₂O destylowanej]
LB Broth 20g Sigma-Aldrich
Agar 20g Sigma-Aldrich
- **LB** – Luria-Bretani Broth, pH 7,5 [g/l H₂O destylowanej]
LB Broth 20g Sigma-Aldrich

W celu przeprowadzenia selekcji bakterii niosących określone plazmidy po transformacji wykorzystane zostały odpowiednie antybiotyki w zależności od genu oporności, który znajdował się na plazmidzie. W przypadku bakterii niosących plazmid pDONR221 do selekcji wykorzystano kanamycynę o stężeniu wyjściowym 25 mg/l. Do selekcji bakterii zawierających plazmid pYES-DEST52 użyto ampicyliny o stężeniu wyjściowym 50 mg/l. Oba antybiotyki w formie sypkiej były zakupione w firmie MP Biomedicals. Przed wykorzystaniem ich w analizach rozpuszczono je w wodzie, a następnie sterylizowano poprzez filtrowanie filtrem strzykawkom o porowatości 0,22 μm. Przelfiltrowane antybiotyki dodawano do pożywek, tak aby uzyskać końcowe stężenie wynoszące odpowiednio 25 μg/ml oraz 50 μg/ml dla kanamycyny oraz ampicyliny.

▪ Podłoża stosowane do hodowli *S. cerevisiae* BY4742

- **YPD** – Yeast extract Peptone Dextrose Agar, pH 6,5 [g/l H₂O destylowanej]
YPD Broth 50 g Sigma-Aldrich
Agar 20 g Sigma-Aldrich
- **YPD** – Yeast extract Peptone Dextrose Broth, pH 6,5 [g/l H₂O destylowanej]
YPD Broth 50 g Sigma-Aldrich

- **Podłoża stosowane do hodowli *S. cerevisiae* $\Delta ALE1$**
 - **SD-URA – Synthetic Defined Agar [g/l H₂O destylowanej]**

Yeast Nitrogen Base (bez aminokwasów)	6,7 g	Sigma-Aldrich
Galaktoza/Glukoza/Rafinoza	20 g	Sigma-Aldrich
CSM-URA	0,775 g	MP Biomedicals
Agar	20 g	Sigma-Aldrich
 - **SD-URA – Synthetic Defined Broth [g/l H₂O destylowanej]**

Yeast Nitrogen Base (bez aminokwasów)	6,7 g	Sigma-Aldrich
Galaktoza/Glukoza/Rafinoza	20 g	Sigma-Aldrich
CSM-URA	0,775 g	MP Biomedicals
- **Podłoże stosowane do hodowli *in vitro* *C. sativa***
 - **½ MS – Murashige-Skoog Agar [g/l H₂O destylowanej]**

MS (z witaminami)	2,203 g	Sigma-Aldrich
Sacharoza	20 g	Sigma-Aldrich
Agar	8 g	Sigma-Aldrich
 - **½ MS – Murashige-Skoog Broth [g/l H₂O destylowanej]**

MS (z witaminami)	2,203 g	Sigma-Aldrich
Sacharoza	20 g	Sigma-Aldrich

2.7. Wykorzystane w badaniach odczynniki

I. Odczynniki do izolacji RNA, syntezy cDNA, reakcji PCR oraz qRT-PCR

Gotowy zestaw do izolacji RNA GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit	EURx
99% β -merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
99% Etanol	Merck

II. Odczynniki do przepisania matrycy RNA na cDNA

<i>dsDNaza</i>	Thermo Fisher Scientific
Gotowy zestaw do przepisania matrycy RNA na cDNA – Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit:	
<ul style="list-style-type: none">▪ Maxima H Minus Enzym▪ 5x Bufor RT (250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT)▪ Oligo(dT)₁₈	Thermo Fisher Scientific
10 mM roztwór dNTPs	Eurofins Genetics

III. Odczynniki do reakcji PCR

Gotowy zestaw do reakcji PCR wraz z polimerazą Pfu – Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase:	
<ul style="list-style-type: none">▪ 2 U/ul Polimeraza <i>Pfu</i>▪ 5x Bufor Phusion HF▪ 2 mM roztwór dNTPs▪ 5 μM roztwory starterów▪ DMSO	Thermo Fisher Scientific
5 μM roztwory starterów	Eurofins Genetics
Gotowy zestaw do oczyszczania produktów po reakcji PCR – GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific

IV. Odczynniki do reakcji qPCR

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix [2 U/ul]	Thermo Fisher Scientific
10 μM roztwory starterów	Eurofins Genetics

V. Odczynniki do elektroforezy agarozowej

Agaroza [1g/100 ml buforu TAE]	Prona
10x Bufor TAE	Sigma-Aldrich
10000x GelRed	GeneON
6x Bufor obciążający Loading Dye Solution	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus:	
▪ 1 ul GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus	Thermo Fisher Scientific
▪ 1 ul Loading Dye Solution	
▪ 4 ul dH ₂ O	
Gotowy zestaw do elucji fragmentów DNA z żelu: GeneJET Gel Extraction and DNA CleanUp Kit	Thermo Fisher Scientific

VI. Odczynniki do transformacji bakterii

Gateway BP Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	Thermo Fisher Scientific
Bufor TE pH 8,0:	
▪ 10 mM Tris-HCl pH 8,0	MP Biomedicals
▪ 0,1 mM EDTA pH 8,0	Sigma-Aldrich
Gotowy zestaw do izolacji plazmidów z komórek bakteryjnych – GeneJET Plasmid Mini Prep Kit	Thermo Fisher Scientific

VII. Odczynniki do transformacji drożdży

Roztwór PEG do transformacji drożdży:	
▪ 100 mM Octan litu	Sigma-Aldrich
▪ 40% PEG 3350	Sigma-Aldrich
▪ 10 mM Tris-HCl pH 7,5	MP Biomedicals

▪ 1 mM EDTA pH 7,5	Sigma-Aldrich
10 mg/ml DNA ze spermy łośosia	Life Technologies

VIII. Odczynniki do ekstrakcji lipidów oraz chromatografii cienkowarstwowej i gazowej

Chloroform	Merck
Eter dietylowy	Merck
Heksan do analizy	Merck
Heksan do chromatografii gazowej	Merck
Kwas octowy lodowaty	Merck
Metanol	Merck
Mieszanina metylacyjna (1000 cm ³)	
▪ Metanol suszony SeccoSolv®	980 ml Sigma-Aldrich
▪ Kwas siarkowy (99,999%)	20 ml Merck
0,05% roztwór prymuliny	
▪ prymulina	Sigma-Aldrich
▪ aceton	Merck
Płytki Silica Gel 60	Merck
Standardy fosfolipidów oraz lipidów neutralnych	Sigma-Aldrich/Avanti Polar Lipids
Standard wewnętrzny do chromatografii gazowej – ester metylowy kwasu heptadekanowego (17:0Me)	Sigma-Aldrich
Wzorce kwasów tłuszczowych	Larodan

IX. Odczynniki do przeprowadzenia reakcji cięcia fosfolipazą A₂

Fosfolipaza A ₂ z jadu pszczoły (<i>Apis mellifera</i>)	Sigma-Aldrich
Bufor do reakcji cięcia fosfolipazą A:	MP Biomedicals

▪ 0,1 M Tris-HCl pH 8,9	Sigma-Aldrich
▪ 5 mM MgCl ₂	
Eter dietylowy	Merck
Kwas octowy lodowaty	Merck

X. Odczynniki do izolacji frakcji mikrosomalnej tkanek roślinnych oraz drożdży

Bufor do homogenizacji tkanek roślinnych:

▪ 0,33 M Sacharoza	Sigma-Aldrich
▪ BSA (ang. bovine serum albumin) – [1 mg/ml]	Sigma-Aldrich
▪ Katalaza [1000 U/cm ³]	Sigma-Aldrich
▪ 0,1 M bufor fosforanowy pH 7,2	Sigma-Aldrich

Bufor do homogenizacji drożdży:

▪ 10 mM MgCl ₂	Sigma-Aldrich
▪ 1 mM EDTA	Sigma-Aldrich
▪ 0,3 M Siarczek amonu	Sigma-Aldrich
▪ 5% Glicerol	Sigma-Aldrich
▪ 20 mM Tris-HCl pH 7,2	MP Biomedicals

0,1 M bufor fosforanowy pH 7,2

Sigma-Aldrich

Inhibitory proteaz (Protease Inhibitor Cocktail
Tablets)

Roche

XI. Odczynniki do syntezy [¹⁴C]acylo-CoA oraz acylo-CoA

Benzen	Merck
Chloromrówczan etylu	Merck
Dichlorometan	Merck
Etyloamina	Merck
Eter dietylowy	Merck

Koenzym A (CoA Lithium Salt)	Sigma-Aldrich
Tetrahydrofuran	Merck
0,1M HCl	POCH
1 M HCl	POCH
1 M KHCO ₃	Sigma-Aldrich
Kwasy tłuszczowe: kwas palmitynowy, kwas stearynowy, kwas oleinowy, kwas linolowy, kwas linolenowy	Merck/ Larodan
Znakowane [¹⁴ C] kwasy tłuszczowe: kwas kaprynowy, kwas laurynowy, kwas mirystynowy, kwas palmitynowy, kwas stearynowy, kwas oleinowy, kwas linolowy, kwas linolenowy, kwas arachidowy, kwas gondolowy, kwas erukowy	Perkin Elmer/ American Radiolabeled Chemicals

XII. Odczynniki do reakcji enzymatycznych *in vitro*

[¹⁴ C]Acylo-CoA	przygotowane w laboratorium
Acylo-CoA	przygotowane w laboratorium
BSA (ang. bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich
DTNB (kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy))	Sigma-Aldrich
Koenzym A (CoA Lithium Salt)	Sigma-Aldrich
Lizofosfolipidy	Avanti Polar Lipids/ Sigma-Aldrich
Eterowe analogi lizofosfolipidów	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	Sigma-Aldrich
KCl	Sigma-Aldrich

0,1 M bufor fosforanowy pH 5,5 – 8,0	Sigma-Aldrich
0,1 M Tris-HCl pH 8,0 – 10,0	MP Biomedicals
0,1 M bufor NaHCO ₃ -NaOH pH 10,0 – 11,0	Sigma-Aldrich
0,1 M bufor Na ₂ HPO ₄ -NaOH pH 11,0 – 12,0	Sigma-Aldrich

Znakowane izotopowo węglem [¹⁴C] acylo-CoA zostały syntetyzowane w laboratorium metodą opisaną w punkcie 3.17.3. W poniższej tabeli wymienione zostały wszystkie nieradioaktywne i radioaktywne acylo-CoA oraz lizolipidy, które zostały wykorzystane w prowadzonych badaniach.

Tabela 6. Acylo-CoA oraz lizofosfolipidy stosowane w przeprowadzonych badaniach.

[¹⁴C]Acylo-CoA	[1- ¹⁴ C]10:0-CoA, [1- ¹⁴ C]12:0-CoA, [1- ¹⁴ C]14:0-CoA, [1- ¹⁴ C]16:0-CoA, [1- ¹⁴ C]18:0-CoA, [1- ¹⁴ C]18:1-CoA, [1- ¹⁴ C]18:2-CoA, [1- ¹⁴ C]18:3-CoA, [1- ¹⁴ C]20:0-CoA, [1- ¹⁴ C]20:1-CoA, [1- ¹⁴ C]22:1-CoA
Acylo-CoA	16:0-CoA, 18:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA, 18:3-CoA
Lizofosfolipidy	<i>sn</i> -1-18:1-LPA, <i>sn</i> -1-18:1-LPC, <i>sn</i> -1-16:0-LPE, <i>sn</i> -1-18:1-LPE, <i>sn</i> -1-18:2-LPE, <i>sn</i> -1-18:1-LPI, <i>sn</i> -1-18:1-LPS,
Eterowe analogi lizofosfolipidów	<i>sn</i> -1-18:1-O-GPC [odpowiednik <i>sn</i> -1-18:1-LPC] <i>sn</i> -2-18:1-O-GPC [odpowiednik <i>sn</i> -2-18:1-LPC]

2.8. Wykorzystana w badaniach aparatura

- Aparat do elektroforezy horyzontalnej Mupid-exU (Mupid)
- Aparat GelDoc (Bio-Rad)
- Chromatograf gazowy GC-2010 (Shimadzu) wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny z kolumną 60 m x 0,25 mm CP-WAX 58-CB (AgilentTechnologies)
- Instant Imager (Packard Instrument Co.)
- Komory chromatograficzne (VWR)
- Kulki szklane o średnicy 0,45 – 0,5 mm (Sigma-Aldrich)
- Lnicznik scyntylacyjny Beckman LS6000TA (Beckman)
- Łaźnia ultradźwiękowa MT1800-E (Branson Instruments Company)
- Mieszadło magnetyczne VMS-A (VWR)
- Mini Bead Beater-8 (Biospec Products)
- pH metr model FiveEasy (Mettler Toledo)
- Płyta grzewcza Yellow MAG HP 7 z łaźnią piaskową (YellowLine)
- Sonikator Branson MT1800-E (Branson Instruments Company)
- Spektrofotometr Nanodrop 100 (Thermo Fisher Scientific)
- Spektrofotometr Spectroquant Pharo300 (Merck)
- Termocykler C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad)
- Termocykler LightCycler 480 (Roche)
- Termoblok Digital HeatBlock (VWR)
- Termomikser Thermomixer Compact 5350 (Eppendorf)
- Ultrawirówka Beckman L-70 (Beckman)
- Waga analityczna XA 60/220/X (Radwag)
- Wirówka Centrifuge 5415 C (Eppendorf)
- Wirówka Rotofix 32 A (Hettich)
- Wytrząsarka rotacyjna Incubator Shaker Series G-25 (New Brunswick Scientific)
- Wytrząsarka rotacyjna Innova 40 (New Brunswick Scientific)
- Wytrząsarka typu „Vortex” (neoLab oraz VWR)

2.9. Programy komputerowe

- CLC Main Workbench (Qiagen)
- Exel (Microsoft)
- GCsolution Analysis 2.31.00 (LabSolutions)
- MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)
- OligoAnalyzer Tool (Integrated DNA Technologies)
- Quantity One (BioRad)

3. METODY

3.1. Warunki hodowli *Camelina sativa*

3.1.1. Hodowla *Camelina sativa* na podłożu hodowlanym

Nasiona badanej odmiany *C. sativa* były bezpośrednio umieszczane w podłożu hodowlanym „COMPO SANA® Qualitäts-Blumenerde” na głębokości około 0,5 cm. Doniczki wraz z wysianymi nasionami oraz zwilżoną glebą umieszczano w pokoju fitotronowym ze stałą temperaturą 23 °C, fotoperiodem adekwatnym dla roślin dnia długiego – 16 godz. światła o intensywności wynoszącej 120 $\mu\text{mol fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ oraz 8 godz. ciemności oraz ze względną wilgotnością oscylującą w granicach 60%. Rośliny od momentu wykiełkowania systematycznie były podlewane wodą kranową.

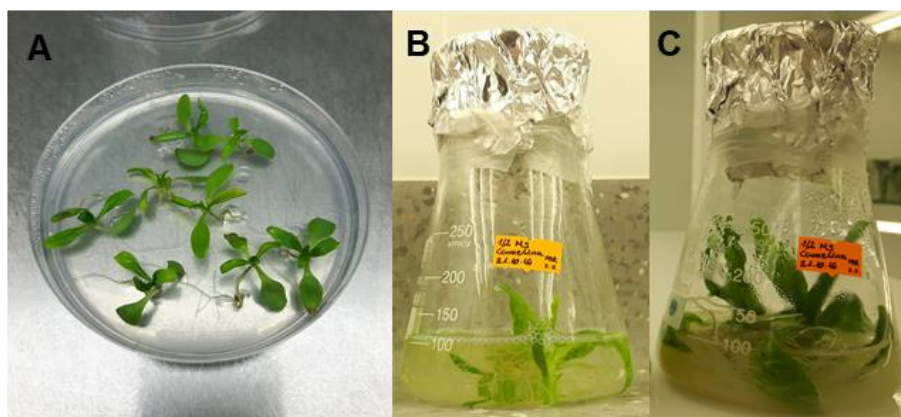
W zależności od wykonywanych doświadczeń materiał roślinny był zbierany na różnych etapach rozwoju roślin. Liście *C. sativa* były zbierane w okolicach 35-38 dnia od wysiania. W tych dniach rośliny rozpoczynały również proces kwitnienia, którego rozpoczęcie było określane poprzez obecność pąku kwiatowego. Również od tego momentu liczone były dni, w których zbierano nasiona do dalszych analiz, a liczba dni od rozpoczęcia kwitnienia do zbioru nasion przedstawiona została w pracy jako DAF (ang. days after flowering).

3.1.2. Hodowla *Camelina sativa* w kulturach płynnych

Przed rozpoczęciem hodowli *C. sativa* w warunkach *in vitro*, nasiona tej rośliny były powierzchniowo sterylizowane, tak aby uzyskać materiał wolny od mikroorganizmów. W tym celu do 2 ml probówek typu Eppendorf z okrągłym dnem przesypano niewielką ilość nasion, a następnie dodawano 1 ml 70% etanolu, który po upływie 1 minuty zbierano pipetą. Kolejno do próbówki dodawano 1 ml 3% podchlorynu wapnia, który inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po usunięciu mieszaniny sterylizującej, nasiona płukano trzykrotnie w 1 ml jałowej wody destylowanej.

Wysterylizowane nasiona wysiewano na szalki Petriego z podłożem stałym zawierającym ½ MS, 2% sacharozą oraz 0,8% agar. Gotowe szalki z wysianymi nasionami owijano przepuszczającą powietrze taśmą mikroporowatą i umieszczano w pomieszczeniach fitotronowych z warunkami takimi samymi, jak dla hodowli na podłożu hodowlanym: 16 godz. światła / 8 godz. ciemności, 60% wilgotności oraz temperaturą 23 °C. Po upływie 10 dni siewki *C. sativa* (Rys. 8A) sterylnie przenoszono do przygotowanych kolb ze 100 ml pożywki płynnej zawierającej ½ MS oraz 2%

sacharozę. Na Rysunku 8B przedstawione zostały siewki po 7 dniach od przeniesienia do kultury płynnej. Kolby wraz siewkami inkubowano w pomieszczeniu fitotronowym przez kolejne 14 dni w wytrząsarce rotacyjnej przy ustalonych 100 obrotach/minutę. Po upływie tego czasu materiał roślinny w postaci liści oraz korzeni był zbierany do dalszych analiz (Rys. 8C).



Rys. 8. Hodowla *C. sativa* w warunkach *in vitro*.

A – 10-dniowe siewki, przed przeniesieniem do hodowli płynnej; **B** – 17-dniowe siewki w hodowli płynnej (10 dni na pożywce stałej oraz kolejne 7 dni w pożywce płynnej); **C** – 24-dniowe siewki, przed pobraniem do analiz (10 dni na pożywce stałej oraz kolejne 14 dni w pożywce płynnej).

3.2. Izolacja RNA z *Camelina sativa*

Do izolacji RNA wykorzystano materiał pochodzący z tkanek wegetatywnych takich jak: liście i korzenie hodowane w warunkach *in vitro* oraz liście hodowane w warunkach *in vivo* (zebrane w dniu 0 DAF). RNA izolowano również z nasion, które zostały zebrane pomiędzy 24, a 26 dniem od zakwitnięcia *C. sativa* (stadium II).

Materiał roślinny zbierano bezpośrednio do probówek typu Eppendorf, które natychmiast zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano do dalszych analiz w -80 °C. Podczas izolacji RNA, zamrożony materiał umieszczano w schłodzonych, porcelanowych moździerzach, który następnie bardzo sprawnie rozcierano i przenoszono do probówek z przygotowanym buforem dostarczonym wraz z gotowym zestawem do izolacji RNA z tkanek roślinnych – GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (EURx). Dalsze etapy izolacji wykonywano zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Zawartość oraz czystość wyizolowanego RNA, którego elucję przeprowadzono przy użyciu 50 ul wody wolnej od RNaz, sprawdzano przy pomocy spektrofotometru Nanodrop 100 (Thermo Fisher Scientific).

3.3. Synteza cDNA

Wyizolowane RNA z poszczególnych tkanek roślinnych w pierwszej kolejności inkubowano z *dsDNazą* (Thermo Fisher Scientific), w celu usunięcia możliwych zanieczyszczeń DNA. Reakcję oczyszczenia przeprowadzano zgodnie z protokołem producenta.

Kolejnym etapem amplifikacji cDNA na matrycy RNA było przeprowadzenie reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR). W tym celu wykorzystano gotowy zestaw Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), a całą procedurę wykonano zgodnie ze zmodyfikowaną instrukcją producenta. Do reakcji odpowiednio dodawano:

RNA	1 µg
Oligo(dT) ₁₈	1 ul
10 mM dNTP	1 ul
H ₂ O	uzupełnienie do 15 ul

Całość inkubowano w termocyklerze przez 5 minut w 65 °C, a następnie ochładzano w lodzie. Kolejno do mieszaniny reakcyjnej dodawano 4 ul 5 x buforu RT oraz 1 ul Maxima H Minus Enzyme, zawierającego enzym – odwrotną trnaskryptazę. Dalszą inkubację prowadzono w 65 °C przez 30 minut, a w celu przeprowadzenia terminacji reakcji, próbki wraz z mieszaniną reakcyjną przenoszono do 85 °C na 5 minut.

Przepisane cDNA przechowywano w -20 °C, aż do momentu dalszych analiz. Otrzymane matryce były wykorzystywane do amplifikacji sekwencji *CsLPEAT1* i *CsLPEAT2* (opisanej w rozdziale 3.5) oraz do ilościowej reakcji polimerazy DNA (opisanej w rozdziale 3.4).

3.4. Analiza ekspresji genów kodujących *CsLPEAT* - ilościowa reakcja polimerazy DNA

W celu przeprowadzenia analizy ekspresji genów kodujących różne warianty *CsLPEAT1* oraz *CsLPEAT2* przeprowadzona została ilościowa reakcja polimerazy DNA, do której użyto gotowy zestawu Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Do reakcji wykorzystywano cDNA z różnych tkanek *C. sativa* oraz startery zaprojektowane przy pomocy OligoAnalyzer Tool (Integrated

DNA Technologies), które zostały przedstawione w tabeli 4. Do zaprojektowania sekwencji starterów dla genów, których nie udało się sklonować, wykorzystano sekwencje znajdujące się w bazach danych, które określone zostały na podstawie przeprowadzenia analizy genomowej innej odmiany *C. sativa*.

Przed przystąpieniem do głównej części analizy, zoptymalizowano ilość matrycy cDNA dla każdej z pary starterów amplifikującej badane sekwencje oraz genów referencyjnych. Wyznaczenie w ten sposób krzywych amplifikacji było niezbędne do określenia optymalnych warunków do przeprowadzenia efektywnej reakcji qPCR

Reakcję amplifikacji przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych (4titude) w termocyklerze LightCycler 480 (Roche). Przygotowanie mieszanin reakcyjnych oraz procedura amplifikacji została wykonana zgodnie z opisem zawartym w instrukcji dostarczonej przez producenta.

W celu określenia względnej ekspresji genów kodujących *CsLPEAT*, otrzymane wyniki dla badanych sekwencji normalizowano w stosunku do sekwencji dwóch genów referencyjnych kodujących aktywator fosfatazy typu II (*TIP41*) oraz β -aktynę (*ACT2*).

3.5. Amplifikacja sekwencji *CsLPEAT1* oraz *CsLPEAT2*

Do sklonowania sekwencji nukleotydowych kodujących różne warianty *CsLPEAT1* oraz *CsLPEAT2* wykorzystano matryce cDNA. Ze względu na różnorodną ekspresję genów kodujących *CsLPEAT* w różnych tkankach *C. sativa*, do poszukiwań i amplifikacji genów wykorzystano matryce cDNA pozyskane z liści, nasion oraz korzeni *C. sativa*. Do amplifikacji wykorzystano polimerazę *Pfu* wraz z gotowym zestawem odczynników do reakcji PCR – Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific). Dla każdej z izoform wykorzystano inną parę starterów, których parametry zostały opisane w punkcie 2.4. Ilość wszystkich dodanych składników mieszaniny amplifikacyjnej była zoptymalizowana dla każdej z izoform. Do amplifikacji wariantów *CsLPEAT1* niezbędne było dodanie do reakcji DMSO oraz 150 ng matrycy cDNA. W przypadku wariantów *CsLPEAT2* amplifikacja wymagała jedynie 50 ng matrycy cDNA, a dodatek DMSO był zbędny.

Ta sama reakcja PCR przy zastosowaniu poniżej opisanych parametrów oraz składników mieszaniny amplifikacyjnej była również wykorzystywana do oceny obecności wstawionych sekwencji do wektorów oraz powielenia fragmentów DNA wyeluowanych z żelu agarozowego. Jednakże w przypadku tych reakcji do mieszaniny

amplifikacyjnej dodawano objętość odpowiadającą 10 ng plazmidowego DNA lub uprzednio oczyszczonego z żelu fragmentu DNA, który stanowił matrycę dla tych reakcji PCR. Poniżej zapisany został skład mieszaniny amplifikacyjnej:

5 x Bufor Phusion HF	4 ul
2 mM roztwór dNTPs	2 ul
5 μ M primer <i>forward</i>	1 ul
5 μ M primer <i>reverse</i>	1 ul
DMSO	brak lub 0,6 ul
polimeraza <i>Pfu</i>	0,2 ul
matrycowe cDNA	10 / 50 /150 ng
H ₂ O	uzupełnienie do 20 ul

Gotowe mieszaniny amplifikacyjne umieszczano w termocyklerze C1000 Touch Thermal Cycler (BioRad) i poddawano reakcji PCR, która składała się z dwóch etapów. Pierwszy z nich składał się z 10 cykli, podczas których zachodził proces denaturacji, dołączenia starterów oraz elongacji. Na etap drugi składało się 30 cykli, podczas których dochodziło jedynie do denaturacji i elongacji amplifikowanej sekwencji. Poniżej opisane zostały dokładne parametry reakcji PCR:

Wstępna denaturacja	98 °C	30 sek	
Denaturacja	98 °C	10 sek	} 10 cykli
Przyłączenie starterów	61,8 °C dla <i>CsLPEAT1</i>	30 sek	
	58,5 °C dla <i>CsLPEAT2</i>		
Elongacja	72 °C	1 min	
Denaturacja	98 °C	10 sek	} 30 cykli
Elongacja	72 °C	1 min	
Końcowa elongacja	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

Otrzymane produkty PCR po reakcjach amplifikacji oczyszczano przy wykorzystaniu gotowego zestawu GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), a następnie jego czystość oraz stężenie sprawdzano przy użyciu spektrofotometru Nanodrop 100 (Thermo Fisher Scientific). Analiza oczyszczonych produktów PCR była kolejno przeprowadzana przy pomocy elektroforezy agarozowej.

3.6. Elektroforeza agarozowa

W celu oceny czy w reakcji PCR otrzymany został pożądaný produkt, oczyszczone produkty PCR były rozdzielane na 1% żelu agarozowym w 1 x stężonym buforze TAE. Do żelu dodatkowo, w celu wizualizacji rozdzielonych produktów oraz wzorca, dodawano barwnik fluorescencyjny dla kwasów nukleinowych – GelRed. Do poszczególnych studzienek żelu наносzono próby zawierające:

product PCR	min. 100 ng
6x Bufor obciążający Loading Dye Solution	3 ul
dH ₂ O	uzupełnienie do 20 ul

Po naniesieniu badanych prób na studzienki oraz wzorca, którym był marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Plus (przygotowany zgodnie z opisem znajdującym się w punkcie 2.7.), rozdział prowadzono w aparacie do elektroforezy horyzontalnej (Mupid-exU) przez 65 minut przy napięciu wynoszącym 100 V (około 7 V/cm). Po zakończeniu rozdziału żel umieszczano w aparacie GelDoc (Bio-Rad), a następnie korzystając z oprogramowania QuantityOne (BioRad) przeprowadzano wizualizację w świetle UV o długości 312 nm.

3.7. Oczyszczenie fragmentów DNA z żelu agarozowego

Ze względu na niską wydajność procesu amplifikacji pożądaných sekwencji DNA z matrycy cDNA oraz powstawanie krótkich niespecyficznych sekwencji konieczne było przeprowadzenie izolacji rozdzielonych sekwencji, które odpowiednio znajdowały się na wysokości markera o wielkości 1500 bp dla *CsLPEAT1* oraz 2000 bp dla *CsLPEAT2*. W celu oczyszczenia tych fragmentów DNA, odpowiednie prążki na żelu ostrożnie przy użyciu sterylnej skalpela wycinano, a następnie przeprowadzano elucję zgodnie

z instrukcją załączoną do gotowego zestawu do izolacji DNA z żelu - GeneJET Gel Extraction and DNA CleanUp Kit (Thermo Fisher Scientific). Na ostatnim etapie elucji otrzymane fragmenty DNA zawieszano w 20 ul destylowanej H₂O. Czystość oraz stężenie weryfikowano przy wykorzystaniu spektrofotometru Nanodrop 100 (Thermo Fisher Scientific).

Wyizolowane i oczyszczone produkty zawierające jedynie pożądaną sekwencję DNA ponownie wykorzystywano do reakcji PCR opisanej w punkcie 3.5, w celu uzyskania ilości matrycy DNA wystarczającej do sekwencjonowania oraz wprowadzenia jej do wektorów.

3.8. Sekwencjonowanie

W celu określenia sekwencji nukleotydowych amplifikowanych sekwencji DNA oraz ustalenia, które sekwencje odpowiadają, którym wariantom *CsLPEAT1* oraz *CsLPEAT2*, wyizolowane oraz oczyszczone produkty PCR wysyłano do analizy przeprowadzanej przez firmę Eurofins Genetics. Analiza sekwencji przez tą firmę jest przeprowadzana przy zastosowaniu metody sekwencjonowania Sangera. Otrzymane wyniki były analizowane w programie CLC Main WorkBench oraz MEGA X.

3.9. Analiza bioinformatyczna

Wyniki otrzymane po sekwencjonowaniu zostały przeanalizowane, a na ich podstawie złożone zostały pełne sekwencje genowe stosując w tym celu program MEGA X. Otrzymane wyniki wykazały, że z sukcesem udało się sklonować 5 różnych sekwencji, które są podobne do sekwencji znajdujących się w bazach danych i mogą kodować białka o aktywności LPEAT. Analizę tą przeprowadzono na podstawie sekwencji znajdujących się w bazach danych, utworzonych dla genomu *C. sativa* odmiany DH55 (Kagale i in., 2014). Jednakże, w tych bazach danych opisy genów wskazują tylko na ich przypuszczalną rolę jaką mogą pełnić, a która nie została dotychczas potwierdzona, a jedynie określona na podstawie podobieństwa do genów znajdujących się w genomie *A. thaliana*, dla których rolę tych genów już zweryfikowano.

Do dalszych analiz wykorzystano poniższe sekwencje, w których mała litera alfabetu oznacza inny wariant izoformy, a następująca po niej cyfra określa inny wariant splicingowy tego samego genu:

- * *LPEAT1a.1*
- * *LPEAT1a.2*
- * *LPEAT2a*
- * *LPEAT2b*
- * *LPEAT2c*

Powyższe, sklonowane sekwencje genów zostały poddane analizie porównawczej. Sekwencje aminokwasowe wyszukanych wariantów CsLPEAT zostały porównane między sobą, w celu określenia ich procentowego podobieństwa. Analiza ta została przeprowadzona przy wykorzystaniu algorytmu BLAST udostępnionego przez NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Kolejno wszystkie warianty danej izoformy zostały przyrównane odpowiednio do sekwencji kodujących LPEAT1 lub LPEAT2 obecnych w *A. thaliana*. Uliniowanie sekwencji zostało przeprowadzone przy wykorzystaniu programu CLC Main WorkBench, a sekwencje aminokwasowe zostały pobrane z baz danych NCBI (tabela 5).

Dodatkowo przeprowadzona została analiza filogenetyczna przy pomocy programu MEGA X (Kumar i in., 2018). Do odtworzenia ewolucyjnych zależności zastosowano metodę największej wiarygodności (Maximum Likelihood) wraz z modelem substytucji aminokwasów JTT z ustaloną wartością bootstrap równą 1000 (Felsenstein i in., 1985).

3.10. Wprowadzenie sklonowanych sekwencji DNA do wektora pDONR221 - reakcja BP

W celu potwierdzenia aktywności i wykonania szczegółowej charakterystyki białek kodowanych przez sklonowane geny z organizmu *C. sativa* niezbędne było w pierwszej kolejności utworzenie wektora wahadłowego umożliwiającego transformację komórek drożdży szczepu $\Delta ALE1$. Procedura utworzenia plazmidów niosących geny kodujące CsLPEAT wykonana była przy zastosowaniu systemu klonowania Gateway (Invitrogen).

Pierwszym etapem tego procesu była reakcja BP, która miała na celu wprowadzenie produktu PCR z dołączonymi sekwencjami attB do wektora pDONR221. Do przeprowadzenia reakcji rekombinacji wykorzystano gotowy zestaw odczynników Gateway BP Clonase II Enzyme Mix w skład którego wchodził pusty plazmid pDONR221 oraz mieszanina enzymów BP Clonase II. Reakcję przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta, a do mieszanin reakcyjnych odpowiednio dodawano:

produkt PCR	150 ng
pDONOR221	150 ng
Bufor TE pH 8,0	uzupełnienie do 8 ul
BP Clonase II Enzyme Mix	2 ul

Próbówki wraz z mieszaniną reakcyjną były inkubowane w wytrząsarce (Thermomixer Compact 5350, Eppendorf) w temperaturze 25 °C, przez 18 godz. Po tym czasie reakcja rekombinacji była zatrzymywana poprzez dodawanie 1 ul Proteiny K (znajdującej się w zestawie) i inkubację w 37 °C przez 10 minut. Uzyskane w wyniku przeprowadzonej reakcji wektory posiadające pożądane sekwencje (tzw. entry clone) wprowadzano do chemikompetentnych komórek *E. coli* DH5 α .

3.11. Przeniesienie sklonowanych sekwencji DNA z wektora pDONR221 do wektora wahadłowego pYES-DEST52 – reakcji LR

Po wprowadzeniu wektora pDONR221 z pożądanymi sekwencjami do *E. coli* DH5 α oraz jego namnożeniu zgodnie z metodyką opisaną w punkcie 3.12. oraz 3.13., powielone plazmidy wykorzystywano do reakcji LR. Reakcja ta jest kolejnym etapem systemu Gateway i odpowiada za przeniesienie pożądaných sekwencji na docelowy wektor wahadłowy – pYES-DEST52. Do przeprowadzenia reakcji wykorzystano odczynniki z gotowego zestawu Gateway LR Clonase II Enzyme Mix, a do każdej mieszaniny reakcyjnej dodawano:

entry clone (pDONR221+sekwencja)	150 ng
pYES-DEST52	150 ng
Bufor TE pH 8,0	uzupełnienie do 8 ul
LR Clonase II Enzyme Mix	2 ul

Gotowe mieszaniny reakcyjne były inkubowane w wytrząsarce (Thermomixer Compact 5350, Eppendorf) w temperaturze 25 °C, przez maksymalnie 18 godz.,

aby zwiększyć efektywność zachodzącej reakcji rekombinacji. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 1 ul Proteiny K i 10 minutową inkubację w 37 °C. Otrzymane po reakcji wektory docelowe wykorzystywano do transformacji chemikompetentnych komórek *E. coli* DH5α.

3.12. Transformacja *Escherichia coli*

Otrzymane po reakcjach BP oraz LR plazmidy wprowadzono do chemikompetentnych komórek *E. coli* DH5α przy zastosowaniu metody szoku cieplnego. Probówki zawierające kompetentne bakterie umieszczano na lodzie do momentu ich rozmrożenia, następnie dodawano do nich 5 ul mieszaniny otrzymanej po reakcji BP lub LR i inkubowano na lodzie przez 30 minut. Po tym czasie komórki bakteryjne poddawano szokowi cieplnemu poprzez umieszczenie ich na 30 sekund w 42 °C i ponownie przeniesienie na lód. W celu namnożenia transformowanych komórek bakteryjnych, do probówek dodawano 250 ul pożywki LB, a następnie inkubowano je przez godzinę w 37 °C w wytrząsarce z ustawionymi parametrami 300 obrotów/minutę (Thermomixer Compact 5350, Eppendorf). Po godzinnej hodowli, transformowane bakterie wysiewano na podłoże stałe LA z odpowiednim antybiotykiem.

3.13. Hodowla oraz selekcja *Escherichia coli*

Bakterie *E. coli* wykorzystane do procesu transformacji wysiewano na podłoże stałe LA zawierające określony antybiotyk, który różnił się w zależności od wektora. Bakterie były kolejno hodowane przez 24 godz. w temperaturze 37 °C. Na pożywkach z wybranym antybiotykiem rozwijały się tylko kolonie bakterii transformowanych, które posiadały obecny na wektorze gen oporności na wybrany antybiotyk. Rozwinięte, pojedyncze kolonie wykorzystywano do uzyskania czystych kultur bakteryjnych. W tym celu, po pobraniu pojedynczej kolonii wykonywano posiew redukcyjny na podłożu stałym LA z danym antybiotykiem i hodowano je przez kolejne 24 godz. w 37 °C.

Do namnażania transformowanych bakterii zawierających pożądaną wektory stosowano hodowlę płyną. W tym celu pojedyncze kolonie, uzyskane po posiewie redukcyjnym, zawieszano w 5 ml podłoża płynnego LB z odpowiednim antybiotykiem i hodowano w 37 °C w wytrząsarce rotacyjnej Innova 40 (New Brunswick Scientific) przy 140 obrotach/minutę. Po upływie 24 godz., namnożone bakterie wykorzystywano

do izolacji plazmidów przy pomocy gotowego zestawu GeneJET Plasmid Mini Prep Kit (Thermo Fisher Scientific), a czystość i ilość wyizolowanego produktu sprawdzano przy użyciu spektrofotometru Nanodrop 100 (Thermo Fisher Scientific).

3.14. Transformacja *Saccharomyces cerevisiae*

Transformacja drożdży została przeprowadzona według zmodyfikowanej metody LiAc/SS carrier DNA/PEG opisaną przez Gietz i Woods (2002). Do transformacji wykorzystywano wektory wahadłowe pYES-DEST52 niosące pożądane sekwencje oraz szczep drożdży $\Delta ALE1$, który posiada delecję głównego genu odpowiedzialnego za aktywność acylotransferazową typu acylo-CoA:lizofosfolipid, specyficzną względem LPC oraz LPE.

Nocne hodowle drożdży przenoszono do nowych pożywek, tak aby wyjściowe OD₆₀₀ wynosiło 0,1 i inkubowano przez kolejne 4 – 6 godz., aż do momentu osiągnięcia OD₆₀₀ hodowli 0,4 – 0,8. Po osiągnięciu odpowiedniej wartości OD₆₀₀, pobierano 1 ml hodowli, wirowano przy prędkości 1000 x g przez 5 min, a otrzymany osad płukano w 1 ml dH₂O i ponownie wirowano. Do otrzymanego osadu komórek drożdżowych kolejno dodawano 0,1 – 1 µg odpowiedniego plazmidu, 100 ng DNA ze spermy łososia (uprzednio inkubowanego przez 5 min w 95 °C) oraz 500 µl roztworu PEG. Wszystkie dodane odczynniki dokładnie worteksowano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, a następnie przez kolejne 15 minut w 42 °C w wytrząsarce z lekkim wstrząsaniem (300 obrotów/minutę). Po zakończeniu inkubacji, całość wirowano (1000 x g, 5 min), otrzymany osad przepłukiwano 1 ml dH₂O, ponownie wirowano oraz dekantowano. Ostatecznie otrzymany osad komórek drożdży z resztkami wody wysiewano na podłoże selekcyjne SD-URA.

3.15. Hodowla *Saccharomyces cerevisiae*

Drożdże szczepu ΔALE po przeprowadzeniu procesu transformacji były hodowane na stałym podłożu selekcyjnym SD-URA z 2% glukozą, przez 48 godz. w 30 °C. Po upływie tego czasu na podłożach były obecne jedynie hodowle komórek drożdży, które były transformowane i posiadały wektor zawierający gen syntezy uracylu, związek nieobecny w użytej pożywce. W celu wyselekcjonowania czystych linii, pojedyncze kolonie drożdży przesiewano na płytki ze stałym podłożem selekcyjnym SD-URA z 2%

glukozą, przy zastosowaniu metody posiewu redukcyjnego i hodowano przez kolejne 48 godz. w 30 °C.

Wstępnie przeprowadzone badania, dotyczące stosowanego w pożywkach płynnych źródła węgla wykazały, że suplementacja rafinozą wpływa korzystniej na efektywność ekspresji genów obecnych na wektorach znajdujących się w transformowanych drożdżach. Jej obecność wzmacnia jednak wydłużenia hodowli do 48 godz., aby drożdże zdążyły osiągnąć końcową fazę wzrostu logarytmicznego. W przypadku hodowli, w których zastosowano jako źródło węgla glukozę, ekspresja genów, a następnie aktywność kodowanych przez nie enzymów była zbyt niska do dalszych analiz.

W związku z powyższym do hodowli drożdży przeznaczonych do izolacji frakcji mikrosomalnej wykorzystano pożywkę SD-URA suplementowaną 2% rafinozą. Pierwszym etapem hodowli było zaszczerpienie pojedynczych kolonii, uzyskanych po posiewie redukcyjnym, do 10 ml płynnej pożywki. Hodowlę zaszczerpionych drożdży prowadzono przez 48 godz. w 30 °C. Namnożoną hodowlę drożdży następnie odmładzano poprzez przeniesienie jej do 100 ml świeżej pożywki SD-URA z 2% rafinozą. Wyjściowe OD₆₀₀ wynosiło 0,2. Po upływie doby do hodowli dodawano 20% galaktozę, tak aby jej końcowe stężenie stanowiło 2%. Każdy z etapów powyższej hodowli drożdży w płynnej pożywce był przeprowadzany w 30 °C w wytrząsarce rotacyjnej Incubator Shaker Series G-25 (New Brunswick Scientific) przy ustalonych parametrach – 220 obrotów/minutę.

Dla drożdży szczepu dzikiego (BY4742) do hodowli na podłożu stałym wykorzystano pożywkę YPD, a hodowlę prowadzono przez 48 godz. w 30 °C. Hodowla tych drożdży przeznaczona na izolację frakcji mikrosomalnej została przeprowadzona zgodnie z procedurą opisaną powyżej, jedynym wyjątkiem było zastosowanie pożywki SD-URA z dodatkiem 2% glukozy, przy zastosowaniu, której hodowlę prowadzi się przez 24 godz.

3.16. Analiza acylolipidów w tkankach wegetatywnych oraz generatywnych *Camelina sativa*

3.16.1. Ekstrakcja lipidów z wybranych tkanek roślinnych

Do ekstrakcji lipidów pobierano 200 mg świeżej masy liści zarówno tych hodowanych w warunkach *in vivo* (na podłożu hodowlanym), jak i w warunkach *in vitro* (w kulturach płynnych). W przypadku nasion, do pojedynczej analizy pobierano wszystkie nasiona znajdujące się w łuszczyńce, których ilość dokładnie liczone. Materiał do analizy nasion

zbierano na ich 11-tu różnych etapach rozwojowych: 6, 10, 17, 21, 24, 26, 31, 35, 38, 41 DAF, oraz gdy nasiona osiągały dojrzałość. Każdą z analiz przeprowadzano w przynajmniej trzech powtórzeniach biologicznych.

Ekstrakcja lipidów została przeprowadzona przy wykorzystaniu zmodyfikowanej metody Bligh i Dyer (1959). Świeży, zważony materiał rośliny w postaci liści lub nasion umieszczano w szklanym homogenizatorze, do którego kolejno dodawano 3,75 ml mieszaniny chloroform:metanol (1:2; v:v) oraz 1,25 ml 0,15 M kwasu octowego. Następnie tkanki znajdujące się w homogenizatorze bardzo dokładnie ucierano. Po uzyskaniu jednorodnej mieszaniny, utarty materiał przenoszono do 15 ml szklanych probówek, a pozostałości znajdujące się w homogenizatorze przemywano 1,25 ml chloroformu oraz 1,25 ml H₂O, które ostatecznie również przenoszono do probówek z utartym materiałem. Uzyskane mieszaniny dokładnie mieszano przy użyciu wytrząsarki typu „Vortex”, a następnie wirowano przez 3 minuty przy prędkości 1000 x g. W efekcie uzyskiwano dwie klarowne warstwy: górną – metanolowo-wodną oraz dolną chloroformową, zawierającą wyekstrahowane lipidy. Dolne warstwy przenoszono przy pomocy pipet Pasteura do nowych szklanych probówek, a następnie uzyskane ekstrakty chloroformowe odparowywano pod strumieniem azotu w łaźni piaskowej z ustaloną temperaturą 37 °C. Osady, powstałe po odparowywaniu, rozpuszczano w znanej objętości chloroformu (1 ml), a następnie ich alikwoty pobierano do określenia całkowitej zawartości acylolipidów lub oznaczenia zawartości i składu klas lipidów znajdujących się w tych ekstraktach. Ekstrakty chloroformowe były wykorzystywane bezpośrednio po ekstrakcji lub były przechowywane w -20 °C do czasu dalszych analiz.

3.16.2. Oznaczenie całkowitej zawartości acylolipidów w badanym materiale

Do oznaczenia całkowitej zawartości acylolipidów pobierano 10% objętości ekstraktów chloroformowych uzyskanych po ekstrakcji lipidów z tkanek roślinnych zarówno liści, jak i nasion. Ekstrakty poddawano procesowi transmetylacji, czyli przekształcenia kwasów tłuszczowych w ich estry metylowe, czyli związki o większej lotności umożliwiając w ten sposób dalszą analizę zawartość acylolipidów przy pomocy chromatografii gazowej (3.16.4).

3.16.3. Chromatografia cienkowarstwowa

Metoda chromatografii cienkowarstwowej (TLC; ang. thin layer chromatography) była wykorzystywana w celu określenia zawartości, a także składu poszczególnych klas lipidów obecnych w badanym ekstrakcie roślinnym, do rozdziału mieszanin poreakcyjnych otrzymanych po testach enzymatycznych *in vitro* oraz do określenia zawartości PC w ekstraktach z izolatów mikrosomalnych.

W pierwszej kolejności chloroform, w którym były rozpuszczone badane ekstrakty, odparowywano do sucha pod strumieniem azotu w łaźni piaskowej o temperaturze 37 °C. Powstałe osady rozpuszczano w 50 ul chloroformu, a następnie наносono na płytki szklane pokryte żelem krzemionkowym (TLC Silica Gel 60) o wymiarach 10 x 20 cm lub 20 x 20 cm. Płytki krzemionkowe stanowiące fazę stacjonarną wraz z naniesionymi ekstraktami oraz standardami umieszczano w układzie rozwijającym znajdującym się w komorze chromatograficznej, który stanowił fazę ruchomą. Skład układu rozwijającego zależał od tego, które z klas lipidów miały zostać rozdzielone. Jako fazę ruchomą wykorzystywano dwa układy:

- układ polarny: chloroform: metanol: kwas octowy: woda (90:15:10:2,5; v:v:v:v) – wykorzystywany do rozdziału lipidów polarnych obecnych w tkankach wegetatywnych oraz nasionach, do określenia zawartości fosfatydylocholiny w wyizolowanych frakcjach mikrosomalnych (3.17.1/2) oraz rozdziału mieszanin poreakcyjnych (3.17.4/5.);
- układ obojętny: heksan: eter dietylowy: kwas octowy (70:30:1;v:v:v) – stosowany do rozdziału lipidów obojętnych obecnych w nasionach.

Po zakończeniu rozdziału, płytki suszono pod wyciągiem w temperaturze pokojowej, a następnie wywoływano poprzez krótką ekspozycję w oparach jodu (I₂), który odwracalnie wiąże się z wiązaniami podwójnymi obecnymi w grupach acylowych lipidów lub poprzez spryskanie 0,05% roztworem prymuliny i ekspozycję w świetle UV, która pozwala na detekcję klas lipidów o małej zawartości. Płytki, na których rozdzielano mieszaniny poreakcyjne, po dokładnym wysuszeniu umieszczano w autoradiografii pozwalającym na wizualizację produktów reakcji oraz umożliwiającym określenie radioaktywności powstałych produktów. Identyfikację poszczególnych klas lipidów przeprowadzano zawsze poprzez porównanie lokalizacji rozdzielnych związków do lokalizacji naniesionych standardów. W celu przeprowadzenia dalszej ilościowej analizy rozdzielonych klas lipidów, zidentyfikowane klasy lipidów spryskiwano wodą, a następnie wraz z żelem krzemionkowym zdrapywano do osobnych próbek

metylacyjnych i zalewano metanolem suszonym, w celu związania pozostałości wody w żelu. Nadmiar metanolu odparowywano do sucha pod strumieniem azotu w łaźni piaskowej o temperaturze 37 °C, a zdrapany żel poddawano procesowi transmetylacji i analizie przy wykorzystaniu chromatografii gazowej.

3.16.4. Chromatografia gazowa

Odparowane do sucha pod strumieniem azotu w łaźni piaskowej (37 °C) alikwoty ekstraktów chloroformowych przeznaczonych do określenia całkowitej zawartości acylolipidów oraz zdrapany żel krzemionkowy zawierający poszczególne klasy lipidów zalewano 2 ml mieszaniny metylacyjnej w celu przeprowadzenia procesu transmetylacji. Badane próby inkubowano przez 40 minut w termoblok Digital HeatBlock (VWR) w 90 °C. Po ostygnięciu prób, do każdej z nich kolejno dodawano: 50 – 100 nmol wewnętrznego standardu – kwasu heptadekanowego (17:0-Me), 3 ml heksanu o wysokiej czystości („do analizy na GC”) oraz 2 ml H₂O. Uzyskane mieszaniny dokładnie wytrząsano oraz wirowano przez 3 minuty przy prędkości 1000 x g. Po wirowaniu uzyskiwano dwie warstwy: górną – heksanową (zawierającą estry metylowe kwasów tłuszczowych) oraz dolną – metanolowo-wodną. Do dalszych analiz, przy pomocy szklanych pipet Pateura zbierano warstwę heksanową, którą następnie odparowywano do sucha w łaźni piaskowej z ustawioną temperaturą 37 °C pod strumieniem azotu. Uzyskane osady rozpuszczano w 40 lub 100 µl heksanu do chromatografii gazowej (w zależności od przypuszczalnej ilości estrów metylowych w danym ekstrakcie) i przenoszono do insertów – specjalnych probówek do analizy na chromatografii gazowej. Tak przygotowane próby poddawano analizie przy pomocy chromatografu gazowego GC-2010 (Shimadzu) wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny z kolumną 60 m x 0,25 mm CP-WAX 58-CB (AgilentTechnologies).

Do analizy wyników używano programu GCsolution Analysis 2.31.00 (LabSolutions), który pozwala na identyfikację poszczególnych estrów metylowych kwasów tłuszczowych na podstawie czasów retencji ich wzorców. Ilościowa zawartość poszczególnych związków odbywa się automatycznie przez powyżej wspomniany program, który porównuje powierzchnię pola pików badanych estrów metylowych kwasów tłuszczowych do powierzchni dodanego do prób standardu wewnętrznego o znanej zawartości.

3.16.5. Cięcie wyekstrahowanej fosfatydyloetanolaminy fosfolipazą A₂

W celu sprawdzenia jakie kwasy tłuszczowe występują w pozycji *sn*-1 oraz *sn*-2 szkieletu glicerolowego fosfatydyloetanolaminy niezbędne było przeprowadzenie reakcji cięcia przez fosfolipazę A₂, która katalizuje reakcję odcinania grup acylowych obecnych w pozycji *sn*-2. Do przeprowadzenia tej reakcji wykorzystano ekstrakty chloroformowe otrzymane po ekstrakcji lipidów z liści hodowanych w warunkach *in vivo*, które kolejno rozdzielono przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej w układzie polarnym (3.16.3). Fragmenty krzemionki zidentyfikowane na podstawie wzorca jako obszary żelu zawierające fosfatydyloetanolaminę, zdrapano, zalano 3,75 ml mieszaniny chloroform:metanol (1:2;v:v) i poddano procesowi sonifikacji w łaźni ultradźwiękowej MT1800-E (Branson Instruments Company). Po upływie 15 minut, próby wirowano przez 3 minuty przy prędkości 1000 x g i całość znad żelu przenoszono do nowych probówek, do których kolejno dodawano 1,25 ml 0,15 M kwasu octowego, 1,25 ml chloroformu oraz 1,25 ml H₂O. Tak przygotowane mieszaniny ponownie wirowano (3 min, 1000 x g). W efekcie otrzymywano dwie frakcje: metanolowo-wodną (górną) oraz chloroformową, zawierającą wyekstrahowaną fosfatydyloetanolaminę (dolną), którą przenoszono do nowych próbek i odparowywano do sucha pod strumieniem azotu w łaźni piaskowej o temperaturze 37 °C.

Przed przystąpieniem do głównej części reakcji enzymatycznej, uzyskane osady rozpuszczano w 500 ul eteru dietylowego i bardzo dokładnie mieszano na wytrząsarce typu „Vortex”. Kolejno do probówki dodawano 1 ml buforu Tris-HCl (pH 8,9) z 5 mM CaCl₂ oraz 3 U fosfolipazy A₂ z jadu pszczoły, a następnie całą zawartość przedmuchiwno azotem. Wszystkie odczynniki razem dokładnie mieszano na mieszadle magnetycznym, bez grzania, przez godzinę. Po upływie tego czasu reakcje zatrzymywano poprzez dodanie 20 ul lodowatego kwasu octowego, a w celu wyizolowania jedynie frakcji lipidowych zawierających wolne kwasy tłuszczowe oraz lizofosfatydyloetanolaminę, powstałych w wyniku aktywności fosfolipazy, zastosowano metodę ekstrakcji Bligh i Dyer (1959), opisaną w punkcie 3.16.1. Otrzymane po ekstrakcji frakcje chloroformowe rozdzielono przy użyciu metody chromatografii cienkowarstwowej i zastosowaniu układu polarnego (zgodnie z punktem 3.16.3). Rozdzielone frakcje lipidowe, uwidaczniiano na płytce poprzez spryskanie wodą, następnie zdrapywano i poddawano transmetylacji w celu przeprowadzenia dalszej analizy przy pomocy chromatografii gazowej (tak jak opisano w punkcie 3.16.4).

3.17. Reakcje enzymatyczne *in vitro*

3.17.1. Izolacja frakcji mikrosomalnej z tkanek *Camelina sativa*

Do izolacji frakcji mikrosomalnej wykorzystywano materiał roślinny pochodzący z liści hodowanych w warunkach *in vivo* oraz liści i korzeni hodowanych w warunkach *in vitro*. Izolację frakcji mikrosomalnej z nasion *C. sativa* wykonano dla trzech wyznaczonych stadiów rozwojowych, w obrębie których odnotowano największe zmiany w akumulacji i składzie acylolipidów: stadium I – nasiona 17-19 DAF, stadium II – nasiona 24-26 DAF oraz stadium III – nasiona 31-34 DAF. W zależności od stanu rozwojowego nasion zbierano po około 300-400 nasion, z których odseparowywano jedynie zarodki do dalszych badań. Wszystkie etapy poniżej opisanej procedury wykonywano w chłodni, w celu zminimalizowania możliwego działania enzymów proteolitycznych.

Tkanki roślinne umieszczano w szklanym homogenizatorze, a następnie dokładnie ucierano z dodatkiem buforu do homogenizacji tkanek roślinnych, który zawierał w swoim składzie: bufor fosforanowy (0,1 M; pH 7,2), sacharozę (0,33 M), katalazę (1000 U/cm³) oraz BSA (1 mg/ml). Po utarciu i uzyskaniu jednorodnej mieszaniny, w celu pozbycia się pozostałych nieroztartych tkanek, homogenaty przesączano przez dwie warstwy gazy Miracloth do probówek wirówkowych i poddawano wirowaniu przez 12 minut z prędkością 20000 x g w ultrawirówce Beckman L-70 (Beckman). W wyniku tego wirowania oddzielano supernatant, wykorzystywany na dalszych etapach izolacji, od osadu w postaci nieroztartych tkanek, jąder komórkowych, ścian komórkowych, plastydów oraz mitochondriów. Uzyskane po wirowaniu supernatanty ponownie przesączano przez gazę Miracloth do nowych probówek i poddawano procesowi wirowania przez 90 minut z prędkością 100000 x g. Powstałe po wirowaniu osady, zawierające frakcję mikrosomalną, przemywano buforem fosforanowym (0,1 M; pH 7,2), a następnie dokładnie rozcierano w tym samym buforze i przechowywano w -80 °C do czasu dalszych analiz.

W celu określenia zagęszczenia wyizolowanych frakcji mikrosomalnych, przed zamrożeniem pobierano ich alikwoty (50 ul). Następnie przeprowadzano badania dotyczące zawartości puli fosfatydylocholiny w wyizolowanych frakcjach mikrosomalnych. Zawartość fosfatydylocholiny była wyznaczana poprzez przeprowadzenie ekstrakcji lipidów z izolatów, a następnie wykorzystanie technik chromatografii cienkowarstwowej oraz chromatografii gazowej, tak jak opisano w punkcie 3.16.4.

3.17.2. Izolacja frakcji mikrosomalnej z *Saccharomyces cerevisiae*

Izolację frakcji mikrosomalnych z badanych linii drożdży przeprowadzano, podobnie jak w przypadku izolacji tej frakcji z tkanek roślinnych, w chłodni, aby zapobiec ewentualnej degradacji białek. Do izolacji wykorzystywano 100 ml hodowli płynnych, do których uprzednio została dodana galaktoza, niezbędna do indukcji ekspresji badanych genów znajdujących się na wektorach.

Procedurę izolacji frakcji mikrosomalnych rozpoczynano od oddzielenia osadu drożdżowego od pożywki poprzez wirowanie hodowli przez 10 minut przy prędkości 1000 x g. Następnie otrzymane pelety w postaci komórek drożdży oczyszczano z resztek pożywki poprzez dwukrotne płukanie w dH₂O i każdorazowe wirowanie (10 min, 1000 x g). Oczyszczone osady drożdżowe zawieszano w niewielkiej ilości (około 1 ml) buforu do homogenizacji drożdży z dodatkiem inhibitorów proteaz, a następnie przenoszono do 2 ml zakręcanych probówek typu Eppendorf zawierających 1 ml szklanych kulek o średnicy 0,45 – 0,5 mm. Próbkówki wraz z gotowymi mieszaninami poddawano cyklowi wytrząsań składającego się z 10-krotnego wytrząsania przez 30 sekund przerywanego 30 sekundowymi odstępami oraz 5 minutową przerwą z inkubacją na lodzie po 5-ciu seriach. Do wytrząsania wykorzystywano Mini Bead Beater-8 (Biospec Product). Uzyskane rozbite komórki drożdżowe przenoszono do 50 ml probówek typu Falcon, uzupełniano buforem do homogenizacji drożdży do objętości 20 ml i wirowano przez 10 minut przy prędkości 1000 x g. Uzyskane supernatanty przesączano przez gazę Miracloth do probówek wirówkowych, które kolejno poddawano dwugodzinnemu wirowaniu przy prędkości 100000 x g w ultrawirówce Beckman L-70 (Beckman). Osady powstałe po wirowaniu, zawierający frakcje mikrosomalne, przemywano buforem fosforanowym (0,1 M; pH 7,2), a następnie zawieszano go w niewielkiej ilości tego buforu.

Przed zamrożeniem izolatów w -80 °C i przechowywaniem ich w tej temperaturze do czasu dalszych analiz, pobierano ich alikwoty w celu określenia zawartości fosfatydylocholiny. Stężenie fosfatydylocholiny w homogenatach było określane poprzez wykonanie kolejno: ekstrakcji lipidów metodą Bligh i Dyer, rozdziału lipidów frakcji chloroformowych przy pomocy chromatografii cienkowsarstwowej (układ polarny) oraz pomiarze zawartości kwasów tłuszczowych w wyizolowanym PC poprzez analizę na chromatografii gazowej (zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.16.4).

3.17.3. Synteza [¹⁴C]acylo-CoA/acylo-CoA wykorzystywanych do reakcji enzymatycznych

Acylo-CoA, wykorzystane jako jeden z egzogennych substratów w reakcjach *in vitro*, syntetyzowano dla potrzeb niniejszej pracy według zmodyfikowanej procedury opisanej przez Sánchez i in. (1973).

Procedura syntezy rozpoczynała się od odparowania do sucha pod strumieniem azotu w łaźni piaskowej o temperaturze 37 °C rozpuszczalnika, w którym rozpuszczone było 5 μmol pożądanego, znakowanego węglem ¹⁴C kwasu tłuszczowego/kwasu tłuszczowego. W celu dokładnego pozbycia się ewentualnych resztek wody, których obecność może doprowadzić do niepowstania bezwodnika kwasu tłuszczowego, który jest głównym produktem pośrednim syntezy, do próbówki dwukrotnie dodawano 100 ul benzenu, który następnie odparowywano. Kwas tłuszczowy znajdujący się w próbówce dokładnie rozpuszczano w 500 ul dichlorometanu, dodawano 6 ul etyloaminy, dokładnie mieszano, przedmuchiwano azotem, a następnie inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po inkubacji, do mieszaniny dodawano 4 ul chloromrówczanu etylu i rozpoczynano kolejną dwugodzinną inkubację w temperaturze pokojowej, bez dostępu do światła. Po zakończeniu inkubacji cały rozpuszczalnik odparowywano w strumieniu azotu, a powstały osad rozpuszczano w 1,5 ml tetrahydrofuranu przy pomocy jednogodzinnej sonifikacji. Mieszaninę wirowano przez 4 minuty z prędkością 1000 x g. Powstały supernatant przenoszono do nowych probówek, natomiast osad ponownie poddawano sonifikacji w obecności 1 ml tetrahydrofuranu, wirowano, a następnie supernatant przenoszono do próbówki z supernatantem uzyskanym podczas poprzedniego wirowania. Zebrane supernatanty odparowywano do sucha pod strumieniem azotu. Otrzymany osad rozpuszczano w 300 ul tetrahydrofuranu, do którego dodawano 1 ml schłodzonego 0,1 M KHCO₃ zawierającego uprzednio rozpuszczone 20 mg koenzymu A. Przygotowany roztwór inkubowano przez 90 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Po upływie określonego czasu, pod strumieniem azotu odparowywano tetrahydrofuran i powoli, kroplami dodawano 2 M kwas solny, aż do zobojętnienia roztworu, który był obserwowalny poprzez powstanie zmętnienia i wytrącanie precipitatu, którym był syntetyzowany [¹⁴C]acylo-CoA/acylo-CoA. W celu otrzymania klarownego, oczyszczonego osadu, mieszaninę wirowano (4 min, 1000 x g), a osad płukano dwukrotnie w 1 ml 0,1 M HCl oraz dwukrotnie w 2 ml eteru dietylowego. Pozostałości lotnych odczynników usuwano poprzez odpipetowanie oraz odparowanie resztek pod strumieniem azotu. Ostatecznie

uzyskany osad rozpuszczano w dH₂O. Tak przygotowany [¹⁴C]acylo-CoA/acylo-CoA przechowywano w -80 °C, a rozmrażano jedynie na czas przygotowania mieszanin reakcyjnych do testów enzymatycznych, trzymając go na lodzie.

Do określenia stężenia syntetyzowanego [¹⁴C]acylo-CoA/acylo-CoA zaraz po syntezie pobierano jego alikwoty, które kolejno poddawano transmetylacji oraz analizie na chromatografii gazowej. W celu określenia radioaktywności syntetyzowanego związku ([¹⁴C]acylo-CoA), jego alikwoty były pobierane do analiz wykonanych przy pomocy licznika scyntylicyjnego Beckman LS6000TA (Beckman).

3.17.4. Warunki reakcji enzymatycznych *in vitro* typu 'forward' – do przodu

W zależności od reakcji enzymatycznych *in vitro* jako źródło badanych enzymów wykorzystywano frakcje mikrosomalne wyizolowane z tkanek roślinnych (liści i korzeni) oraz nasion zebranych na trzech różnych stadiach rozwojowych, a także z linii drożdży posiadających wektory wraz ze sklonowanymi sekwencjami kodującymi poszczególne warianty CsLPEAT1 oraz CsLPEAT2.

W pierwszej kolejności wykonany został test weryfikujący jakie lizofosfolipidy (akceptory grup acylowych) mogą być utylizowane przez enzymy znajdujące się w wyizolowanych frakcjach mikrosomalnych. W tym celu do 1,5 ml probówek typu Eppendorf odpowiednio dodawano 5 nmol egzogenego, rozpuszczonego w chloroformie lizolipidu: *sn*-1-18:1-LPA, *sn*-1-18:1-LPC, *sn*-1-18:1-LPE, *sn*-1-18:1-LPI lub *sn*-1-18:1-LPS. Do potwierdzenia aktywności LPEAT kodowanej przez sklonowane sekwencje obecne w systemie drożdżowym wykorzystywano jedynie 5 nmol *sn*-1-18:1-LPE. Po odczekaniu aż chloroform odparuje, pozostały osad dokładnie rozpuszczano w określonej ilości 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,2 (tak, aby jego wyjściowe stężenie w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 40 mM). Do probówek kolejno dodawano taką ilość dH₂O, aby ostatecznie objętość mieszaniny stanowiła 100 µl, oraz 5 nmol egzogenego donora grup acylowych - [¹⁴C]18:1-CoA. Całość intensywnie wytrząsano, a następnie rozpoczynano reakcję enzymatyczną poprzez dodanie alikwotów frakcji mikrosomalnych otrzymanych odpowiednio z danego stadium rozwojowego nasion lub tkanek roślinnych, bądź drożdży (do tego testu wykorzystano alikwoty frakcji mikrosomalnych zawierające 1 nmol mikrosomalnego PC). Gotowe próbki inkubowano przez określony czas i w określonej temperaturze w termomikserze Compact 5350 (Eppendorf) z wytrząsaniem 1250 obrotów/minutę. Po upływie określonego czasu

reakcje były zatrzymywane poprzez dodanie kolejno: 3,75 ml mieszaniny chloroform: metanol (1:2; v:v), 1,25 ml 0,15 M kwasu octowego oraz 1,25 ml chloroformu. Po dokładnym wymieszaniu uzyskane mieszaniny poddawano wirowaniu (2 min, 10000 x g) w celu uzyskania dwóch warstw. Warstwy dolne, chloroformowe przenoszono do szklanych probówek. Następnie uzyskane ekstrakty rozdzielano przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej z zastosowaniem polarnego układu rozwijającego (3.16.3). Rozdzielone klasy lipidów wizualizowano, identyfikowano na podstawie wykorzystanych wzorców znakowanych węglem ^{14}C i określano ich ilość przy pomocy autoradiografu (Instant Imager; Packard Instruments Co.).

Wyniki powyższego eksperymentu pozwoliły wskazać jakie acylotransferazy typu acylo-CoA:lizofosfolipid są obecne w analizowanych tkankach *C. sativa*, oraz które z nich wykazują na tyle wysoką aktywność, aby było możliwe ich dokładniejsze zbadanie. Na podstawie uzyskanych wyników dalsze badania prowadzone zostały dla enzymów typu LPCAT, LPEAT oraz LPAAT.

I. Optymalizacja parametrów reakcji enzymatycznej prowadzonej przez enzymy LPLAT obecne w nasionach *Camelina sativa*

Przed rozpoczęciem docelowych badań określających specyficzność substratową badanych acylotransferaz obecnych w nasionach *C. sativa*, względem różnych donorów grup acylowych przeprowadzona została optymalizacja parametrów reakcji *in vitro*. Sprawdzone jak na aktywność tych enzymów kolejno wpływają takie czynniki jak:

- ilość frakcji mikrosomalnej; testy przeprowadzono dla alikwotów tej frakcji zawierających; 0,1; 0,2; 0,5 oraz 1 nmol mikrosomalnego PC;
- czas reakcji; badany w zakresie 10 – 60 minut
- temperatura; badana w zakresie 10 – 60 °C
- pH i rodzaj buforu; w testach wykorzystano 0,1 M buforu o pH w zakresie 5,5 – 12,0:
 - * bufor fosforanowy (pH 5,5 – 8,0),
 - * bufor Tris-HCl (pH 8,0 – 10,0),
 - * bufor $\text{NaHCO}_3\text{-NaOH}$ (pH 10,0 – 11,0),
 - * bufor $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$ (pH 11,0 – 12,0)
- obecność jonów; testowano wpływ potasu (KCl), magnezu (MgCl_2) i wapnia (CaCl_2); odpowiednie stężenia tych jonów przygotowywano w 0,1 M buforze

HEPES o pH 7,2; tak aby ich końcowe stężenia w środowisku reakcji wynosiły odpowiednio dla jonów dwuwartościowych: 0,05; 0,25; 0,5 oraz 2 mM, a dla jonów jednowartościowych: 0,5; 1 oraz 2 mM.

Do reakcji optymalizacji wykorzystywano 5 nmol odpowiedniego, egzogenego lizofosfolipidu: *sn*-1-18:1-LPA, *sn*-1-18:1-LPC lub *sn*-1-18:1-LPE, jako akceptora grup acylowych oraz [¹⁴C]18:1-CoA, jako donora tych grup. W testach wykorzystywano frakcje mikrosomalne wyizolowana z nasion *C. sativa* z II stadium rozwojowego. Reakcje przeprowadzano, zatrzymywano oraz jej wyniki analizowano zgodnie z procedurą opisaną w poprzednim podrozdziale.

W badaniach wpływu optymalizowanych czynników (przeprowadzanych w kolejności wymienionej powyżej) uwzględniano wyniki optymalizacji już przeprowadzonych. Wyjątek stanowił rodzaj i pH buforu; we wszystkich testach, z wyjątkiem optymalizacji tego parametru, wykorzystywany był 0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,2, który również uprzednio został wykorzystany podczas izolacji frakcji mikrosomalnej oraz jego wartość pH jest zbliżona do pH występującego w środowisku naturalnym badanych enzymów.

II. Określenie zdolności do acylacji pozycji *sn*-1 oraz *sn*-2 przez enzymy o aktywności LPCAT obecne w nasionach *Camelina sativa*

Dla enzymów typu LPCAT przeprowadzona została analiza specyficzności do acylacji pozycji *sn*-1 bądź *sn*-2. W tym celu do reakcji jako akceptory grup acylowych wykorzystano eterowe analogi 18:1-LPC w postaci *sn*-1-18:1-O-GPC, będącego odpowiednikiem *sn*-1-18:1-LPC oraz *sn*-2-18:1-O-GPC będącego odpowiednikiem *sn*-2-18:1-LPC. Oprócz odpowiedniego eterowego analogu LPC (w ilości 5 nmol/test), mieszaniny reakcyjne zawierały: 0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,2 (końcowa objętość mieszanin wynosiła 100 ul), 5 nmol [¹⁴C]18:1-CoA oraz alikwoty frakcji mikrosomalnych uzyskane z nasion z II stadium rozwojowego, zawierające 0,2 nmol mikrosomalnego PC. Reakcje prowadzano przez 30 minut w 30 °C. Pozostałe etapy procedury przeprowadzano zgodnie z opisem znajdującym się powyżej.

III. Określenie wpływu preinkubacji frakcji mikrosomalnej na aktywność enzymów LPCAT obecnych w nasionach *Camelina sativa*

W celu określenia stabilności enzymów typu LPCAT, przed rozpoczęciem właściwych testów enzymatycznych próbówki zawierające frakcje mikrosomalne z nasion *C. sativa* z II stadium rozwojowego, inkubowano przez 0, 5, 15, 20 oraz 60 minut w temperaturze 30 °C. Następnie po upływie wyznaczonego czasu preinkubacji, alikwoty tych frakcji zawierające 0,2 nmol mikrosomalnego PC dodawano do mieszanin reakcyjnych. Mieszaniny te zawierały po 5 nmol *sn*-1-18:1-LPC i 5 nmol [¹⁴C]18:1-CoA rozpuszczonych w 0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,2 (końcowa objętość mieszanin po dodaniu frakcji mikrosomalnych wynosiła 100 µl). Reakcje prowadzono w 30 °C przez okres 30 minut. Dalszą część analizy prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w na początku podrozdziału.

IV. Optymalizacja parametrów reakcji enzymatycznej przeprowadzanej przez enzymy o aktywności LPEAT obecne w liściach *Camelina sativa* hodowanej w doniczkach na podłożu hodowlanym

Przed przeprowadzeniem testów określających aktywność oraz specyficzność substratową enzymów LPEAT obecnych w tkankach wegetatywnych, sprawdzono czy parametry reakcji enzymatycznej wyznaczone dla LPEATów obecnych w nasionach mogą być wykorzystane w tych testach. W tym celu sprawdzono jak na aktywność enzymów LPEAT obecnych w liściach z hodowli *in vivo* wpływać będzie:

- ilość frakcji mikrosomalnej; testy przeprowadzono dla alikwotów tej frakcji zawierających: 0,1; 0,2; 0,5; 1 oraz 1,5 nmol mikrosomalnego PC;
- czas reakcji; badany w zakresie 10 – 120 minut;
- pH i rodzaj buforu; w testach wykorzystywano 0,1 M bufor o pH w zakresie 5,5 – 11,0:
 - bufor fosforanowy (pH 5,5 – 8,0),
 - bufor Tris-HCl (pH 8,0 – 10,0),
 - bufor NaHCO₃-NaOH (pH 10,0 – 11,0).

W testach jako akceptor kwasów tłuszczowych wykorzystywano egzogenną *sn*-1-18:1-LPE (5 nmol/test) oraz jako donor kwasów tłuszczowych [¹⁴C]18:1-CoA (5 nmol/test). Reakcje były prowadzone w 30 °C, a temperatura nie była parametrem poddawany optymalizacji, ponieważ w dalszych badaniach specyficzność substratowa

enzymów LPEAT była sprawdzana względem jej różnych wartości. Kolejne etapy reakcji enzymatycznej prowadzono zgodnie opisem umieszczonym powyżej, a wyniki każdej z reakcji optymalizacji uwzględniano w kolejno następujących po sobie testach.

V. Określenie aktywności oraz specyficzności substratowej enzymów LPLAT obecnych w tkankach *Camelina sativa*

Testy preferencji badanych enzymów typu LPLAT względem różnych donorów grup acylowych zostały przeprowadzone dla wszystkich trzech stadiów rozwojowych nasion *C. sativa* oraz dla liści hodowanych w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Do analizy wykorzystano 10 różnych znakowanych węglem ^{14}C cząsteczek acylo-CoA: $[1-^{14}\text{C}]10:0\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]12:0\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]14:0\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]16:0\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]18:0\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]18:1\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]18:2\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]18:3\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]20:1\text{-CoA}$ oraz $[1-^{14}\text{C}]22:1\text{-CoA}$. Do reakcji dodawano odpowiednio, w zależności od badanego enzymu, 5 nmol egzogenego: *sn-1-18:1-LPA*, *sn-1-18:1-LPC* lub *sn-1-18:1-LPE* oraz 5 nmol testowanego $[^{14}\text{C}]$ acylo-CoA. Do wszystkich mieszanin reakcyjnych dodawano 0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,2 (jego końcowe stężenie wynosiło 40 mM) oraz odpowiednią ilość dH_2O , tak aby końcowa objętość mieszanin reakcyjnych wynosiła 100 μl . Mieszaniny reakcyjne zawierały również alikwoty testowanych frakcji mikrosomalnych zawierające 0,2 nmol mikrosomalnego PC w przypadku testów analizujących enzymy typu LPCAT lub 0,5 nmol mikrosomalnego PC w przypadku testów analizujących enzymy typu LPEAT oraz LPAAT. Reakcje prowadzono w temperaturze 30 °C przez 30 minut dla enzymów o aktywności LPCAT i LPAAT oraz przez 60 minut dla enzymów LPEAT. Pozostałe etapy analizy przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną powyżej.

W przypadku analiz zależności aktywności enzymów LPEAT od temperatury (w zakresie 10-40 °C) wykorzystanych zostało pięć różnych $[^{14}\text{C}]$ acylo-CoA: $[1-^{14}\text{C}]16:0\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]18:0\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]18:1\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]18:2\text{-CoA}$, $[1-^{14}\text{C}]18:3\text{-CoA}$ oraz frakcje mikrosomalne wyizolowane z II stadium rozwojowego nasion, z liści z hodowli *in vivo*, z liści z hodowli *in vitro* oraz z korzeni z hodowli *in vitro* roślin *C. sativa*. Pozostałe parametry reakcji były takie same jak dla reakcji LPEAT opisanych powyżej.

VI. Testy „selektywności” wykazywanej przez enzymy LPLAT obecne w tkankach *Camelina sativa*

Do przeprowadzenia testów selektywności wykorzystywano pięć różnych acylo-CoA względem, których badane enzymy wykazywały najwyższą aktywność tj.: 16:0-CoA, 18:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA, 18:3-CoA. Do reakcji przygotowywano mieszaniny składającą się z 1 nmol każdego z powyższych donorów, przy czym zawsze tylko jeden z nich był znakowany węglem ^{14}C . Eksperymenty przeprowadzano w dwóch wariantach: bez dodatku BSA, tak jak we wszystkich poprzednich testach enzymatycznych oraz z dodatkiem do każdej reakcji 0,2 mg BSA. Dodatek BSA miał na celu zastąpienie nim w reakcjach *in vitro* białka wiążącego acylo-CoA (ACBP, ang. acyl-CoA binding protein) występującego naturalnie w tkankach roślinnych i utworzenie warunków reakcji jak najbardziej zbliżonych do warunków *in vivo*. Do przeprowadzenia reakcji zastosowano parametry optymalne dla każdego z testowanych enzymów, a dalsza procedura została wykonana zgodnie z opisem znajdującym się na początku podrozdziału.

VII. Optymalizacja parametrów reakcji enzymatycznej przeprowadzanej przez izoenzymy CsLPEAT wprowadzone do systemu drożdżowego

Po potwierdzeniu aktywności typu LPEAT przez białka kodowane przez sklonowane sekwencje genowe, kolejnym etapem analiz było określenie optymalnych parametrów reakcji enzymatycznej przeprowadzanej przez te białka. W tym celu sprawdzono jak na aktywność badanych enzymów wpływa:

- ilość frakcji mikrosomalnej; testy przeprowadzano dla alikwotów zawierających od 0,5 do 3,5 nmol mikrosomalnego PC;
- czas reakcji; badany w zakresie 15 – 120 minut.

Temperatura reakcji nie była optymalizowana na tym etapie badań, ponieważ była jednym z parametrów testowanych w badaniach specyficzności i aktywności izoenzymów CsLPEAT. Do wszystkich reakcji wykorzystywano 0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,2, tak aby stworzyć warunki reakcji zbliżone do środowiska naturalnego tych enzymów obecnych w komórkach roślinnych. Jako egzogenne substraty do reakcji optymalizacji wykorzystywano 5 nmol *sn*-1-18:1-LPE oraz 5 nmol [$1\text{-}^{14}\text{C}$]18:1-CoA. Reakcje prowadzono w 30 °C. Pozostałe etapy procedury przeprowadzano tak samo jak dla enzymów obecnych w tkankach roślinnych.

VIII. Określenie aktywności oraz specyficzności substratowej izoenzymów CsLPLAT wprowadzonych do systemu drożdżowego

Do przeprowadzenia charakterystyki biochemicznej izoenzymów CsLPEAT kolejno wykonano szereg testów enzymatycznych. W każdej z reakcji stosowano parametry ustalone podczas optymalizacji, które były charakterystyczne dla każdego z badanych wariantów izoenzymów. W testach, w których nie badano wpływu temperatury, reakcje były prowadzone w 30 °C.

W pierwszej kolejności określano aktywności każdego z izoenzymów CsLPEAT względem pięciu różnych [¹⁴C]acylo-CoA ([¹⁻¹⁴C]16:0-CoA, [¹⁻¹⁴C]18:0-CoA, [¹⁻¹⁴C]18:1-CoA, [¹⁻¹⁴C]18:2-CoA, [¹⁻¹⁴C]18:3-CoA) w zależności od temperatury (10 °C, 20 °C, 30 °C oraz 40 °C). Następnie określono preferencję tych enzymów względem grup acylowych posiadających poniżej 16 oraz powyżej 20 atomów węgla w cząsteczce ([¹⁻¹⁴C]10:0-CoA, [¹⁻¹⁴C]12:0-CoA, [¹⁻¹⁴C]14:0-CoA, [¹⁻¹⁴C]20:0-CoA [¹⁻¹⁴C]20:1-CoA oraz [¹⁻¹⁴C]22:1-CoA). Do obu powyżej opisanych rodzajów testów jako akceptor kwasów tłuszczowych wykorzystywano *sn*-1-18:1-LPE (5 nmol/test). W tych testach wykorzystywano również po 5 nmol badanych donorów kwasów tłuszczowych – wymienionych powyżej acylo-CoA. W kolejnych testach określano specyficzność substratową badanych enzymów względem innych (niż wykorzystywane w testach opisanych powyżej) rodzajów LPE tj.: *sn*-1-16:0-LPE oraz *sn*-1-18:2-LPE (każdy – 5 nmol/test). Jako donory grup acylowych w tych reakcjach wykorzystywano pięć różnych [¹⁴C]acylo-CoA tj.: [¹⁻¹⁴C]16:0-CoA, [¹⁻¹⁴C]18:0-CoA, [¹⁻¹⁴C]18:1-CoA, [¹⁻¹⁴C]18:2-CoA, [¹⁻¹⁴C]18:3-CoA (każdy po 5 nmol/test – dodawany w kombinacji z jednym z testowanych LPE). Wszystkie inne parametry testów były takie jak ustalono wcześniej dla każdego z izoenzymów CsLPEAT. Pozostałe etapy reakcji przeprowadzane były zgodnie z procedurą opisaną na początku podrozdziału.

3.17.5. Warunki reakcji enzymatycznych *in vitro* typu „*backward* – do tyłu”

Badania aktywności i specyficzności substratowej w reakcjach typu *backward* zostały przeprowadzone dla enzymów LPLAT obecnych w badanych tkankach roślinnych, a więc do testów wykorzystano frakcje mikrosomalne otrzymane z liści z warunków *in vivo* oraz *in vitro*, a także z trzech stadiów rozwojowych nasion. Do probówek reakcyjnych kolejno dodawano po 1 mg BSA oraz po 0,2 μmol koenzymu A. Roztwory wodne obu odczynników były przygotowywane wcześniej, a do probówek reakcyjnych

dodawano ich alikwoty zawierające wskazane powyżej ich ilości. Następnie do probówek dodawano po 10 nmol jednego z [¹⁴C]acylo-CoA: [¹⁴C]16:0-CoA, [¹⁴C]18:1-CoA, [¹⁴C]18:2-CoA lub [¹⁴C]18:3-CoA. Jedynie w przypadku testów „selektywności” dodawana była mieszanina 18:1-CoA, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA, spośród których tylko jeden był znakowany węglem ¹⁴C. Do tego rodzaju reakcji enzymatycznych dodawano po 3 nmol każdego z acylo-CoA. Następnie do połowy przygotowanych prób dodawano po 0,5 μmol DTNB (kwas 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesowy) rozpuszczonego w 40 ul 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,2, a do drugiej połowy tak samo przygotowanych prób dodawano taką samą objętość samego buforu. Tak przygotowane mieszaniny reakcyjne były kolejno uzupełniane H₂O, tak aby ich końcowa objętość (po dodaniu frakcji mikrosomalnych) wynosiła 100 ul. Reakcję rozpoczynano poprzez dodanie alikwotów frakcji mikrosomalnych zawierających 5 nmol mikrosomalnego PC. Probówki wraz z całą mieszaniną reakcyjną umieszczano na 60 minut w termomikserze Thermomixer Compact 5350 (Eppendorf) z ustawionym wytrząsaniem na 1250 obrotów/minutę oraz temperaturą 30 °C. Po upływie wskazanego czasu inkubacji reakcje zatrzymywano, uzyskane frakcje chloroformowe rozdzielano w układzie polarnym przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej, a wyniki analizowano korzystając z autoradiografu (Instant Imager; Packard Instruments Co.). Dokładna procedura zatrzymywania reakcji enzymatycznych oraz dalszych etapów analizy została opisana w rozdziale 3.14.4 i jest taka sama, jak dla reakcji typu *forward*.

Aktywność reakcji *backward* katalizowanych przez enzymy LPLAT była obliczana poprzez odjęcie ilości zsyntetyzowanych produktów w reakcjach z dodatkiem DTNB (hamującego reakcję do tyłu przeprowadzaną przez enzymy LPLAT, poprzez kowalencyjne wiązanie i wychwytywanie koenzymu A) od ilości *de novo* zsyntetyzowanych [¹⁴C]PL w reakcjach bez dodatku DTNB. Dokładny opis oraz schemat sposobu obliczania intensywności reakcji typu *backward* przeprowadzanych przez enzymy typu LPLAT oraz pozostałe reakcje wpływające na remodelowanie fosfolipidów, a także czas wymiany grup acylowych opisany został w rozdziale zawierającym wyniki tego typu doświadczeń.

3.18. Analiza statystyczna

Wyniki doświadczeń przedstawiono jako wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi (SD).

Do określenia istotności różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi dla dwóch niezależnych grup wykorzystano test t-Studenta. Natomiast do oznaczenia statystycznych różnic dla wyników zależnych grup przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie zastosowano test Tukey. Analizę statystyczną przeprowadzono przy wykorzystaniu programu Exel (Microsoft).

4. WYNIKI

4.1. Analiza zawartości oraz składu acylolipidów w różnych tkankach *Camelina sativa*

4.1.1. Całkowita zawartości acylolipidów w nasionach *Camelina sativa* na różnych etapach ich rozwoju oraz skład kwasów tłuszczowych obecnych w tych lipidach

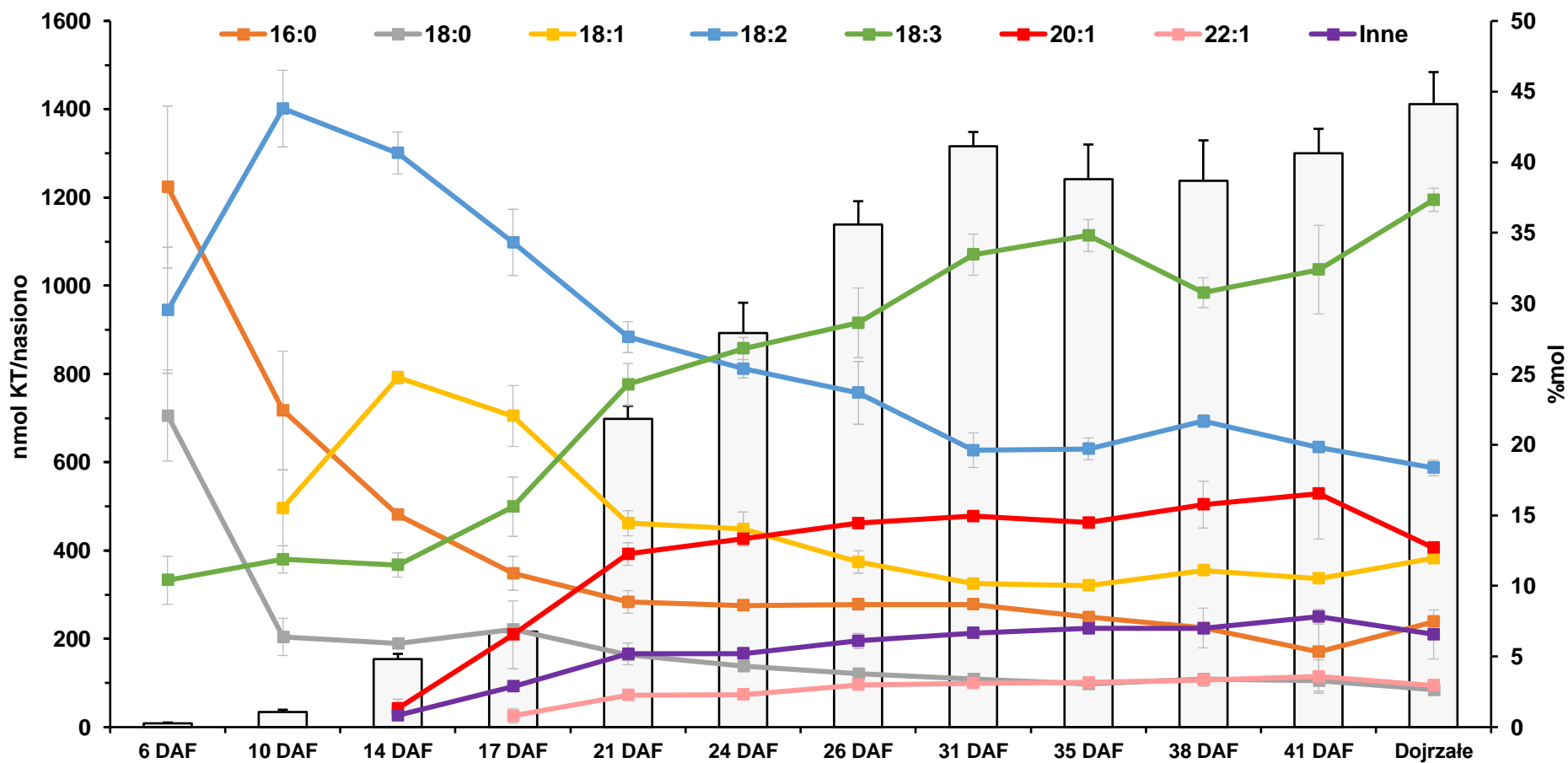
Badania dotyczące analizy całkowitej zawartości acylolipidów oraz ilości poszczególnych kwasów tłuszczowych występujących w tych lipidach obecnych w nasionach *C. sativa* rozpoczęto od nasion zebranych 6 dni po rozpoczęciu kwitnięcia (6 DAF) i kontynuowano w odstępach 3-5 dniowych do 41 DAF. Dodatkowo analizie poddano dojrzałe nasiona zebrane 60 DAF. Wyniki otrzymanych badań zostały przedstawione na Rys. 9, gdzie całkowita zawartość określona została jako ilość nmol kwasów tłuszczowych w przeliczeniu na jedno nasiono, natomiast zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych jest wyrażona jako %mol wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w acylolipidach nasion w danym dniu analizy. Szczegółowa analiza pięciu, wybranych stadiów rozwojowych został już dokładnie opisana w ramach mojej pracy magisterskiej. Jednakże, ze względu na przeprowadzenie poprawnej analizy i interpretacji dalszych wyników niezbędnym było zamieszczenie tych danych, rozszerzonych o 7 dodatkowych stadiów rozwojowych nasion *C. sativa*.

Akumulacja acylolipidów w pierwszych dwóch badanych punktach rozwoju nasion okazała się być znikoma i wynosiła odpowiednio dla materiału zebranego w 6 DAF oraz w 10 DAF poniżej 1% oraz 3% ostatecznej zawartości lipidów obecnych w dojrzałych nasionach. Między 10 i 17 DAF, zawartość lipidów w nasionach wzrosła do około 16% końcowej zawartości. Wzmoczony etap akumulacji acylolipidów rozpoczynał się od 17 DAF, gdzie w przeciągu czterech kolejnych dni zawartość acylolipidów wzrosła aż do 50% ich wartości końcowej. W analizach przeprowadzonych 31 DAF ich ilość stanowiła zaś 93% ostatecznej zawartości w dojrzałych nasionach. Po 31 dniu od rozpoczęcia kwitnienia proces akumulacji lipidów znacząco spowolnił lub być może już nie następował, jako że zawartość acylolipidów w nasionach poddanych analizom pomiędzy 31, a 60-tym DAF oscylowała w granicach ostatecznej ich zawartości w dojrzałych nasionach, czyli około 1400 nmol KT/nasiono (Rys. 9).

Analiza składu kwasów tłuszczowych obecnych w acylolipidach nasion *C. sativa* na różnych etapach ich rozwojowych wykazała występowanie aż 13 różnych kwasów tłuszczowych. Obecność wyłącznie kwasów: palmitynowego (16:0), stearynowego

(18:0), linolowego (18:2) oraz linolenowego (18:3) odnotowano dla nasion zabranych w 6 DAF. W 10 DAF dodatkowo wykrywany był kwas oleinowy (18:1). Pozostałe ze wzmiankowanych 13 kwasów tłuszczowych wykrywane były dopiero od 14 lub 17 DAF. Sześć z nich, należących do bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (20:0, 20:2, 20:3, 22:0, 24:0 oraz 24:1) występowało w niewielkich ilościach, w związku z tym były one zsumowywane i określane jako pula „inne”. Dokładna zawartość tych kwasów tłuszczowych oraz wszystkich pozostałych, które wykryto w nasionach *C. sativa* została przedstawiona w Tabeli A1 oraz A2 znajdujących się w aneksie niniejszej pracy.

Dominującymi kwasami tłuszczowymi acylolipidów analizowanych nasion na praktycznie wszystkich etapach ich rozwoju, z wyjątkiem 6 DAF, były kwasy: linolowy (18:2) oraz linolenowy (18:3), należące do puli kwasów PUFA. Wraz z rozwojem nasiona względna zawartość kwasu linolowego malała z około 44% odnotowanych w 10 DAF do około 18% w nasionach dojrzałych. Odwrotną tendencję obserwowano dla kwasu linolenowego, którego ilość znacząco wzrastała z początkowych 10% do 37% na ostatnich etapach ich rozwoju. Jednonienasycone kwasy tłuszczowe takie jak kwas oleinowy oraz kwas gondolowy (20:1) stanowiły drugą dominującą pulę kwasów tłuszczowych na przestrzeni wszystkich analizowanych etapów rozwoju nasion (począwszy od 10/14 DAF). Największą względną zawartość kwasu oleinowego odnotowano w 14 DAF, gdzie stanowił on 25% wszystkich kwasów tłuszczowych, natomiast do etapu dojrzałych nasion jego zawartość zmniejszyła się o połowę. Detekcja kwasu gondolowego możliwa była dopiero od 14 DAF. W dalszych etapach rozwoju nasion jego zawartość stopniowo wzrastała, stanowiąc ostatecznie 13% kwasów tłuszczowych acylolipidów dojrzałych nasion. Głównym kwasem nasyconym obecnym w nasionach *C. sativa* był kwas palmitynowy, którego zawartość w pierwszych etapach rozwoju była znacząca i wynosiła nawet do 38% kwasów obecnych w nasionach zebranych w 6 DAF. Wraz z rozwojem nasion jego względna ilość zmniejszyła się do 7,5% w dojrzałych nasionach. Dla kwasu stearynowego również odnotowano tendencję spadkową. Jego początkowa względna zawartość stanowiąca 22% zmalała do poniżej 3% wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w dojrzałych nasionach. Kwas erukowy (22:1) możliwy był do wykrycia dopiero po 17 DAF, a jego zawartość na żadnym z badanych etapów nie przekraczała 3%. W przypadku kwasów tłuszczowych obecnych w puli „inne” ich detekcja była możliwa od 14 DAF. Względna zawartość tych kwasów ostatecznie w dojrzałych nasionach stanowiła 7% wszystkich kwasów tłuszczowych.



Rys. 9. Całkowita zawartość lipidów (przedstawianych, jako suma nmol KT/nasiono; wykres słupkowy) oraz względna zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych (opisana jako %mol; wykres liniowy) w nasionach *C. sativa* w różnych etapach ich rozwoju. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). DAF – days after flowering (ang.) – dni po kwitnieniu, KT - kwasy tłuszczowe.

4.1.2. Względna zawartość poszczególnych klas lipidów w nasionach *Camelina sativa* na różnych etapach ich rozwoju

Szczegółowa analiza dotycząca zawartości poszczególnych klas lipidów oraz składu ich kwasów tłuszczowych została przeprowadzona dla pięciu stadiów rozwojowych, pomiędzy którymi odnotowano największe różnice w zmianie całkowitej zawartości acylolipidów. W związku z tym do analizy wykorzystano nasiona zebrane w 10, 17, 24 oraz 31 dniu od rozpoczęcia kwitnienia, a także nasiona dojrzałe. Poniżej przedstawione wyniki zostały już uprzednio opisane w ramach mojej pracy magisterskiej, jednakże są one niezbędne do właściwego przedstawienia dalszych danych i zrozumienia pełnego kontekstu pracy.

Wyniki dotyczące procentowego udziału poszczególnych klas lipidów zostały przedstawione w Tabeli 7 jako % sumy wszystkich lipidów nasion, a dokładnie % sumy całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych obecnych w acylolipidach nasion badanych na ich różnych etapach rozwoju. Dominującą klasą lipidów obecną w badanych nasionach były triacyloglicerole, z wyjątkiem pierwszego etapu rozwoju. W tym etapie (10 DAF) względna zawartość puli TAG była nieco mniejsza niż lipidów polarnych i stanowiła 42% sumy wszystkich lipidów. Wraz z rozwojem nasion zawartość TAG stopniowo wzrastała, osiągając ostatecznie prawie 93% całkowitej zawartości lipidów obecnych w dojrzałych nasionach. Zawartość lipidów polarnych była stosunkowo wysoka we wczesnych stadiach rozwoju nasion, gdzie w 10 DAF wynosiła 45% wszystkich lipidów, jednakże podczas kształtowania się nasion jej względna zawartość znacząco zmalała, stanowiąc ostatecznie jedynie około 3,7% lipidów dojrzałych nasion. Względna ilość puli diacylogliceroli wahała się od 2,1% do 0,6% pomiędzy 10 DAF, a stadium dojrzałych nasion. Względna zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (FA) zmniejszyła się z początkowej ilości około 8% odnotowanej w 10 i 17 DAF do 1,4% wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w lipidach dojrzałych nasionach. Pula estrów steroli (SE) nie uległa znaczącym zmianom w zakresie procentowego udziału w puli acylolipidów nasion, a jej zawartość wahała się w granicach 1,3-1,8%, bez wyraźnych tendencji. Klasą lipidów o najniższej zawartości były monoacyloglicerole, których względna zawartość oscylowała w granicach 0,2-0,3% wszystkich lipidów, z wyjątkiem 10 DAF, gdzie ich zawartość wynosiła 1%.

Tabela 7. Zawartość poszczególnych klas lipidów w nasionach *C. sativa* w różnych etapach ich rozwoju. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). DAG – diacyloglicerole, DAF – days after flowering (ang.) – dni po kwitnieniu, SE – estry steroli, FA – kwasy tłuszczowe, MAG – monoacyloglicerole, TAG – triacyloglicerole.

Etap rozwoju nasion	% sumy wszystkich lipidów nasion					
	Lipidy polarne	MAG	DAG	FA	TAG	SE
10 DAF	45,5 ± 12,8	1,0 ± 0,1	2,1 ± 0,9	7,5 ± 2,0	42,1 ± 13,2	1,8 ± 0,5
17 DAF	14,3 ± 1,3	0,2 ± 0,01	1,1 ± 0,3	8,0 ± 2,2	75,4 ± 3,6	1,0 ± 0,2
24 DAF	6,4 ± 0,1	0,3 ± 0,01	1,0 ± 0,2	4,5 ± 0,3	86,0 ± 0,1	1,8 ± 0,4
31 DAF	3,6 ± 0,6	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,1	4,2 ± 0,7	89,7 ± 1,8	1,6 ± 0,4
Dojrzałe	3,7 ± 0,6	0,3 ± 0,05	0,6 ± 0,3	1,4 ± 0,9	92,7 ± 1,9	1,3 ± 0,2

4.1.3. Skład kwasów tłuszczowych obecnych w dominujących klasach lipidów nasion *Camelina sativa* na różnych etapach ich rozwoju

Poniżej szczegółowo został opisanych skład kwasów tłuszczowych dwóch dominujących klas lipidów: triacylogliceroli oraz lipidów polarnych, których wyniki przedstawiono również w Tabeli 8. Dane dotyczące kompozycji pozostałych klas lipidów, nie są rozważane w dalszej części badań, a ich dokładna charakterystyka została już wcześniej opisana w mojej pracy magisterskiej. Jednakże, do wglądu dostępna jest względna zawartość kwasów tłuszczowych w tych klasach lipidów i znajduje się ona w Aneksie, w Tabeli A4.

Analiza składu kwasów tłuszczowych obecnych w puli triacylogliceroli, które stanowiły dominującą klasę lipidów podczas rozwoju nasion *C. sativa* wykazała obecność trzynastu różnych kwasów tłuszczowych. Odnotowane zmiany względnej zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w TAG odzwierciedlały zmiany wcześniej zaobserwowane dla tych związków w całkowitej puli kwasów tłuszczowych obecnych w acylolipidach nasion. W pierwszym terminie analizy (10 DAF) wykryto obecność tylko pięciu z kwasów tłuszczowych (16:0, 18:0, 18:1, 18:2 oraz 18:3), spośród których dominującymi kwasami były: oleinowy, linolowy oraz palmitynowy, stanowiące kolejno 34,4%, 31,3% oraz 24% wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w TAG w tym stadium rozwojowym. Na przestrzeni rozwoju nasion ich zawartość stopniowo zmniejszała się osiągając ostatecznie około 14,5%, 18,9% oraz 7,7%

w triacyloglicerolach dojrzałych nasion. Odwrotną tendencję odnotowano dla kwasu linolenowego, którego zawartość z początkowych 3,4% (10 DAF) istotnie wzrosła aż do 30,2% wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w TAG dojrzałych nasion. Względna zawartość kwasu stearynowego była najwyższa w triacyloglicerolach nasion z 17 DAF (9,4%), podczas gdy w pozostałych stadiach rozwojowych plasowała się w zakresie 4,4-6,9%. Detekcja długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w puli TAG była możliwa dopiero od 17 DAF. Dominującym długołańcuchowym kwasem tłuszczowym był kwas gondolowy (20:1), którego zawartość stopniowo wzrastała osiągając maksimum 20,1% w TAG nasion z 31 DAF, po czym jego względna zawartość w dojrzałych nasionach spadała do około 15,7% wszystkich kwasów tłuszczowych. Podobną tendencję odnotowano również dla kwasu erukowego oraz puli „inne”, gdzie ich zawartość początkowo wzrastała do 31 DAF osiągając odpowiednio 4,3% oraz 7,2%, a następnie spadała do 3,4% oraz 6% kwasów tłuszczowych obecnych w TAG dojrzałych nasion (Tabela 8). Do puli „inne” zostały przypisane takie kwasy tłuszczowe, których zawartość wynosiła poniżej 3,5% (20:0, 20:2, 20:3, 22:0, 24:0 oraz 24:1). Dokładna względna zawartość każdego z tych kwasów tłuszczowych została przedstawiona w Tabeli A3 znajdującej się w Aneksie.

Drugą wyróżniającą się pod względem zawartości klasą lipidów były lipidy polarne. W ich składzie wykryto obecność tylko sześciu kwasów tłuszczowych. Były to kwasy: palmitynowy, stearynowy, oleinowy, linolowy, linolenowy oraz gondolowy będący jedynym przedstawicielem bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w tej puli lipidów (Tabela 8). W pierwszym analizowanym stadium rozwoju nasion (10 DAF) dominującym kwasem tłuszczowym lipidów polarnych był kwas linolowy, którego względna zawartość wynosiła 46,8%. Wraz z rozwojem nasion ilość ta sukcesywnie malała, osiągając ostatecznie 18,9% w dojrzałych nasionach. Drugim z dominujących kwasów tłuszczowych lipidów polarnych na wczesnym etapie rozwoju nasion był kwas palmitynowy. Jego względna zawartość minimalnie wzrosła z 22,9% do 24,3% pomiędzy 10, a 24 DAF, a następnie wraz z rozwojem nasion ilość ta zmniejszyła się do 17,3% w dojrzałych nasionach. Podobną tendencję odnotowano dla kwasu linolenowego. Jego względna zawartość zwiększyła się, jednak znacznie gwałtowniej, potrajając swoją procentową zawartość (z około 15% do około 45%) w okresie między 10, a 31 DAF. Kolejno, pomiędzy 31 DAF, a pełną dojrzałością nasion względna zawartość 18:3 w puli kwasów tłuszczowych lipidów polarnych zmniejszyła się do 25,7%. Dla kwasu oleinowego zaobserwowano odwrotny trend. Między 10, a 31 DAF

jego zawartość zmniejszyła się z 11,5 do 7,4%. Natomiast pula lipidów polarnych obecna w dojrzałych nasionach zawierała ponad trzy razy więcej tego kwasu w stosunku do poprzedniego stadium (około 22,7%). Względna zawartość kwasu stearynowego oscylowała w stosunkowo stałym zakresie od 2,3% do maksymalnie 5,5%. Również zawartość kwasu gondolowego była stabilna i oscylowała w granicach 2,1-4,2%. Detekcja tego kwasu tłuszczowego w lipidach polarnych możliwa była dopiero po 17 DAF (Tabela 8).

Tabela 8. Zawartość kwasów tłuszczowych w wybranych klasach lipidów nasion *C. sativa* na różnych etapach ich rozwoju. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). DAF – days after flowering (ang.) – dni po kwitnieniu.

TRIACYLOGLICEROLE								
Etap rozwoju nasion	%mol							
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1	Inne
10 DAF	24,0±2,2	6,9±0,9	34,4±1,9	31,3 ±3,3	3,4±1,7	-	-	-
17 DAF	14,4±0,4	9,4±0,2	29,8±3,1	25,2±2,1	7,2±0,9	9,1±3,2	1,2±0,7	3,8±0,9
24 DAF	12,0±0,9	6,1±0,2	19,0±1,9	20,3 ±0,3	15,2±1,4	18,3±0,2	3,2±0,5	6,0±0,5
31 DAF	10,7±1,3	4,4±0,5	13,2±0,6	16,6 ±0,4	23,4±3,5	20,1±0,6	4,3±0,03	7,2±0,2
Dojrzałe	7,7±0,7	3,7±0,6	14,5±1,3	18,9 ±1,9	30,2±2,6	15,7±2,8	3,4±1,3	6,0±1,9

LIPIDY POLARNE						
Etap rozwoju nasion	%mol					
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1
10 DAF	22,9 ± 4,6	3,8 ± 0,1	11,5 ± 0,2	46,8 ± 2,3	15,0 ± 2,2	-
17 DAF	19,4 ± 3,5	3,9 ± 1,1	12,3 ± 1,2	35,5 ± 2,1	26,6 ± 1,9	2,3 ± 0,5
24 DAF	24,3 ± 2,4	4,3 ± 0,2	8,2 ± 1,5	25,7 ± 0,7	34,4 ± 0,4	3,1 ± 0,03
31 DAF	17,5 ± 0,3	2,3 ± 0,04	7,4 ± 0,1	25,6 ± 0,4	45,1 ± 0,7	2,1 ± 0,1
Dojrzałe	17,3 ± 0,8	5,5 ± 0,1	22,7 ± 1,4	24,6 ± 1,1	25,7 ± 3,7	4,2 ± 0,2

4.1.4. Zmiana całkowitej zawartość lipidów polarnych oraz zawartości PC, PE i PA podczas rozwoju nasion *Camelina sativa* oraz względna zawartości kwasów tłuszczowych w analizowanych fosfolipidach

Pomimo spadku względnej zawartości lipidów polarnych w nasionach *C. sativa* podczas ich rozwoju (Tabela 7), bezwzględna zawartość tych lipidów wzrosła prawie czterokrotnie między 10 DAF, a 24 DAF. W dalszym rozwoju nasion tj. pomiędzy 24 DAF, a 31 DAF zaobserwowano około 18-nasto procentowy spadek tej zawartości, a dalej utrzymywanie się takiej zawartości już do końca rozwoju nasion i osiągnięcia przez nie dojrzałości (Rys. 10).

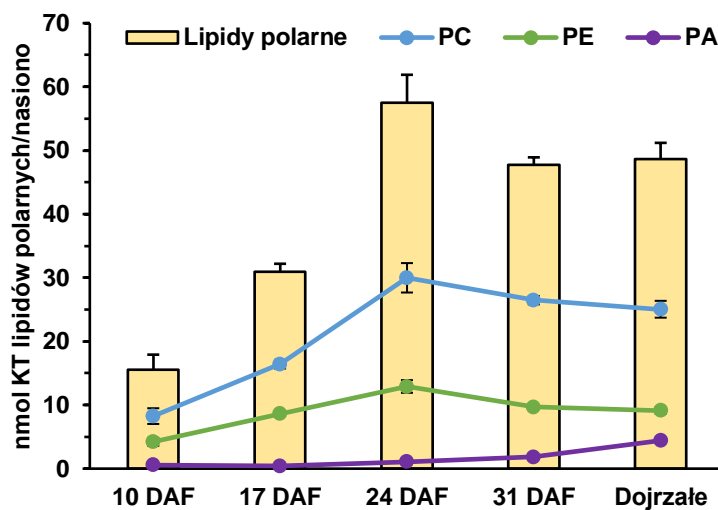
Analizie poddano również zawartość i skład reprezentantów klas fosfolipidów, będących głównymi produktami enzymów LPLAT, obiektów badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy. W badaniach uwzględniono profil lipidowy fosfatydylocholine, fosfatydyloetanolaminy oraz kwasu fosfatydowego na przestrzeni pięciu badanych stadiów rozwoju nasion.

Fosfatydylocholina była dominującym fosfolipidem w puli lipidów polarnych. Jej względna zawartość dla każdego badanego etapu rozwoju nasion była podobna i stanowiła około 53% wszystkich lipidów polarnych (Rys. 10). Podstawowym kwasem tłuszczowym wykrywanym w puli PC, był kwas linolowy, którego względna zawartość wraz z rozwojem nasion stopniowo zmniejszyła się; z 51% (10 DAF) do 31% (nasiona dojrzałe). Drugim dominującym kwasem tłuszczowym występującym w puli PC dojrzałych nasion był kwas oleinowy, który stanowił 29,4%. We wcześniejszych stadiach rozwojowych jego ilość oscylowała w granicach 15-17% (10-24 DAF) z wyjątkiem stadium 31 DAF, gdzie odnotowano gwałtowny spadek względnej zawartości tego kwasu tłuszczowego do poziomu 8%. Dla tego samego punktu rozwoju nasion (31 DAF) odnotowano intensywny wzrost w akumulacji kwasu linolenowego w puli PC, którego zawartość z początkowych 10% wzrosła do około 40%. Względna zawartość 18:3 ostatecznie zmniejszyła się do 16% kwasów tłuszczowych obecnych w puli PC dojrzałych nasion. Oba kwasy nasycone (16:0 i 18:0) charakteryzowały się stosunkowo stabilną względną zawartością plasującą się w granicach 15-20% oraz 2-4% odpowiednio dla kwasu palmitynowego oraz kwasu stearynowego. Detekcja kwasu gondolowego w puli PC możliwa była dopiero po 17 DAF, a jego względna zawartość nie przekraczała 5% (Rys.11a). Powyżej opisane tendencje zmian względnej zawartości kwasów tłuszczowych, obecnych w puli fosfatydylocholine, były porównywalne do tendencji zmian w składzie kwasów tłuszczowych odnotowanych dla całej puli lipidów polarnych.

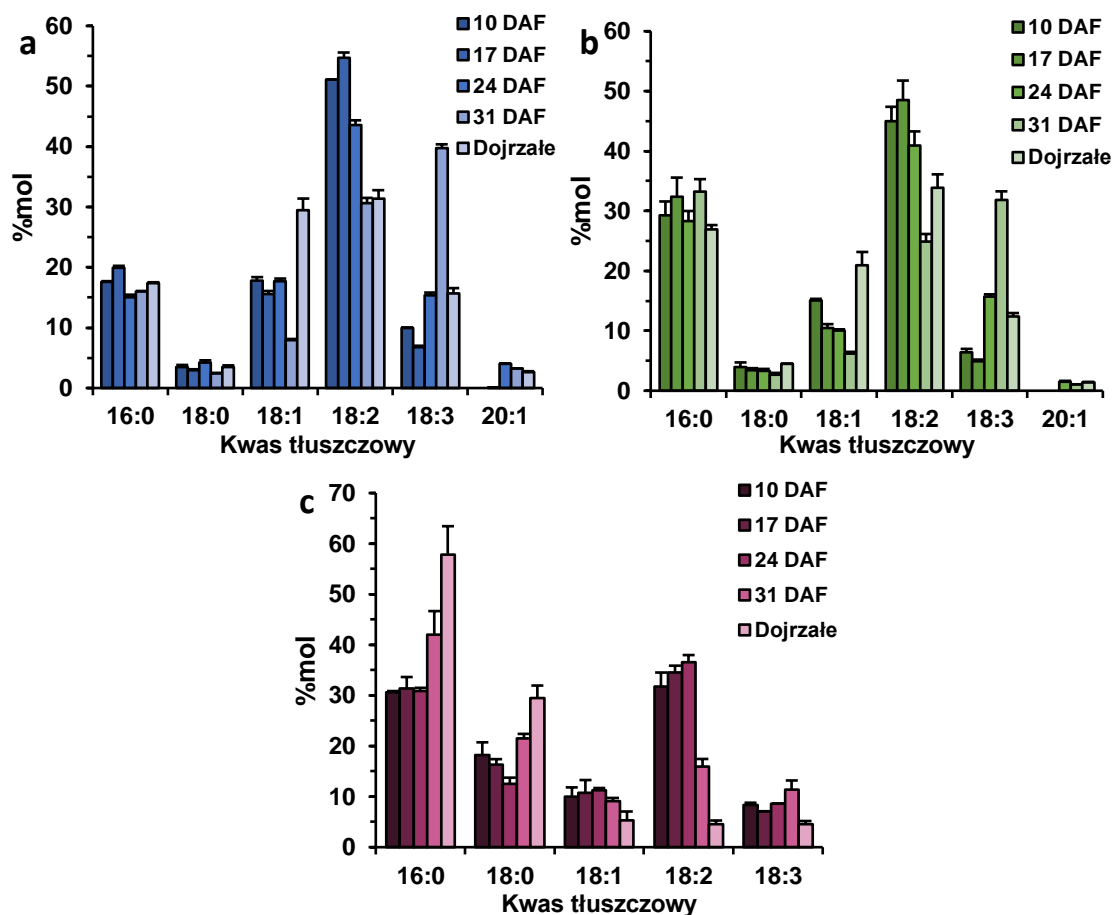
Drugim z fosfolipidów o wyróżniającej się zawartości była fosfatydyloetanolamina, która wykazała analogiczną tendencję w zmianach zawartości, jak powyżej opisana pula PC oraz całkowita pula lipidów polarnych. Ilość kwasów tłuszczowych w puli PE stopniowo wzrastała pomiędzy 10, a 24 DAF od około 4 do 13 nmol/nasiono. Po tym czasie odnotowany został pewien spadek tej zawartości (do około 10 nmol). Podczas całego okresu rozwoju nasion pula PE stanowiła około 20-25% wszystkich lipidów polarnych (Rys. 10). W puli PE podobnie, jak w puli PC odnotowano obecność sześciu kwasów tłuszczowych. Względna zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych (16:0 i 18:0) w puli PE, podczas całego okresu rozwoju nasion, była dość stabilna i wahała się pomiędzy 27-33% oraz 2-4%, odpowiednio dla kwasu palmitynowego oraz stearynowego. Zarówno dla kwasu oleinowego, jak i linolowego zaobserwowano tendencje spadkowe pomiędzy 10, a 31 DAF, odpowiednio w zakresie od 15 do 6% oraz od 45 do 25%. Po tym czasie, względna zawartość obu z tych kwasów wzrastała osiągając odpowiednio 21% oraz 34% kwasów tłuszczowych obecnych w puli PE dojrzałych nasion. Odwrotny trend odnotowano dla kwasu linolenowego, którego względna zawartość wzrosła z początkowych 5-6% (10-17 DAF), do 32% w 31 DAF. Następnie, zawartość tego kwasu raptownie spadła do 12% wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w puli PE dojrzałych nasion. Kwas gondolowy (20:1) wykryto dopiero w puli PE nasion z 24 DAF, a jego względna zawartość w PE nie przekraczała w żadnym ze stadiów rozwojowych nasion 2% (Rys. 11b).

Trzecim i ostatnim z fosfolipidów, poddanym analizie, był kwas fosfatydowy. We wczesnych stadiach rozwoju nasion (10-17 DAF), zawartość tego fosfolipidu, mierzona zawartością kwasów tłuszczowych w nim występujących, była znikoma i wynosiła zaledwie około 0,5 nmol KT. Jego ilość wzrastała wraz z rozwojem nasion osiągając ostatecznie 4,4 nmol kwasów tłuszczowych w nim obecnych, w dojrzałych nasionach, co stanowiło około 9% wszystkich lipidów polarnych obecnych w tym stadium rozwojowym nasion (Rys. 10). Dominującym kwasem tłuszczowym obecnym w puli PA był kwas palmitynowy, którego względna zawartość wzrosła z 31% (10 DAF) do 58% w dojrzałych nasionach. Podobny trend zaobserwowano także dla drugiego z kwasów nasyconych – kwasu stearynowego (wzrost z 18 do 30%). Odwrotną tendencję odnotowano dla kwasu linolowego, którego początkowa zawartość oscylująca w granicach 32-36% (między 10, a 24 DAF) znacząco zmalała do 4,5% kwasów tłuszczowych obecnych w puli PA dojrzałych nasion. Względna zawartość obu z pozostałych kwasów tłuszczowych wykrytych w PA (18:1 i 18:3) wahała się do

31 DAF w zakresie 8-11%, a następnie spadła do około 4-5%. W puli PA nie odnotowano obecności żadnego z bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (Rys. 11c).



Rys. 10. Zmiany całkowitej zawartości lipidów polarnych (wykres słupkowy) oraz zawartości trzech wybranych fosfolipidów (wykres liniowy) podczas rozwoju nasion *C. satvia*. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). DAF – days after flowering (ang.) – dni po kwitnieniu, KT - kwasy tłuszczowe. PC – fosfatydylocholina, PE – fosfatydyloetanolamina, PA – kwas fosfatydowy.



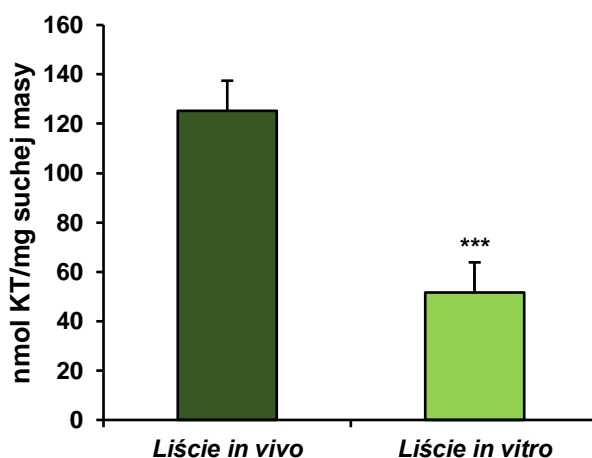
Rys. 11. Zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w wybranych fosfolipidach nasion *C. sativa* w różnych stadiach ich rozwoju. **a** – fosfatydylocholina, **b** – fosfatydyloetanolamina, **c** – kwas fosfatydowy. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). DAF – days after flowering (ang.) – dni po kwitnieniu.

4.1.5. Zawartości acylolipidów w liściach *Camelina sativa* oraz skład kwasów tłuszczowych tych lipidów

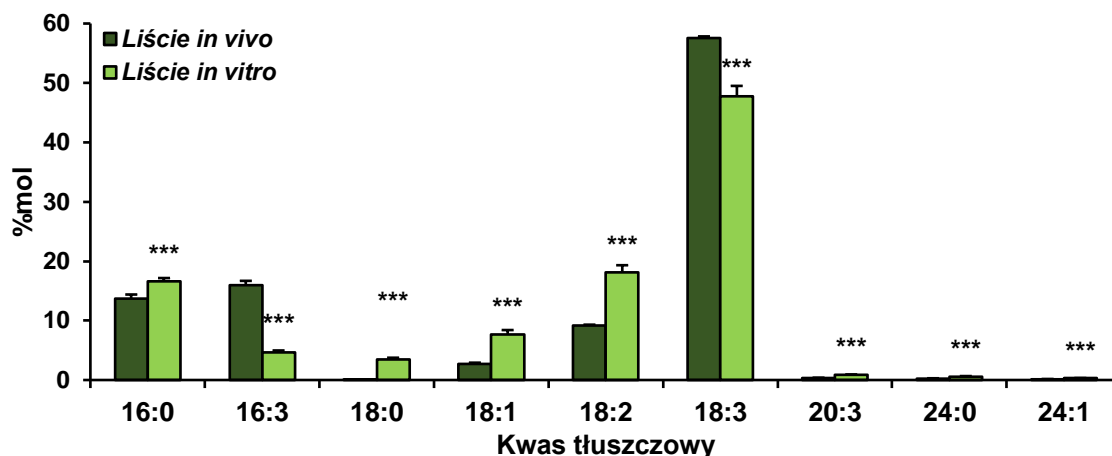
Kolejnym rodzajem tkanki roślinnej, dla której przeanalizowano profil lipidowy były tkanki wegetatywne liści *C. sativa* hodowanej w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Uzyskane wyniki wykazały, że całkowita zawartość acylolipidów (mierzona jako ilość kwasów tłuszczowych w nich występujących) znajdująca się w obu rodzajach liści znacząco się od siebie różni. Liście *in vivo* posiadały prawie 2,5 razy więcej acylolipidów w przeliczeniu na mg suchej masy w porównaniu do liści *in vitro*, dla których wartość ta wynosiła około 50 nmol kwasów tłuszczowych/mg suchej masy (Rys. 12).

Analiza składu kwasów tłuszczowych ujawniła, że w acylolipidach liści z warunków *in vivo* dominującym kwasem tłuszczowym był kwas linolenowy (18:3),

który stanowił ponad 55% wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w tych lipidach. Kolejno, pod względem ilościowym, w acylolipidach liści z warunków *in vivo* plasowały się następujące kwasy tłuszczowe: heksadekatrienowy (16:3), palmitynowy (16:0), linolowy (18:2) oraz oleinowy (18:1), których względne zawartości stanowiły odpowiednio około: 17%, 13%, 8% oraz 3%. Zawartość każdego z pozostałych, występujących w acylolipidach badanych liści, kwasów tłuszczowych tj.: 18:0, 20:3, 24:0 oraz 24:1, nie przekraczała 0,5% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych. Podobnie jak w acylolipidach liści z warunków *in vivo*, również w acylolipidach liści z warunków *in vitro* dominującym kwasem tłuszczowy był kwas linolenowy, którego względna zawartość stanowiła około 48% wszystkich kwasów tłuszczowych. Kolejno, co do ilości plasowały się: kwas linolenowy (18%), kwas palmitynowy (17%), kwas oleinowy (6%), kwas heksadekatrienowy (4%) oraz kwas stearynowy (3%). Bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, do puli których należały kwasy: ikozatrienowy (20:3), lignocerynowy (24:0) oraz nerwonowy (24:1) stanowiły niewielką część puli kwasów tłuszczowych tych lipidów, podobnie jak w acylolipidach liści z hodowli *in vivo* (Rys. 13).



Rys. 12. Całkowita zawartość kwasów tłuszczowych w acylolipidach liści *C. sativa* z warunków *in vivo* (liście *in vivo*) oraz *in vitro* (liście *in vitro*). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy warunkami *in vivo*, a warunkami *in vitro*, która została wyznaczona przy zastosowaniu testu t-Studenta, gdzie *** - $p \leq 0,001$. KT - kwasy tłuszczowe.



Rys. 13. Względna zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych występujących w puli acylolipidów liści *C. sativa* hodowanych w warunkach *in vivo* (liście *in vivo*) oraz *in vitro* (liście *in vitro*). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy warunkami *in vivo*, a warunkami *in vitro*, która została wyznaczona przy zastosowaniu testu t-Studenta, gdzie *** - $p \leq 0,001$.

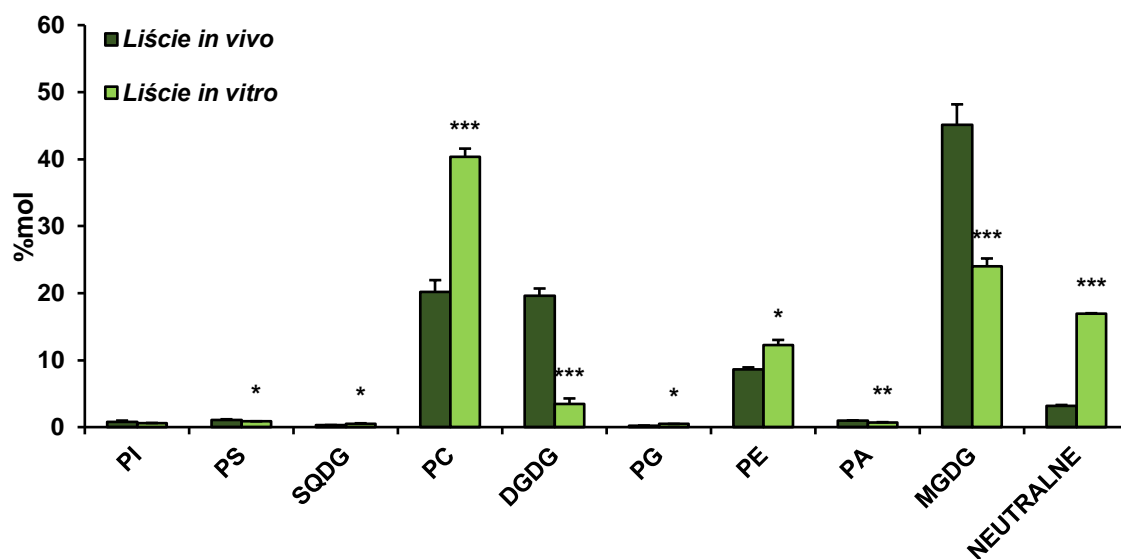
4.1.6. Zawartość poszczególnych klas lipidów w liściach *Camelina sativa*

W celu przeprowadzenia analizy różnych klas lipidów obecnych w ekstraktach chloroformowych otrzymanych z liści *in vivo* oraz *in vitro*, rozdział tych ekstraktów przeprowadzono w układzie „polarnym” przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej, a dalszą analizę przeprowadzono wykorzystując metodę chromatografii gazowej.

Uzyskane dane wykazały, że warunki wzrostu znacząco wpływały na kompozycję analizowanych klas lipidów obecnych w liściach *C. sativa*. Liście z warunków *in vivo* zawierały około 45% MGDG, po 20% PC oraz DGDG oraz 9% PE. Pula lipidów obojętnych nie przekraczała 3% wszystkich lipidów obecnych w tych liściach. Natomiast względna zawartość każdej z pozostałych analizowanych klas lipidów tj.: PI, PS, SQDG, PG oraz PA oscylowała w granicach 1%. Dla liści *in vitro* dominującą pulą lipidów okazała się być fosfatydylocholina, której zawartość wynosiła około 41% wszystkich lipidów. Względna zawartość MGDG wynosiła zaś zaledwie połowę wartości odnotowanej dla warunków *in vivo* tj. około 23%. Kolejną klasą lipidów, o znaczącej zawartości, obecną w liściach *in vitro* były lipidy obojętne, których zawartość oscylowała w granicach 18%. Względna zawartość puli PE oraz DGDG wynosiła odpowiednio 12 oraz 3% wszystkich lipidów. Natomiast zawartość pozostałych klas lipidów, podobnie

jak w liściach *in vivo*, była bardzo mała i nie przekraczała, w przypadku każdego z nich, 1% wszystkich acylolipidów (Rys. 14).

Warunki hodowli szczególnie wpływały na zawartość galaktolipidów obecnych w badanych liściach. Względna zawartość obu przedstawicieli tej grupy acylolipidów – MGDG oraz DGDG zmniejszyła się pod wpływem hodowli w warunkach *in vitro* z około 65% (wykrytych w liściach *in vivo*) do zaledwie 26% wszystkich lipidów. Również znaczące zmiany odnotowano w zawartości głównego z fosfolipidów występującego w membranach roślinnych (z wyjątkiem plastydów). W tym przypadku względna zawartość puli PC zwiększyła się o około 20% w puli acylolipidów liści z hodowli *in vitro*, w porównaniu do tej występującej w liściach z warunków *in vivo* (odpowiednio zawartość tej puli wynosiła 40 oraz 20%). Zawartość PE, drugiego dominującego fosfolipidu również wzrosła; o około 3%. Znaczący wzrost względnej zawartości w liściach z warunków *in vitro*, o około 15%, odnotowano także dla puli lipidów obojętnych (Rys. 14).



Rys. 14. Zawartość poszczególnych klas lipidów w liściach roślin *C. sativa* hodowanych w warunkach *in vivo* (liście *in vivo*) oraz *in vitro* (liście *in vitro*). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy warunkami *in vivo*, a warunkami *in vitro*, która została wyznaczona przy zastosowaniu testu t-Studenta, gdzie * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$.

4.1.7. Skład kwasów tłuszczowych obecnych w poszczególnych klasach lipidów liści *Camelina sativa* hodowanej w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*

Skład prawie każdej z analizowanych klas lipidów charakteryzował się obecnością kwasów: palmitynowego (16:0), linolowego (18:2) oraz linolenowego (18:3). Ponadto większość z nich zawierała również kwas stearynowy (18:0), który nie był obecny jedynie w galaktolipidach. Ta pula lipidów zawierała natomiast jako jedyna, znaczące ilości kwasu heksadekatrienowego (16:3; jego śladowe ilości wykryto również w puli lipidów obojętnych). Część z poniżej opisanych klas lipidów zawierała również kwasy tłuszczowe takie jak: 20:1, 20:2, 20:3, 22:0, 24:0 oraz 24:1. Ich ilość, w większości z tych klas stanowiła jednak tylko niewielką grupę kwasów tłuszczowych w nich obecnych. Jednakże w przypadku puli fosfatydyloseryny oraz lipidów obojętnych ich ilość wynosiła powyżej 10%. Dla wszystkich z analizowanych klas lipidów, względna zawartość bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych została sumowana i przedstawiona jako „inne” (Tabela 9), a dokładna zawartość każdego z nich została podana w tabeli znajdującej się w Aneksie (Tabela A5).

Nienależnie od warunków hodowli, ponad połowę puli kwasów tłuszczowych fosfatydyloinozytolu stanowiły kwasy nienasycone: 16:0 oraz 18:0, których względna zawartość wynosiła 56,9% i 19,3% oraz 50,5% i 16,9% odpowiednio dla liści roślin hodowanych *in vivo* oraz *in vitro*. Dla kwasów wielonienasyconych zaobserwowano wzrost ich względnej zawartości w przypadku liści z hodowli w warunkach *in vitro*, gdzie zawartość kwasu linolowego zwiększyła się z 7,7% do 10,5%, a kwasu linolenowego z 9,5% do 15,8%. Dla zawartości kwasu oleinowego w puli PI nie odnotowano znaczących zmian pod wpływem warunków hodowli, a jego zawartość oscylowała w granicach 6,5% (Tabela 9).

Pula fosfatydyloseryny (PS) obecna w liściach hodowanych w warunkach *in vitro* charakteryzowała się niższą zawartością kwasów nasyconych o około 2,2% oraz 5,7% odpowiednio dla kwasu palmitynowego oraz stearynowego w porównaniu do warunków *in vivo*. Odwrotny trend odnotowano dla zawartości 18-węglowych kwasów nienasyconych, które odpowiednio stanowiły: 5% (18:1), 12,5% (18:2) oraz 15,5% (18:3), kwasów tłuszczowych puli PS liści z warunków *in vitro*. W liściach z warunków *in vivo* zawartość tych kwasów w puli PS (podana w takiej samej kolejności) wynosiła odpowiednio: 1,4%, 6,5% oraz 11,5%. Pula PS cechowała się również największą zawartością „innych” kwasów tłuszczowych (31% w liściach z warunków *in vivo* oraz

25,1% w liściach z hodowli *in vitro*); (Tabela 9). W skład grupy tych kwasów tłuszczowych wchodziły: 20:3, 24:0 oraz 24:1 (Aneks; Tabela A5).

Sulfochinowozyliodiacyloglicerol (SQDG) jako jedyny z przedstawicieli sulfolipidów znajdujących się w badanych tkankach, cechował się dominującą zawartością kwasu palmitynowego (16:0). SQDG obecny w liściach z warunków *in vitro* zawierał około 45% tego kwasu tłuszczowego, a obecny w liściach z warunków *in vivo* około 53%. Odwrotnie do zmian w zawartości 16:0, w przypadku kwasu oleinowego (18:1) odnotowano niewielki wzrost jego zawartości w SQDG w warunkach *in vitro* (z 3,1% do 4,8%). Podobna tendencja dotyczyła również kwasów: linolowego (z 4,5% do 11,8%), linolenowego (z 19,9% do 22,1%) oraz kwasów tłuszczowych „innych” (z 3,2% do 5,2%). W przypadku kwasu stearynowego sytuacja była podobna jak w przypadku kwasu palmitynowego; jego względna zawartość w SQDG obecnego w liściach z warunków *in vitro* zmniejszyła się o ponad 5,1% w porównaniu do warunków *in vivo* (Tabela 9).

Głównym kwasem tłuszczowym obecnym w puli fosfatydylocholino (PC) liści *C. sativa* był kwas linolenowy (18:3). Pula PC liści z warunków *in vivo* zawierała go aż 68%, podczas gdy PC liści z warunków *in vitro* 46%. Dla PC liści z hodowli w warunkach *in vitro* odnotowano natomiast znaczący wzrost względnej zawartości kwasów: oleinowego oraz linolowego w porównaniu do ich zawartości w PC liści z warunków *in vivo*, odpowiednio z 0,9 do 9,7% oraz 4,3 do 17,7%. Dla pozostałych z kwasów tłuszczowych obecnych w PC nie odnotowano znaczących różnic w ich względnej zawartości pomiędzy testowanymi warunkami hodowli (Tabela 9).

Warunki hodowli miały również wpływ na skład kwasów tłuszczowych puli digalaktozyliodiacylogliceroli (DGDG) obecnych w liściach *C. sativa*. Względna zawartość kwasu oleinowego w DGDG wynosiła około 12% dla liści z warunków *in vivo* oraz około 9% dla liści z warunków *in vitro*. Spadek względnej zawartości w warunkach *in vitro* w porównaniu do warunków *in vivo* odnotowano również dla kwasu: heksadekatrienowego (z 5,7 do 4,8%) oraz linolenowego (z 30,8% do 25,4%). W warunkach *in vitro* wzrastała zaś względna zawartość w DGDG kwasu palmitynowego oraz linolowego w porównaniu do warunków *in vivo*, odpowiednio o około 4% oraz 5,5% (Tabela 9).

Pula fosfatydyloglicerolu (PG) obecna w liściach z warunków *in vivo* składała się tylko z dwóch nasyconych kwasów tłuszczowych: kwasu palmitynowego oraz stearynowego, których zawartość wynosiła 57,2% oraz 42,8%. Względna zawartość

powyżej wspomnianych kwasów tłuszczowych w liściach z warunków *in vitro* stanowiła odpowiednio 36,1% i 16,9%. Dodatkowo pula PG obecna w tej tkance zawierała kwas oleinowy (17,8%), kwas linolowy (12,5%) oraz kwas linolenowy (16,7%). Zawartość tych kwasów w puli PG z warunków *in vivo* była poniżej poziomu detekcji (Tabela 9). W przypadku PG pik (na chromatogramie z GC) identyfikowany jako 16:0 zawiera również (a może przede wszystkim) 16:1 Δ^3 trans. Stosowane warunki rozdzielania nie pozwalały jednak na oddzielenie tych dwóch kwasów tłuszczowych. Dla uproszczenia, w powyższym opisie i w Tabeli 9, suma tych kwasów występuje pod nazwą „kwasu palmitynowego” (16:0).

Pula fosfatydyloetanolaminy (PE) znajdująca się w liściach z hodowli *in vitro* zawierała 16:0, 18:2 oraz 18:3 w niemal równych ilościach (25-28%). Dodatkowo zawierała około 11% kwasu oleinowego, 4% kwasu stearynowego oraz 5% kwasów tłuszczowych „innych” (w których dominował kwas behenowy – 22:0, stanowiący 2,3% wszystkich kwasów tłuszczowych – Aneks; Tabela A5.). Skład tego samego fosfolipidu w liściach z warunków *in vivo* zawierał podobne względne ilości kwasów tłuszczowych: 18:0, 18:2 oraz 18:3. W przypadku kwasu palmitynowego (16:0), jego względna zawartość wzrosła do 37%, natomiast względna zawartość kwasu oleinowego oraz kwasów tłuszczowych z puli „inne” zmniejszyła się odpowiednio do 6% oraz 1,5% (Tabela 9).

Spośród kwasów tłuszczowych obecnych w PA (kwas fosfatydowy) liści z warunków *in vivo* najwyższą zawartością charakteryzowały się wielonienasycone kwasy tłuszczowe: 18:2 (32%) oraz 18:3 (34%). Kolejnym kwasem tłuszczowym o wysokiej zawartości był kwas palmitynowy stanowiący około 19,3%, a następnie kwas stearynowy oraz oleinowy których względna zawartość wynosiła odpowiednio 9,2% oraz 5,5%. Hodowla *in vitro* spowodowała, że PA obecny w liściach z tych warunków hodowli charakteryzował się dominującą zawartością kwasu palmitynowego (34%), a nie kwasów wielonienasyconych. Zawartość tych ostatnich była podobna do zawartość 18:0 oraz 18:1, a względna zawartość każdego z tych kwasów tłuszczowych oscylowała w granicach 14,2-16,9%. W puli PA liści z warunków *in vitro* odnotowano również obecność, na poziomie około 2,5%, bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, których zawartość w PA liści z warunków *in vivo* była poniżej poziomu detekcji (Tabela 9).

Pula monogalaktozydylacylogliceroli (MGDG) obecna w liściach *C. sativa* z obu warunków hodowli charakteryzowała się dominującą zawartością kwasów trienowych

(16:3 oraz 18:3). Jednakże, względna zawartość tych kwasów w MGDG liści z warunków *in vitro* była znacznie niższa niż w MGDG liści z warunków *in vivo*; odpowiednio zawartość kwasu heksadekatrienowego wynosiła 19 oraz 30%, a kwasu linolenowego 59 oraz 63%. Odwrotnie do tego trendu, MGDG liści z warunków *in vitro* zawierało więcej kwasu palmitynowego, oleinowego oraz linolowego w porównaniu do MGDG liści z warunków *in vivo*; odpowiednio: 6,2 i 4%, 3,6 i 0,5% oraz 11,4 i 3%. W MGDG liści z warunków *in vitro* odnotowano również obecność bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w ilości około 0,6% (Tabela 9).

Ostatnią z klas lipidów, której skład kwasów tłuszczowych poddano analizie były lipidy obojętne („neutralne”). W ich składzie wykryto obecność 11 różnych kwasów tłuszczowych. Pula tych lipidów w liściach z warunków *in vivo* charakteryzowała się dominującą zawartością kwasu palmitynowego wynoszącą 31,8% wszystkich kwasów tłuszczowych. Względna zawartość pozostałych kwasów tłuszczowych obecnych w tej klasie lipidów wynosiła: 21,9% dla kwasu linolenowego, 14,8% dla kwasu stearynowego, 10,4% dla kwasu linolowego, 5,3% dla kwasu oleinowego oraz 15,5% dla kwasów tłuszczowych z puli „inne”. Wykryto również śladowe ilości kwasu heksadekatrienowego (około 0,4%). W przeciwieństwie do warunków *in vivo*, w lipidach obojętnych liści *C. sativa* z warunków *in vitro* odnotowano dominującą zawartość kwasu linolenowego (31,3%). Kolejno, wysoką względną zawartością charakteryzowały się kwasy: palmitynowy oraz linolowy, odpowiednio wynoszące 23,3% oraz 16,9%. Względna zawartość pozostałych kwasów tłuszczowych (oprócz 16:3 którego zawartość wynosiła około 0,16%), tj. 18:0, 18:1 i sumy kwasów tłuszczowych z puli „inne” wahała się w granicach 8-10% (Tabela 9).

Tabela 9. Zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w analizowanych klasach lipidów znajdujących się w liściach roślin *C. sativa* hodowanych w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. W puli ‘inne’ podano sumę względnych zawartości następujących kwasów tłuszczowych: 20:1, 20:2, 20:3, 22:0, 24:0 oraz 24:1 (komplet tych kwasów nie zawsze występował w każdej z analizowanych klas lipidów).

Klasa lipidów	Rodzaj hodowli	%mol						
		16:0	16:3	18:0	18:1	18:2	18:3	inne
PI	<i>in vivo</i>	56,9 ± 2,2	-	19,3 ± 2,0	6,6 ± 0,4	7,68 ± 0,7	9,5 ± 0,08	-
	<i>in vitro</i>	50,5 ± 1,1	-	16,9 ± 1,1	6,4 ± 0,5	10,5 ± 1,5	15,8 ± 1,2	-
PS	<i>in vivo</i>	30,6 ± 0,06	-	19,1 ± 0,5	1,4 ± 0,06	6,5 ± 0,6	11,5 ± 0,5	31 ± 1,3
	<i>in vitro</i>	28,4 ± 0,5	-	13,4 ± 0,7	5,0 ± 0,2	12,5 ± 0,6	15,5 ± 1,5	25,1 ± 1,4
SQDG	<i>in vivo</i>	53,1 ± 6,8	-	16,3 ± 1,6	3,1 ± 0,8	4,5 ± 0,8	19,9 ± 4,2	3,2 ± 0,6
	<i>in vitro</i>	45 ± 1,5	-	11,2 ± 1,1	4,8 ± 0,3	11,8 ± 0,2	22,1 ± 2,0	5,2 ± 0,3
PC	<i>in vivo</i>	21,9 ± 2,5	-	3,2 ± 1,01	0,9 ± 0,1	4,3 ± 0,2	68,0 ± 3,0	1,4 ± 0,2
	<i>in vitro</i>	20,8 ± 0,3	-	4,2 ± 0,01	9,7 ± 0,1	17,7 ± 0,1	46,5 ± 0,2	1,2 ± 0,1
DGDG	<i>in vivo</i>	33,4 ± 1,0	5,7 ± 0,3	-	12,2 ± 1,0	17,9 ± 0,8	30,8 ± 0,8	-
	<i>in vitro</i>	37,4 ± 1,3	4,8 ± 0,1	-	8,6 ± 0,6	23,4 ± 0,6	25,4 ± 0,1	0,5 ± 0,01
PG	<i>in vivo</i>	57,2 ± 3,6	-	42,8 ± 3,6	-	-	-	-
	<i>in vitro</i>	36,1 ± 0,01	-	16,9 ± 0,4	17,8 ± 1,1	12,5 ± 0,2	16,7 ± 0,4	-
PE	<i>in vivo</i>	37,4 ± 3,0	-	4,8 ± 0,4	5,9 ± 0,3	24,0 ± 1,8	26,3 ± 1,7	1,5 ± 0,01
	<i>in vitro</i>	25,5 ± 0,2	-	4,0 ± 0,01	10,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	28,4 ± 0,8	5,0 ± 0,2
PA	<i>in vivo</i>	19,3 ± 0,01	-	9,2 ± 0,7	5,5 ± 0,3	31,9 ± 1,0	34,0 ± 1,2	-
	<i>in vitro</i>	34,5 ± 0,7	-	16,9 ± 0,05	15,0 ± 0,7	14,2 ± 0,5	16,7 ± 0,1	2,5 ± 0,9
MGDG	<i>in vivo</i>	4,0 ± 0,2	30,0 ± 1,4	-	0,5 ± 0,4	3,0 ± 0,4	62,6 ± 0,6	-
	<i>in vitro</i>	6,2 ± 0,1	19,4 ± 0,3	-	3,6 ± 0,1	11,4 ± 1,3	58,8 ± 0,9	0,6 ± 0,01
Neutralne	<i>in vivo</i>	31,8 ± 1,5	0,4 ± 0,01	14,8 ± 0,1	5,3 ± 0,3	10,4 ± 0,07	21,9 ± 1,9	15,5 ± 1,0
	<i>in vitro</i>	23,2 ± 1,4	0,16 ± 0,01	8,2 ± 0,2	10,4 ± 0,2	16,9 ± 1,1	31,3 ± 1,8	9,9 ± 2,1

4.2. Preferencje enzymów typu LPLAT występujących w tkankach *Camelina sativa* względem różnych akceptorów grup acylowych

Pierwszym z eksperymentów przeprowadzonych w ramach badań dotyczących charakterystyki biochemicznej enzymów LPLAT występujących w badanych tkankach *C. sativa*, było sprawdzenie względem, których lizofosfolipidów wykazują one najwyższą specyficzność. Do badań wykorzystano frakcje mikrosomalne uzyskane z liści roślin hodowanych w warunkach *in vivo*, liści i korzeni z hodowli *in vitro* oraz nasion pochodzących z różnych stadiów rozwojowych. Stadia rozwojowe nasion wyznaczono na podstawie wcześniej przeprowadzonych analiz zmian składu i zawartości acylolipidów podczas rozwoju tych nasion. Stadium I odpowiadało nasionom zebranych pomiędzy 17, a 19 DAF, natomiast stadium II oraz III między 24, a 26 DAF oraz 31, a 34 DAF. Wyznaczone stadia obejmowały zakres rozwoju nasion, w którym zaobserwowano największe zmiany w zawartości i składzie acylolipidów w nich zawartych oraz możliwe było wypreparowanie z nich zarodków wykorzystywanych następnie do izolacji frakcji mikrosomalnej.

Omawiane w bieżącym podrozdziale badania zostały przeprowadzone bez zastosowania optymalnych parametrów dla reakcji *in vitro* katalizowanych przez LPLATy; warunki te ustalono dopiero w dalszej części badań. W związku z tym otrzymane wyniki pomiarów aktywności LPATów występujących w badanych frakcjach mikrosomalnych nie zawsze są identyczne (pod względem ilościowym) z później uzyskanymi danymi. Aktywność badanych enzymów została przedstawiona jako ilość zsyntetyzowanego *de novo* radioaktywnego produktu (odpowiedniego fosfolipidu) w ciągu 1 minuty reakcji przez LPLATy obecne w alikwotach frakcji mikrosomalnych zawierających 1 nmol endogennej fosfatydylocholiny.

Badania przeprowadzone na frakcjach mikrosomalnych uzyskanych z nasion wykazały, że enzymy typu LPLAT w nich obecne wykazują najwyższą preferencję w stosunku do lizofosfatydylocholiny spośród wszystkich wykorzystywanych w testach akceptorów grup acylowych. Dane te sugerowały więc, że najaktywniejszą grupą spośród enzymów typu LPLAT obecnych w nasionach były LPCATy. Enzymy te wykazywały najwyższą aktywność w II stadium rozwojowym nasion; ich aktywność w stadium I i III była o około 25-30% niższa. Drugim po LPC najlepiej wykorzystywanym lizofosfolipidem przez enzymy typu LPLAT obecne we frakcjach mikrosomalnych z nasion *C. sativa*, był kwas lizofosfatydowy. Najwyższą aktywność w stosunku do tego lizofosfolipidu odnotowano we frakcjach mikrosomalnych uzyskanych z nasion

z I stadium rozwojowego. W kolejnych stadiach rozwojowych aktywność ta zmniejszała się o kilka-kilkanaście procent w stosunku do aktywności odnotowanej dla stadium I. Inny wzorzec zmian aktywności enzymów typu LPLAT obecnych w badanych frakcjach mikrosomalnych w stosunku do LPA w porównaniu do tego odnotowanego dla LPC, sugeruje, że za aktywność tą odpowiadają enzymy typu LPAAT (przynajmniej w znacznej części). Aktywność enzymów syntetyzujących PA z dodanych do testów LPA i [¹⁴C]18:1-CoA jako substratów reakcji była stosunkowo wysoka i wynosiła/zbliżała się do około połowy aktywności wykazywanej w testach z udziałem LPC i [¹⁴C]18:1-CoA jako substratów. W testach, w których jako akceptor grup acylowych została zastosowana lizofosfatydyloetanolamina (LPE) odnotowano około 10-krotnie niższą aktywność niż w testach z zastosowaniem LPC. Ponieważ wzór zmian aktywności LPLATów, obecnych w testowanych frakcjach mikrosomalnych, w stosunku do LPE był podobny do wzoru zmian tej aktywności w stosunku do LPC, na podstawie przedstawianych badań nie można było więc wykluczyć, że za aktywność tą mogą odpowiadać nie tylko enzymy typu LPEAT, ale także (przynajmniej częściowo) enzymy typu LPCAT. W badaniach wcześniejszych wykazano bowiem, że LPCATy mogą również akceptować inne lizofosfolipidy (Jasieniecka-Gazarkiewicz i in. 2016). W testach wykorzystujących lizofosfatydyloserynę jako akceptor grup acylowych odnotowano jeszcze niższą aktywność niż w testach z udziałem LPE. Aktywność, ta wahała się od 1,1 do 3,2 pmol [¹⁴C]PS/min/nmol mikrosomalnego PC, co odpowiadało jedynie około 1-3% aktywności odnotowanej w testach z udziałem LPC (Rys. 13). Na podstawie omawianych badań nie można jednak stwierdzić czy za aktywność tą odpowiadają enzymy typu LPSAT (jak dotychczas nie zidentyfikowano ich u roślin), czy jest to uboczna aktywność wykazywana przez inne typy enzymów należących do grupy LPLAT.

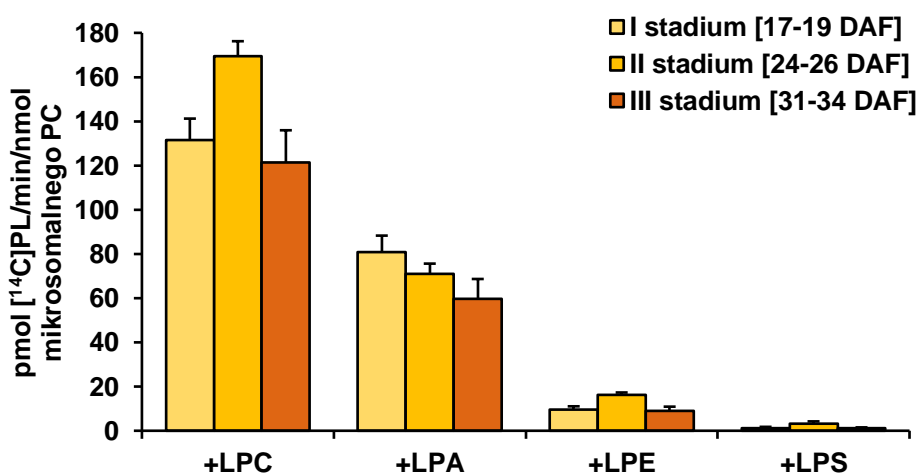
Po wyznaczeniu optymalnych warunków dla reakcji enzymatycznych przeprowadzanych przez enzymy LPCAT, LPAAT oraz LPEAT (opisanych w dalszej części pracy), powyższe testy wykonano ponownie stosując optymalne parametry dotyczące czasu i temperatury reakcji, ilości frakcji mikrosomalnych oraz optymalnego pH buforu (wyznaczone na podstawie testów, a nie wartości pH zbliżonej do pH występującego w komórkach). Otrzymane wyniki potwierdziły odnotowane w omówionych powyżej badaniach tendencje, co do preferencji w stosunku do poszczególnych lizofosfolipidów LPLATów obecnych w badanych frakcjach mikrosomalnych (Aneks. Rys. A1)

Doświadczenia określające aktywność enzymów typu LPLAT we frakcjach mikrosomalnych z tkanek wegetatywnych wykazały, że enzymy te charakteryzują się niższą aktywnością niż ich odpowiedniki występujące we frakcjach mikrosomalnych z nasion (Rys. 13 i 14). Spośród frakcji mikrosomalnych uzyskanych z organów wegetatywnych (liście *in vivo*, liście *in vitro*, korzenie *in vitro*) najniższą aktywność enzymów typu LPLAT odnotowano dla mikrosomów uzyskanych z liści *C. sativa* z warunków *in vivo* (względem każdego z testowanych akceptorów grup acylowych). W testach z wykorzystaniem tych mikrosomów, średnia aktywność badanych enzymów, przy zastosowaniu jako akceptorów kwasów tłuszczowych następujących lizofosfolipidów: LPC, LPA, LPE oraz LPS wynosiła odpowiednio około 15, 7, 3 oraz 0,4 pmol [¹⁴C]PL/min/nmol mikrosomalnego PC. Były to wartości od kilku do ponad 10 razy niższe niż uzyskane w podobnych testach z wykorzystaniem mikrosomów z nasion. W testach z wykorzystaniem frakcji mikrosomalnych z hodowli *in vitro* (mikrosomy z liści i korzeni) największą aktywność odnotowano przy zastosowaniu jako akceptory kwasów tłuszczowych LPC oraz LPA. Aktywność LPLATów obecnych w mikrosomach z korzeni roślin hodowanych *in vitro* w stosunku do obu lizofosfolipidów wahała się w granicy 18 pmol [¹⁴C]PL/min/nmol mikrosomalnego PC, natomiast dla LPLATów obecnych w mikrosomach z liści z warunków *in vitro* wynosiła odpowiednio 20 oraz 17 pmol [¹⁴C]PL/min/nmol mikrosomalnego PC. W przypadku wykorzystania w testach LPE jako akceptora kwasów tłuszczowych aktywność ta wynosiła zaś około 6-7 pmol [¹⁴C]PE/min/nmol mikrosomalnego PC, w testach z obiema badanymi frakcjami mikrosomalnymi. Lizofosfatdyloseryna była zaś najmniej preferowanym substratem, a aktywność względem niej wynosiła poniżej 1,5 pmol [¹⁴C]PS/min/nmol mikrosomalnego PC. Różnice w aktywności LPLATów obecnych w mikrosomach z nasion i w mikrosomach z testowanych organów wegetatywnych w stosunku do LPE i LPS (wykorzystywanych jako akceptory kwasów tłuszczowych) były o wiele mniejsze niż te zaobserwowane w testach z udziałem LPC i LPA. Może to świadczyć, że poszczególne reakcje przeprowadzane są przez inne rodzaje LPLATów, lub że LPLATy obecne w nasionach różnią się specyficznością substratową od tych występujących w tkankach wegetatywnych.

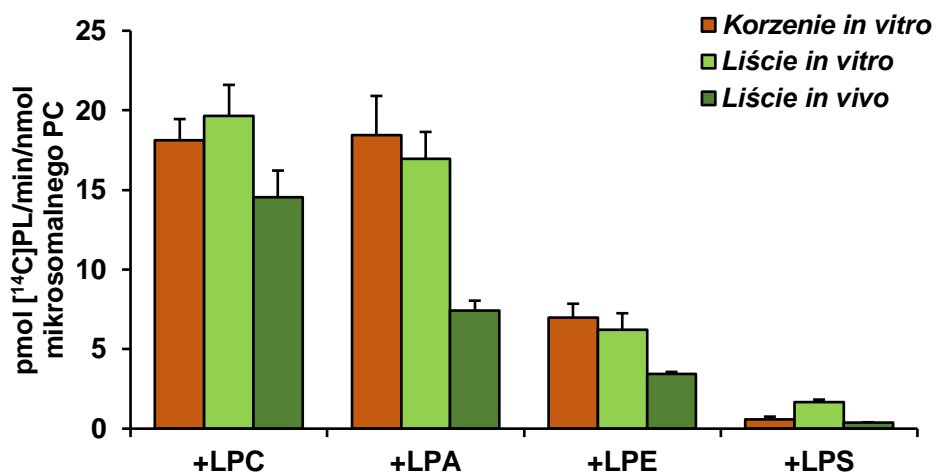
W przypadku testów enzymatycznych, w których wykorzystywano frakcje mikrosomalne wyizolowane z organów wegetatywnych roślin *C. sativa* z hodowli *in vitro* zaobserwowano, że enzymy LPLAT w nich obecne produkowały nie tylko fosfolipidy z dodanych do testów lizofosfolipidów, ale również, w znacznych ilościach, inne

fosfolipidy (Aneks Rys. A2). Zjawiska tego nie obserwowano natomiast w testach z wykorzystaniem mikrosomów z liści z warunków *in vivo* oraz w testach z mikrosomami z nasion. W testach z tymi mikrosomami obserwowano jako główny produkt reakcji katalizowanej przez LPLATy w nich obecne jedynie fosfolipid powstały z dodanego do testu lizofosfolipidu (inne [^{14}C]fosfolipidy powstawały w śladowych ilościach). Wyniki te mogą świadczyć, że frakcje mikrosomalne uzyskane z organów wegetatywnych *C. sativa* z hodowli *in vitro* posiadają znaczne ilości endogennych lizofosfolipidów w odróżnieniu od pozostałych testowanych frakcji mikrosomalnych. Badania biochemiczne dotyczące zawartości endogennych lizofosfolipidów w wykorzystywanych frakcjach mikrosomalnych nie zostały jednak przeprowadzone.

Otrzymane wyniki jasno wykazały, że zarówno w nasionach, jak i organach wegetatywnych *C. sativa* główna aktywność enzymatyczna wykazywana przez acylotransferazy lizofosfolipidów to aktywność typu LPCAT oraz LPAAT. Niemniej jednak odnotowano również aktywność typu LPEAT, szczególnie w liściach oraz korzeniach. W związku z tym, w dalszej części pracy dokładnie analizowane będą trzy rodzaje enzymów typu LPLAT: LPCATy, LPAATy oraz LPEATy. Ze względu na bardzo niską aktywność, potencjalne enzymy typu LPSAT preferujące lizofosfatdyloserynę nie zostały poddane dalszym analizom.



Rys. 13. Aktywność acylotransferaz typu acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT) obecnych w nasionach *C. sativa* na różnych etapach ich rozwoju względem różnych akceptorów grup acylowych. Warunki reakcji: 5 nmol egzogenego *sn*-1-18:1-LPL, 5 nmol [^{14}C]18:1-CoA, alikwoty frakcji mikrosomalnych zawierające 1 nmol mikrosomalnego PC, 60 minut inkubacji w 30 °C. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). LPC – lizofosfatdylocholina, LPE – lizofosfatdyloetanolamina, LPA – kwas lizofosfatdyowy, LPS – lizofosfatdyloseryna.



Rys. 14. Aktywność acylotransferaz typu acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT) obecnych w tkankach wegetatywnych *C. sativa* (korzeniach z warunków *in vitro* – korzenie *in vitro*; liściach z warunków *in vitro* – liście *in vitro*; liściach z warunków *in vivo* – liście *in vivo*) względem różnych akceptorów grup acylowych. Warunki reakcji: 5 nmol egzogenego *sn*-1-18:1-LPL, 5 nmol [¹⁴C]18:1-CoA, alikwoty frakcji mikrosomalnych zawierające 1 nmol mikrosomalnego PC, 60 minut inkubacji w 30 °C. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). LPC – lizofosfatydylocholina, LPE – lizofosfatydyloetanoloamina, LPA – kwas lizofosfatydowy, LPS – lizofosfatydyloseryna.

4.3. Określanie charakterystyki biochemicznej oraz roli enzymów LPLAT w remodelowaniu fosfolipidów obecnych w nasionach *Camelina sativa*

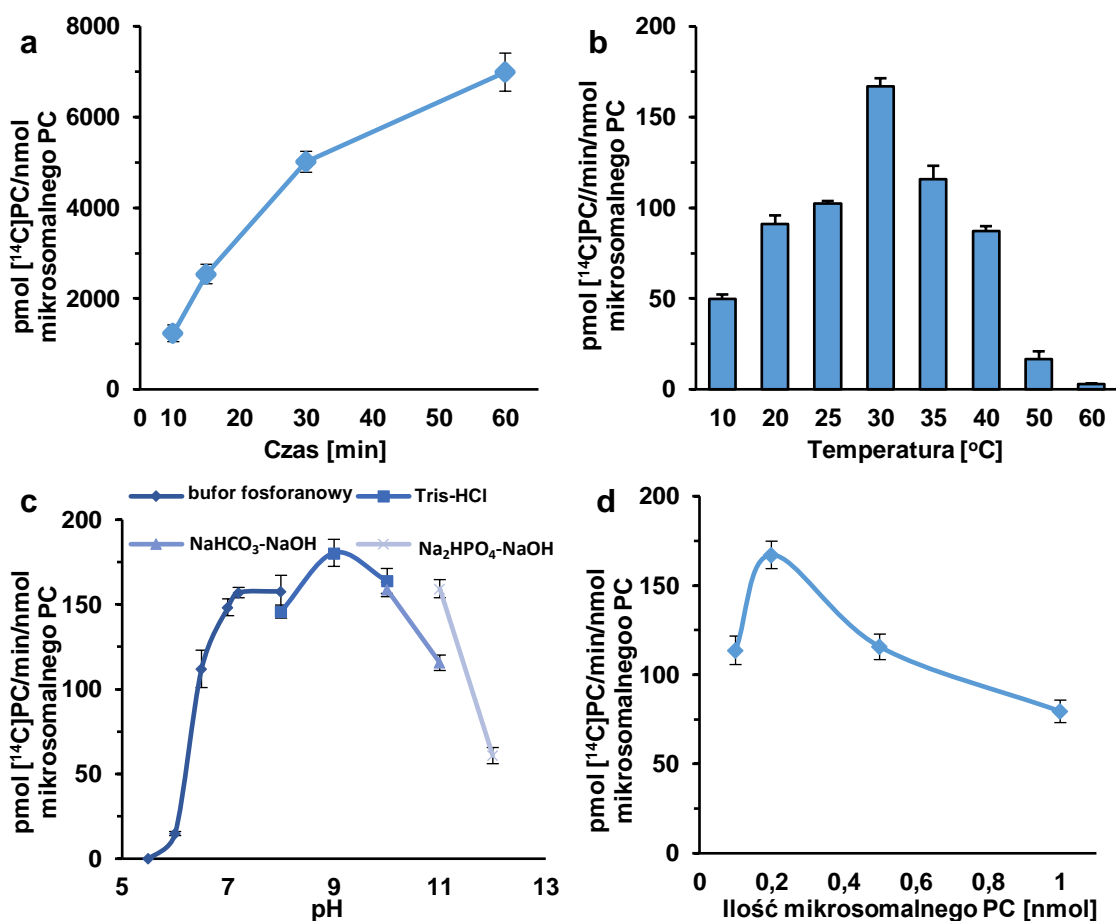
Opisana poniżej część badań w pierwszej kolejności miała na celu wyznaczenie optymalnych parametrów reakcji enzymatycznych prowadzonych *in vitro* dla enzymów LPCAT, LPEAT oraz LPAAT. Następnym celem było określenie aktywności enzymatycznej oraz specyficzności substratowej tych enzymów w reakcjach typu *forward* oraz *backward*. Dodatkowo na podstawie uzyskanych danych określony został udział tych enzymów w procesie remodelowania i suplementacji puli acylo-CoA, która kolejno może być wykorzystywana przez inne acylotransferazy do biosyntezy, między innymi, lipidów zapasowych. Ponadto podjęto próby ustalenia czasu niezbędnego do przeprowadzenia całkowitej edycji grup acylowych w poszczególnych fosfolipidach występujących w nasionach *C. sativa*.

4.3.1. Optymalizacja reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy LPCAT obecne w nasionach *Camelina sativa*

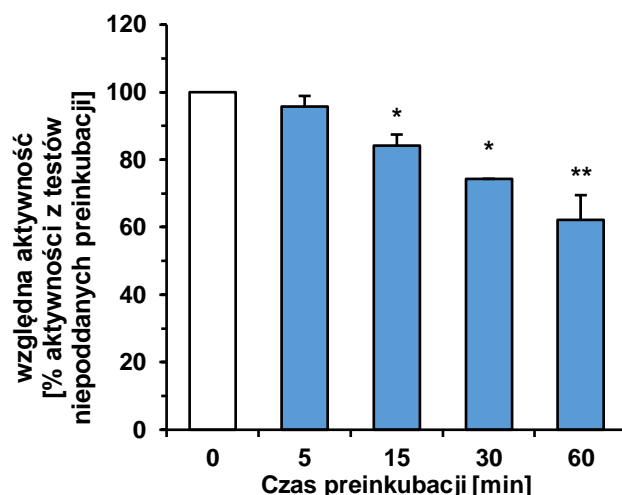
Do przeprowadzenia optymalizacji, czyli wyznaczenia optymalnych parametrów dla reakcji *in vitro* katalizowanych przez enzymy typu LPCAT jako egzogenne substraty użyto *sn*-1-18:1-LPC i [¹⁴C]18:1-CoA oraz jako źródło enzymów wykorzystano frakcję mikrosomalną uzyskaną z nasion *C. sativa* zebranych 24-26 DAF, co odpowiada ich drugiemu stadium rozwoju. Wyznaczone optymalne parametry uwzględniano w kolejno następujących po sobie analizach. Optymalizację czasu reakcji, temperatury, pH buforu oraz ilości mikrosomów, opisaną poniżej, przedstawiono już uprzednio w ramach mojej pracy magisterskiej. Ponieważ dostęp do mojej pracy magisterskiej może być utrudniony, opis ten ponowiono dla wygody czytelników niniejszej rozprawy doktorskiej. W ramach prac nad niniejszą rozprawą doktorską niektóre z wcześniej wykonanych doświadczeń dotyczących optymalizacji zostały powtórzone. Uzyskane wyniki nie odbiegały jednak od tych uzyskanych wcześniej.

Wstępne badania dotyczące optymalizacji czasu reakcji wykazały, że reakcja ta przebiega prawie liniowo do 30 minuty inkubacji; pomiędzy 30, a 60 min inkubacji szybkość reakcji ulegała pewnemu spowolnieniu (Rys. 15a). Jako optymalny czas przyjęto więc 30-minutową reakcję. Optymalną ilością frakcji mikrosomalnej były alikwoty tej frakcji zawierające 0,2 nmol mikrosomalnego PC. Ilość ta odpowiada 0,88 µg mikrosomalnego białka. Zastosowanie zarówno większych, jak i mniejszych alikwotów frakcji mikrosomalnej powodowało zmniejszenie badanej, aktywności enzymatycznej wyrażanej w ilości syntetyzowanego [¹⁴C]PC/min/nmol mikrosomalnego PC (Rys. 15d). Temperaturą preferowaną przez badane enzymy było 30 °C. Enzymy LPCAT zawarte we frakcji mikrosomalnej nasion *C. sativa* wykazywały również dość wysoką aktywność zarówno dla temperatury 20 jak i 40 °C (ponad połowę aktywności wykazywanej w 30 °C). W 10 °C, enzymy LPCAT utrzymywały około 30% maksymalnej aktywność, podczas gdy skrajnie wysoka temperatura 60 °C powodowała ich niemalże całkowitą dezaktywację (Rys. 15b). Enzymy LPCAT obecne w nasionach lnianki wykazywały raczej wysoką stabilność, gdyż wstępna 60-minutowa inkubacja frakcji mikrosomalnej w 30 °C, przed rozpoczęciem reakcji zmniejszała aktywność tych enzymów o zaledwie 38%, podczas gdy 15-minutowa o 16% (Rys. 16.) Ogrzewanie frakcji mikrosomalnej w 100 °C przez 10 minut prowadziło do całkowitego spadku aktywności (dane nieprzedstawione graficznie). Kolejnym parametrem poddanym optymalizacji było pH buforu, którego wpływ badano w zakresie od 5,5 do 12,0 przy

zastosowaniu 4 różnych buforów (0,1 M bufor fosforanowy – 5,5-8,0; 0,1 M bufor Tris-HCl – 8,0-10,0; 0,1 M bufor NaHCO₃-NaOH – 10,0-11,0; 0,1 M bufor NaHPO₄-NaOH – 11,0-12,0). Enzymy LPCAT były nieaktywne w środowisku o pH 5,5, a ich aktywność w pH 6,0 wzrosła jedynie nieznacznie osiągając 10% maksymalnej wartości. W zakresie pH 7,0-11,0 LPCATy wykazywały największą zdolność do katalizowania reakcji enzymatycznej, podczas gdy swoje maksimum osiągały przy pH 9,0 buforu Tris-HCl. Następnie wraz ze wzrostem zasadowości ich aktywność malała. Znaczący spadek, o ponad 35% maksymalnej aktywności, odnotowano dla reakcji prowadzonej w buforze NaHCO₃-NaOH o pH 11,0 oraz o około 65% dla reakcji wykorzystującej Na₂HPO₄-NaOH o pH 12,0 (Rys. 15c).

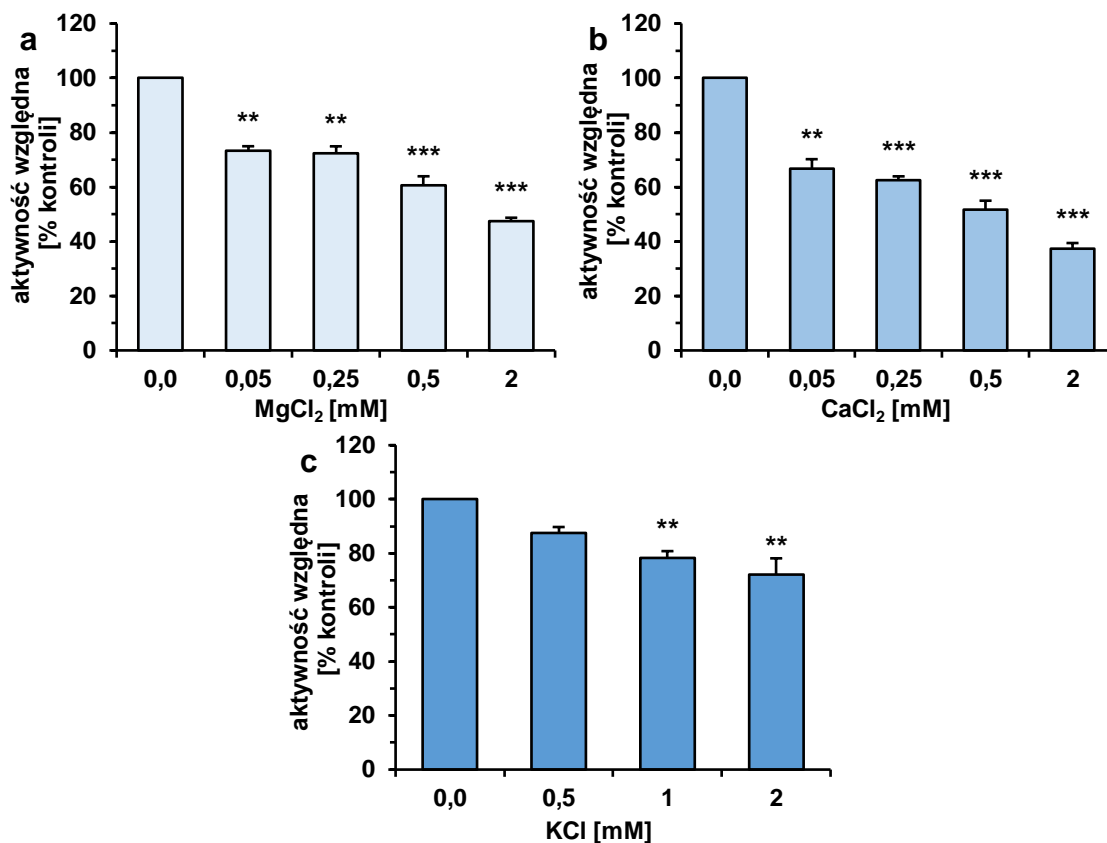


Rys. 15. Optymalizacja warunków reakcji dla acylotransferaz acylo-CoA: lizofosfatydylocholina (LPCAT) obecnych w nasionach *C. sativa*. **a** – zależność aktywności LPEAT od czasu reakcji, **b** – zależność aktywności LPEAT od temperatury reakcji, **c** – zależność aktywności LPEAT od pH buforu inkubacyjnego, **d** – zależność aktywności LPEAT od zagęszczenia frakcji mikrosomalnej. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).



Rys. 16. Wpływ preinkubacji frakcji mikrosomalnej na aktywność acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydylocholina (LPCAT) obecnych w nasionach *C. sativa*. Frakcja mikrosomalna przed dodaniem do mieszaniny reakcyjnej była inkubowana w temperaturze 30 °C przez określony czas. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy kontrolą bez dodatkowej inkubacji, a reakcjami dla których zastosowano preinkubację frakcji mikrosomalnej. Istotność ta została wyznaczona przy zastosowaniu testu t-Studenta, gdzie * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$.

Na aktywność enzymów LPCAT istotnie wpływało również stężenie jonów magnezu, wapnia oraz potasu. Eksperymenty określające wpływ tych jonów przeprowadzono przy zastosowaniu 0,1 M buforu HEPES (pH 7,2) zamiast buforu fosforanowego, ze względu na wytrącanie się nierozpuszczalnych soli magnezowych oraz wapniowych w tym buforze. Dodatek jonów magnezu oraz wapnia w bardzo niskich stężeniach takich jak 0,05 mM znacząco hamował aktywność LPCAT o około 27-34%. Wraz ze wzrostem stężenia jonów dwuwartościowych, zaobserwowany efekt pogłębiał się. Przy stężeniu 2 mM jonów magnezu aktywność spadła do około 47% aktywności uzyskiwanej w testach bez dodatku jonów (spadek o 53%), podczas gdy dodatek jonów wapnia prowadził do spadku aktywności LPCAT o 63% przy 2 mM stężeniu tych jonów. Dodatek jonów potasu, nie wpływał tak drastycznie na zahamowanie aktywności. Przy stężeniu 2 mM jonów potasu, enzymy LPCAT wykazywały wciąż ponad 75% maksymalnej aktywności. Zaobserwowana inhibicja aktywności enzymów LPCAT nie wykazywała trendu liniowego skorelowanego ze wzrostem stężenia tych jonów (Rys. 17).

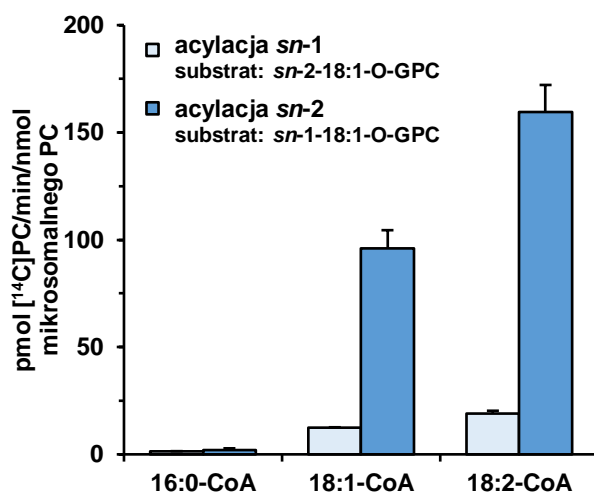


Rys. 17. Wpływ różnych jonów na aktywność acylotransferaz acylo-CoA: lizofosfatydylocholina (LPCAT) obecnych w nasionach *C. sativa*. **a** – wpływ jonów magnezu, **b** – wpływ jonów wapnia, **c** – wpływ jonów potasu. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy kontrolą (bez dodatku jonów), a testowanym stężeniem jonów. Istotność ta została wyznaczona przy zastosowaniu testu t-Studenta, gdzie ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$.

4.3.2. Specyficzność substratowa w reakcjach *forward* enzymów LPCAT obecnych w nasionach *Camelina sativa*

W celu zweryfikowania, czy enzymy typu LPCAT obecne w nasionach *C. sativa*, również jak pozostałe przebadane dotychczas LPCATy (Lager i in., 2013), będą preferować acylację pozycji *sn*-2, przeprowadzona została reakcja enzymatyczna wykorzystująca eterowe analogi lizofosfatydylocholiny posiadające kwas tłuszczowy w pozycji *sn*-1 lub *sn*-2. W reakcjach wykorzystano odpowiednio *sn*-1-18:1-O-GPC oraz *sn*-2-18:1-O-GPC. Jako donory grup acylowych wykorzystane zostały trzy różne acylo-CoA: [¹⁴C]16:0-CoA, [¹⁴C]18:1-CoA oraz [¹⁴C]18:2-CoA, a jako źródło LPCATów frakcja mikrosomalna pochodząca z II stadium rozwoju nasion. Przeprowadzone testy wykazały, że enzymy LPCAT obecne we frakcji mikrosomalnej z nasion *C. sativa* mogą

katalizować acylację obu pozycji zarówno *sn*-1, jak i *sn*-2. Jednakże wydajność tej reakcji była ponad 8-krotnie wyższa w stosunku do pozycji *sn*-2 wówczas, gdy jako donory grup acylowych wykorzystywano 18:1-CoA lub 18:2-CoA. Zastosowanie jako donora grup acylowych 16:0-CoA dawało już jednak tylko około 1,6 razy większą preferencję w stosunku do pozycji *sn*-2 niż do pozycji *sn*-1 (Rys. 18).



Rys. 18. Aktywność acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydylocholina (LPCAT) obecnych w nasionach *C. sativa* w stosunku do eterowych analogów akceptorów grup acylowych: *sn*-1-18:1-LPC (*sn*-1-18:1-O-GPC) oraz *sn*-2-18:1-LPC (*sn*-2-18:1-O-GPC). Jako donory grup acylowych wykorzystano [¹⁴C]16:0-CoA, [¹⁴C]18:1-CoA oraz [¹⁴C]18:2-CoA. W teście wykorzystano frakcję mikrosomalną wykazującą najwyższą aktywność LPCAT-ową (II stadium – 24-26 DAF). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym (n ≥ 3).

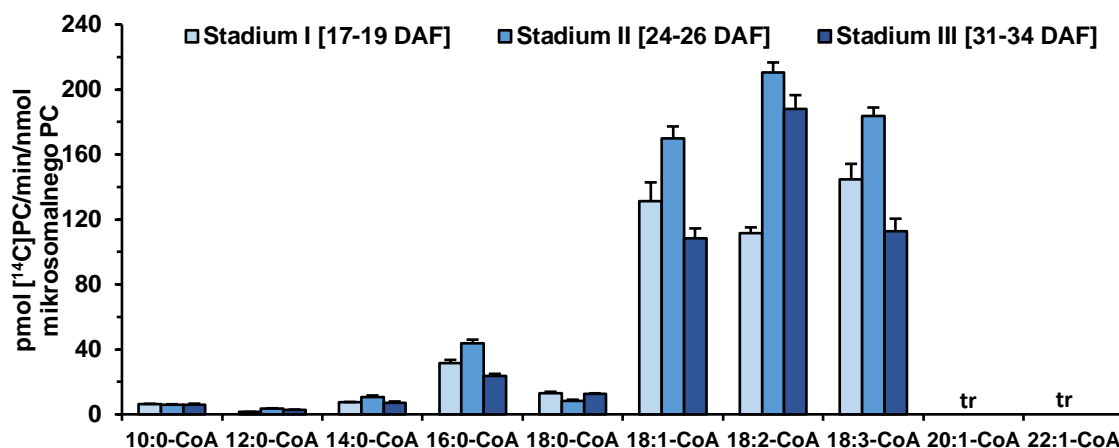
Aktywność oraz specyficzność substratową (w stosunku do różnych acylo-CoA) enzymów LPCAT nasion *C. sativa* określono dla frakcji mikrosomalnych wyizolowanych z trzech różnych stadiów rozwojowych tych nasion (I – 17-19 DAF; II – 24-26 DAF; III – 31-34 DAF). Do testów wykorzystano dziesięć różnych [¹⁴C]acylo-CoA w kombinacji z *sn*-1-18:1-LPC. W testach zastosowano uprzednio wyznaczone optymalne parametry dla reakcji enzymatycznej katalizowanej przez enzymy LPCAT obecne we frakcjach mikrosomalnych nasion *C. sativa*. Reakcje przeprowadzano w 30 °C przez 30 minut przy dodatku alikwotów frakcji mikrosomalnych zawierających 0,2 nmol mikrosomalnego PC, bez dodatku jonów oraz przy zastosowaniu 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,2. Wskazany bufor zastosowano (pomimo nieodnotowanych przy jego wykorzystaniu, podczas optymalizacji, najwyższych aktywności testowanych

LPCATów), ponieważ jego pH imituje warunki najbardziej zbliżone do naturalnego środowiska występowania tych enzymów.

Dla większości z badanych kombinacji egzogennych substratów najwyższą aktywność typu LPCAT odnotowano w testach z frakcjami mikrosomalnymi otrzymanymi z nasion z stadium II. Wyjątek stanowiły kombinacje *sn-1-18:1-LPC* z 10:0-CoA oraz z 18:0-CoA, dla których wówczas zaobserwowano najniższą z aktywności. Niemniej jednak aktywność typu LPCAT w testach wykorzystujących frakcje mikrosomalne z pozostałych dwóch stadiów rozwojowych nasion *C. sativa* była również wysoka i stanowiła co najmniej 50% aktywności odnotowanej w testach z frakcjami mikrosomalnymi uzyskanymi z nasion ze stadium II.

W pierwszym stadium rozwojowym nasion najbardziej preferowanymi donorami kwasów tłuszczowych były 18:3-CoA oraz 18:1-CoA, przy wykorzystaniu których odnotowano aktywność LPCATów wynoszącą odpowiednio 145 oraz 131 pmol [¹⁴C]PC/min/nmol mikrosomalnego PC. Natomiast zarówno w testach wykorzystujących frakcje mikrosomalne uzyskane z nasion ze stadium drugiego, jak i trzeciego najwyższą preferencję LPCATów obecnych w tych frakcjach odnotowano względem 18:2-CoA, przy wykorzystaniu którego aktywność ta wynosiła odpowiednio 210 oraz 188 pmol [¹⁴C]PC/min/nmol mikrosomalnego PC. Dla stadium II oraz III odnotowano wysoką aktywność również w stosunku do 18:1-CoA oraz 18:3-CoA, która oscylowała odpowiednio dla każdego ze stadiów w granicach 81-87% oraz 57-60% aktywności odnotowanych przy wykorzystaniu 18:2-CoA. Najlepiej akceptowanym acylo-CoA spośród tych zawierających nasycone kwasy tłuszczowe, był 16:0-CoA, względem którego aktywność typu LPCAT w testach z frakcjami mikrosomalnymi z nasion uzyskanych z kolejno następujących po sobie stadiów rozwojowych tych nasion wynosiła odpowiednio 32, 44 oraz 24 pmol [¹⁴C]PC/min/nmol mikrosomalnego PC. W stosunku do 18:0-CoA najwyższą aktywność odnotowano dla LPCATów obecnych we frakcji mikrosomalnej otrzymanej ze stadium I nasion, natomiast aktywność tych enzymów w testach z frakcjami mikrosomalnymi z kolejnych stadiów rozwojowych nasion *C. sativa* była niższa odpowiednio o 30% i 10%. Względem acylo-CoA z nasyconymi średniołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi aktywność enzymów LPCAT była niska i oscylowała maksymalnie w granicach 10 pmol [¹⁴C]PC/min/nmol mikrosomalnego PC. Enzymy LPCAT obecne we frakcjach mikrosomalnych z nasion *C. sativa* wykazały zaś całkowity brak aktywności (lub aktywność ta była poniżej poziomu detekcji) w stosunku do wykorzystywanych w testach acylo-CoA z bardzo długołańcuchowymi kwasami

tłuszczowymi (Rys.19). Część z powyżej opisanych wyników dotyczących specyficzności enzymów LPCAT (występujących w nasionach *C. sativa*) względem różnych grup acylowych została wcześniej scharakteryzowana przeze mnie w ramach pracy magisterskiej. Wszystkie te wyniki zostały jednak, w co najmniej w jednym powtórzeniu, wykonane ponownie podczas eksperymentów prowadzących do powstania niniejszej pracy i uwzględnione w obliczeniach statystycznych.

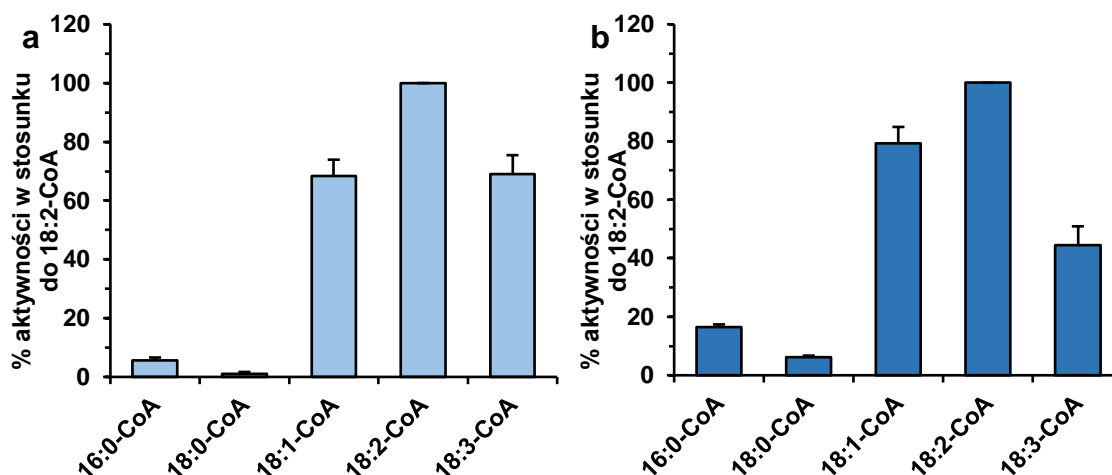


Rys. 19. Specyficzność substratowa acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydylocholina (LPCAT) obecnych w nasionach *C. sativa*. Jako akceptor grup acylowych w testach wykorzystywana była *sn-1-18:1-LPC*. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). tr – ślady (ang. traces).

Kolejnym krokiem badań było przeprowadzenie testów selektywności substratowej w celu weryfikacji, czy preferencje enzymów LPCAT względem różnych acylo-CoA odnotowane w testach opisanych powyżej będą tożsame wówczas, gdy w mieszaninie reakcyjnej znajdować się będą różne donory grup acylowych. W tym celu wykorzystano frakcje mikrosomalne otrzymane z nasion z III stadium rozwoju oraz mieszaniny składające się z równo molowych stężeń pięciu najbardziej preferowanych acylo-CoA (w testach określających specyficzność tych enzymów względem pojedynczych substratów – Rys. 19), czyli: 16:0-CoA, 18:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA. Jako akceptor kwasów tłuszczowych mieszaniny zawierały *sn-1-18:1-LPC*. W każdej z mieszanin tylko jeden z donorów był znakowanych ^{14}C . Dodatkowo testy selektywności przeprowadzono w dwóch wariantach bez dodatku oraz z dodatkiem BSA, dodawanego nadmiarze (0,2 mg/reakcję). Wyniki przedstawiono jako

% aktywności odnotowanej w stosunku do 18:2-CoA względem, którego odnotowano najwyższą aktywność enzymów LPCAT.

Wyniki wykazały, że preferencje LPCAT w stosunku do różnych acylo-CoA dodawanych w równo molowych ilościach są bardzo podobne do tych odnotowanych w testach tylko z jednym acylo-CoA (Rys. 19 i 20). Najbardziej preferowanym substratem był 18:2-CoA, podczas gdy 18:1-CoA oraz 18:3-CoA były wykorzystywane z około 30% niższą wydajnością. Wykorzystanie acylo-CoA z nasyconymi kwasami tłuszczowymi podawanymi w mieszaninie, było mało efektywne. Odpowiednio dla 16:0-CoA oraz 18:0-CoA wynosiło odpowiednio 6 oraz 1% aktywności względem 18:2-CoA (Rys. 20a). Dodatek BSA do mieszaniny reakcyjnej nieznacznie zwiększał wykorzystywanie 16:0-CoA, 18:0-CoA oraz 18:1-CoA (odpowiednio do 16%, 6% oraz 80% aktywności względem 18:2-CoA) w porównaniu z testami niezawierającymi BSA. Odwrotną tendencję odnotowano dla 18:3-CoA, którego wykorzystanie zmniejszyło się o ponad 22% (Rys. 20b).



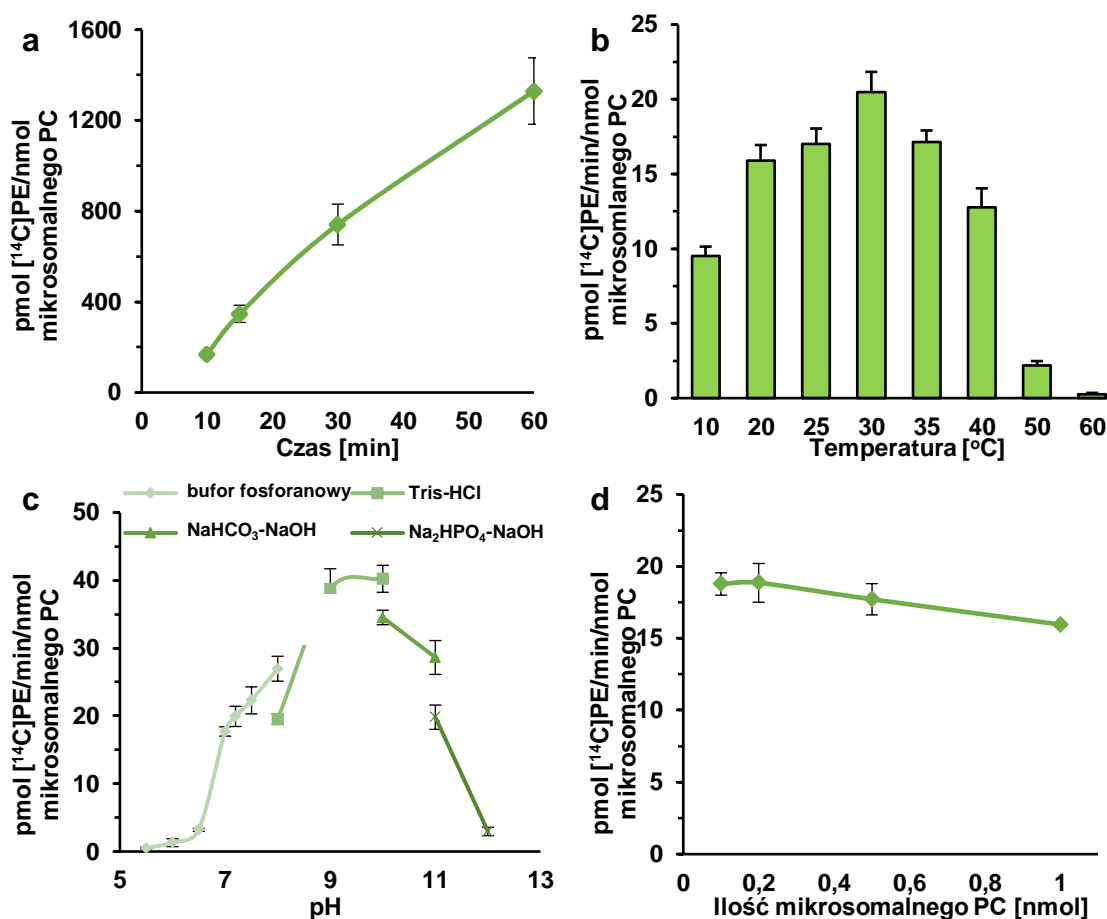
Rys. 20. Aktywność acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydylocholina (LPCAT) obecnych w nasionach *C. sativa* w stosunku do pięciu różnych acylo-CoA dodawanych do mieszanin reakcyjnych w równo molowych stężeniach. **a** – mieszaniny reakcyjne nie zawierały BSA; **b** – mieszaniny reakcyjne zawierały BSA (0,2 mg/reakcja). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

4.3.3. Optymalizacja reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy LPEAT obecne w nasionach *Camelina sativa*

Dla enzymów LPEAT określono optymalne parametry reakcji enzymatycznych takie jak czas oraz temperatura reakcji, pH buforu, ilość dodanej frakcji mikrosomalnej oraz wpływ różnych jonów i ich stężeń. Do testów enzymatycznych ponownie wykorzystano jako źródło enzymów frakcję mikrosomalną wyizolowaną z nasion z II stadium rozwoju nasion *C. sativa*.

Na podstawie przeprowadzonej optymalizacji wyznaczono, że liniowość reakcji katalizowanej przez enzymy LPEAT jest zachowana aż do 60 minuty (Rys. 21a). Testy określające optymalną ilość frakcji mikrosomalnej, wykazały, że największą aktywność enzymy LPEAT osiągają przy dodatku alikwotów tej frakcji zawierających 0,2 nmol mikrosomalnego PC, co odpowiada 0,88 µg białka mikrosomalnego. Jednakże aktywność tych enzymów nie ulegała znaczącym modyfikacją w zakresie od 0,1 do 1 nmol mikrosomalnego PC alikwotów frakcji mikrosomalnej dodawanych do reakcji (Rys. 21d). Enzymy LPEAT obecne w nasionach *C. sativa* były najbardziej aktywne w 30 °C. Spadek temperatury do 20 °C lub jej podwyższenie do 35 °C jedynie nieznacznie obniżał aktywność LPEATów, maksymalnie o 20% aktywności odnotowanej w 30 °C. W temperaturze 40 °C enzymy zachowywały 65% maksymalnej aktywności, podczas gdy dalszy wzrost temperatury prowadził do prawie całkowitej dezaktywacji tych białek. Z drugiej strony, niska temperatura o wartości zaledwie 10 °C wciąż pozwalała na zachowanie ½ maksymalnej aktywności enzymów LPEAT (Rys. 21b). Enzymy LPEAT okazały się być wrażliwe na zmiany pH buforu stosowanego do przygotowania mieszaniny reakcyjnej, w związku z czym ich aktywność badano w zakresie pH 5,5-12,0 stosując w tym celu 4 różne 0,1 M bufony. W buforze o pH w zakresie 5,5-6,5 enzymy te były zdolne do przeprowadzania reakcji jednak ich wydajność nie przekraczała 12% ich maksymalnej aktywności. Wraz ze wzrostem pH buforu, w granicach pH odczynu obojętnego oraz pH, który występuje naturalnie w środowisku tych enzymów (pH 7,2) aktywność tych enzymów sięgała średnio około ½ maksymalnej aktywności. Optymalna wartość pH, w której enzymy LPEAT katalizowały reakcję najefektywniej syntetyzując około 40 pmol [¹⁴C]PE/min/nmol mikrosomalnego PC, oscylowała w granicach 9,0-10,0 przy zastosowaniu buforu Tris-HCl. Dalsza alkalizacja środowiska reakcji prowadziła do spadku aktywności, jednakże wciąż przy pH 11,0 wynosiła ona 71% lub 49%, maksymalnej wartości, w zależności od zastosowanego buforu (odpowiednio NaHCO₃-

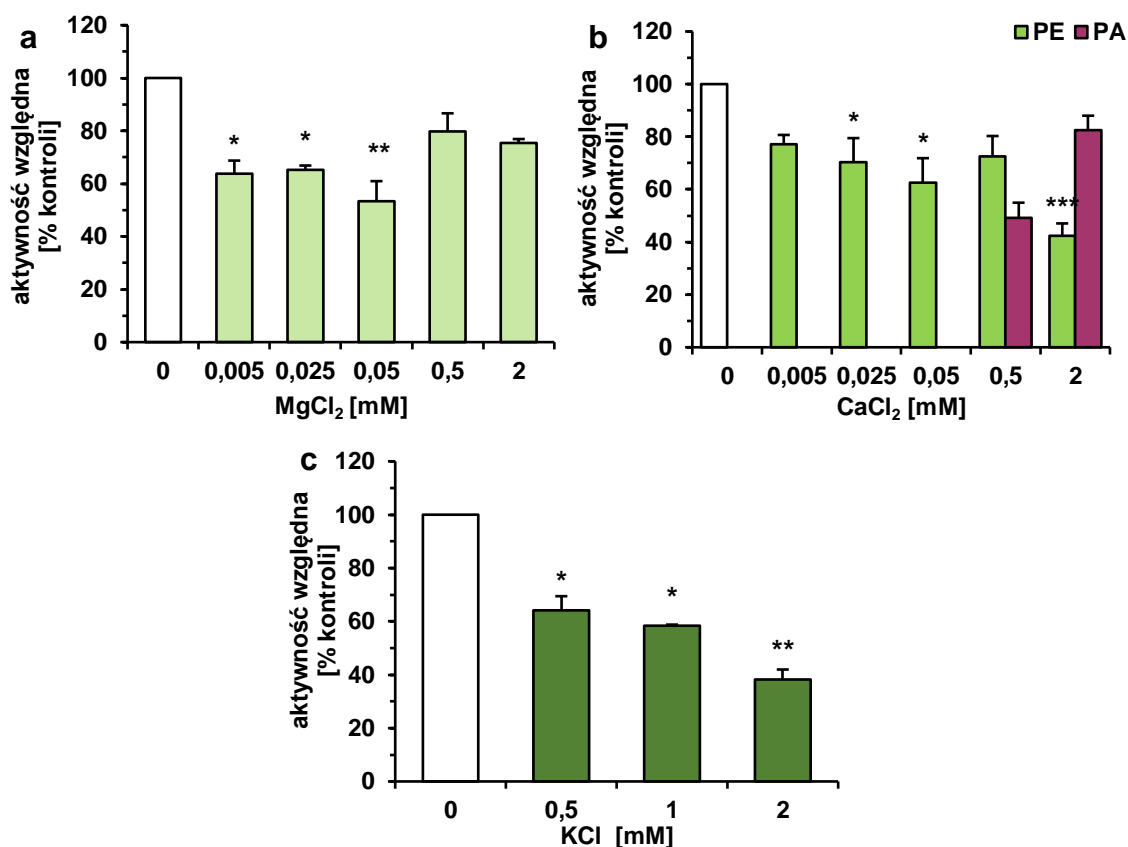
NaOH lub NaHPO₄-NaOH). Znaczący spadek, prowadzący do prawie całkowitej dezaktywacji enzymów LPEAT odnotowano dopiero przy pH 12,0 (Rys. 21c).



Rys. 21. Optymalizacja warunków reakcji dla acylotransferaz acylo-CoA: lizofostaydyloetanolamina (LPEAT) obecnych w nasionach *C. sativa*. **a** – zależność aktywności LPEAT od czasu reakcji, **b** – zależność aktywności LPEAT od temperatury reakcji, **c** – zależność aktywności LPEAT od pH buforu inkubacyjnego, **d** – zależność aktywności LPEAT od zagęszczenia frakcji mikrosomalnej. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

Dodatek do mieszaniny reakcyjnej testowanych jonów zarówno jedno- jak i dwuwartościowych hamował aktywność enzymatyczną LPEATów obecnych w nasionach *C. sativa*. Niewielki dodatek jonów magnezu o stężeniu 0,005 mM powodował zmniejszenie aktywności o około 40%, podczas gdy 10-krotny wzrost stężenia Mg²⁺ zwiększał ten efekt tylko nieznacznie, obniżając aktywność do ½ wartości

kontroli (reakcji bez dodatku jonów). Zastosowanie wyższych stężeń z zakresu 0,5-2 mM nie skutkowało wzmocnieniem efektu inhibicji aktywności (Rys. 22a). Podobnie jak w przypadku jonów magnezu, jony wapnia również już przy niskich stężeniach wpływały na zmniejszenie aktywności enzymów LPEAT. Przy stężeniu 0,005 mM odnotowano około 25% inhibicję, a jej efektywność jedynie nieznacznie pogłębiała się wraz ze wzrostem stężenia Ca^{2+} . Największą redukcję w aktywności, o ponad 60%, odnotowano dla stężenia 2 mM. Niemniej jednak stężenia wapnia powyżej 0,5 mM stymulowały również produkcję kwasu fosfatydowego, najprawdopodobniej w wyniku zwiększonej aktywności fosfolipazy D, aktywowanej obecnością tych jonów. W testach z dodatkiem wapnia o stężeniu 2 mM, względna ilość powstającego *de novo* PA była nawet dwukrotnie większa niż ilość powstającej *de novo* PE (Rys. 22b). Przeprowadzone badania nie dają, jednakże pewności, że powstający [^{14}C]PA pochodził z przekształcenia powstałej wcześniej [^{14}C]PE w wyniku działania fosfolipazy D (jeżeli tak, to należałoby przyjąć, że te stężenia wapnia stymulują aktywność LPEATów). [^{14}C]PA mógł być syntetyzowany również endogennego LPA i [^{14}C]acylo-CoA, a dodatek wapnia stymulował jedynie powstawanie endogennego LPA w wyniku zwiększonej aktywności lipaz. Dodatek jonów jednowartościowych w postaci jonów K^+ , również hamował aktywność LPEAT. Dla stężenia wynoszącego 0,5 mM odnotowano spadek o około 35% aktywności, natomiast przy stężeniu 2 mM spadek ten wynosił aż 62%, wartości kontrolnej (Rys. 22c).



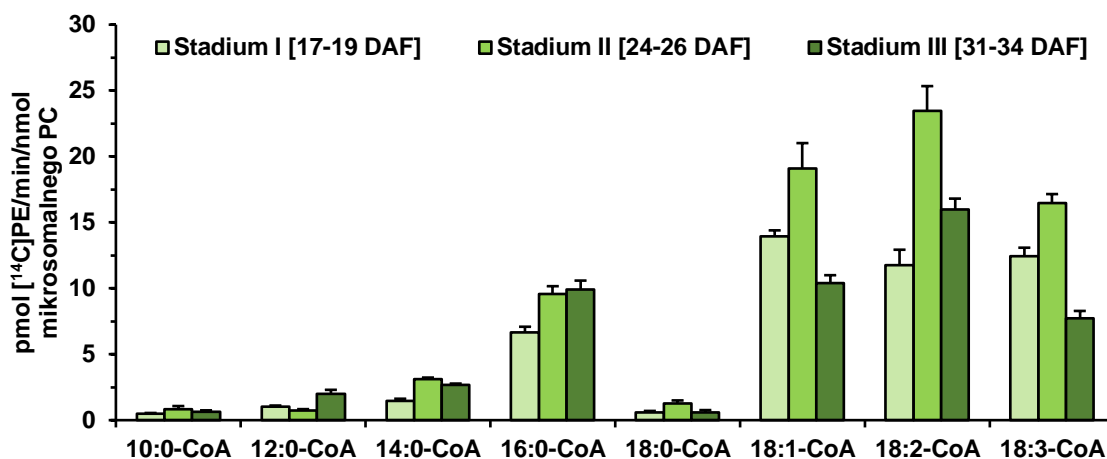
Rys. 22. Wpływ różnych jonów na aktywność acylotransferaz acylo-CoA: lizofosfatydyloetanolamina (LPEAT) obecnych w nasionach *C. sativa*. **a** – wpływ jonów magnezu, **b** – wpływ jonów wapnia, **c** – wpływ jonów potasu. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy kontrolą (testy bez dodatku jonów), a testowanym stężeniem jonów, która została wyznaczona przy zastosowaniu testu t-Studenta, gdzie * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$.

4.3.4. Specyficzność substratowa w reakcjach *forward* enzymów LPEAT obecnych w nasionach *Camelina sativa*

Określanie aktywności oraz specyficzności substratowej enzymów typu LPEAT zostało wykonane przy zastosowaniu wyznaczonych, optymalnych parametrów czasu i temperatury reakcji, a także optymalnych ilości frakcji mikrosomalnych. Testy przeprowadzono przy zastosowaniu 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,2 odpowiadającego warunkom naturalnym występowania tych enzymów. Analizy przeprowadzono dla frakcji mikrosomalnych z nasion ze wszystkich trzech wyznaczonych stadiów ich rozwoju, natomiast do testów selektywności wykorzystano mikrosomy uzyskane z nasion ze stadium III.

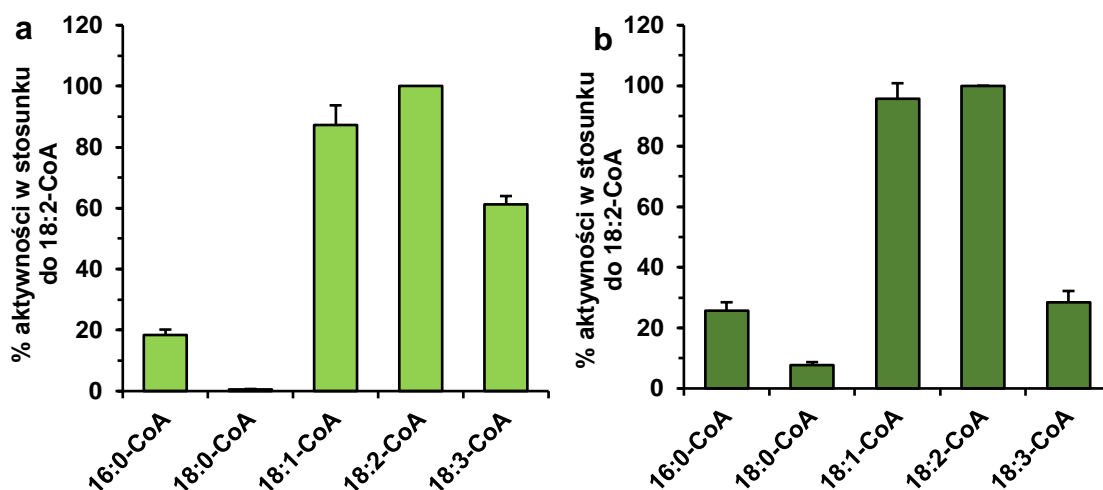
Najwyższą aktywność enzymów LPEAT odnotowano we frakcjach mikrosomalnych otrzymanych z nasion zebranych 24-26 DAF. Taką tendencję wykryto dla sześciu z ośmiu testowanych acylo-CoA; wyjątek stanowiły 12:0-CoA oraz 16:0-CoA, względem których najwyższą aktywność wykryto we frakcji mikrosomalnej pochodzącej ze stadium III. Aktywność enzymów LPEAT, względem wszystkich testowanych acylo-CoA, w dwóch pozostałych stadiach stanowiła zawsze przynajmniej połowę ich maksymalnej aktywności.

Szczególnie preferowanymi, przez LPEATy nasion *C. sativa*, donorami grup acylowych były nienasycone 18-węglowe acylo-CoA. Dla pierwszego stadium rozwoju nasion odnotowano najwyższą aktywność względem 18:1-CoA (13 pmol [¹⁴C]PE/min/nmol mikrosomalnego PC). Jednakże, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA również były wydajnie wykorzystywane do procesu acylacji na poziomie niższym jedynie odpowiednio o 15% oraz 11% od 18:1-CoA. Zarówno dla drugiego, jak i trzeciego stadium największą specyficzność zaobserwowano względem 18:2-CoA, dla których aktywność wynosiła kolejno 23,4 oraz 16 pmol [¹⁴C]PE/min/nmol mikrosomalnego PC. Enzymy LPEAT obecne we frakcji mikrosomalnej ze stadium II nasion wykazywały również wysoką preferencję względem 18:1-CoA oraz 18:3-CoA (odpowiednio 78% oraz 71% aktywności w stosunku do 18:2-CoA). Natomiast badania przeprowadzone na mikrosomach ze stadium III rozwoju nasion ujawniły wysoką aktywność względem 16:0-CoA, który był równie efektywnie wykorzystywany jak 18:1-CoA oraz 18:3-CoA. Wydajność tych reakcji wahała się w granicach 50-60% aktywności odnotowanej dla 18:2-CoA. Kwas stearynowy sprzężony z koenzymem A był wydajnie wykorzystywany przez enzymy LPEAT również w testach z mikrosomami z nasion z pozostałych stadiów ich rozwoju, a aktywność względem niego wynosiła odpowiedni 7, 9 oraz 10 pmol [¹⁴C]PE/min/nmol mikrosomalnego PC dla testów z mikrosomami z nasion ze stadium I, II i III. Aktywność względem pozostałych, testowanych acylo-CoA z nasyconymi kwasami tłuszczowymi była bardzo niska i nie przekraczała 13% maksymalnej aktywności LPEAT odnotowanej dla danego stadium rozwojowego nasion (Rys. 23).



Rys. 23. Specyficzność substratowa acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina (LPEAT) obecnych w nasionach *C. sativa* w stosunku do różnych acylo-CoA. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

Do przeprowadzenia testów kompetencji, weryfikujących specyficzności substratowe zaobserwowane w reakcjach z wykorzystaniem pojedynczych donorów grup acylowych, wykorzystano 5 różnych acylo-CoA z kwasami tłuszczowymi występującymi w lipidach nasion *C. sativa*. Pod uwagę nie brano acylo-CoA z kwasami tłuszczowymi, których nie wykryto w badanych nasionach (czyli takich jak kwas kaprynowy, laurynowy oraz mirystynowy – Rys. 9). Enzymy LPEAT, podobnie jak w testach z dodatkiem pojedynczych acylo-CoA, wykazywały szczególnie wysoką preferencję względem acylo-CoA z 18-węglowymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Spośród nich najwyższą preferencję wykazywały zaś w stosunku do 18:2-CoA. Aktywność ta została uznana jako referencyjna i względem niej została określana aktywność w stosunku do innych acylo-CoA. Zarówno w testach bez dodatku, jak i z dodatkiem BSA. Drugim preferowanym acylo-CoA był 18:1-CoA, a trzecim 18:3-CoA, przy czym obecność BSA wznosiła preferencję względem pierwszego, a obniżała względem 18:3-CoA. Odpowiednio dla 18:1-CoA odnotowano wzrost z 87 do 96% aktywności referencyjnej, a dla 18:3-CoA spadek z 61% do 29% tej aktywności. Oba z nasyconych donorów acylo-CoA były mniej efektywnie wykorzystywane w procesie acylacji, jednakże dodatek BSA stymulował ich utylizację. W stosunku do 16:0-CoA odnotowano wzrost odpowiednio z 18% do 25% aktywności referencyjnej, a w stosunku do 18:0-CoA z 0,5% do 8% (Rys. 24).



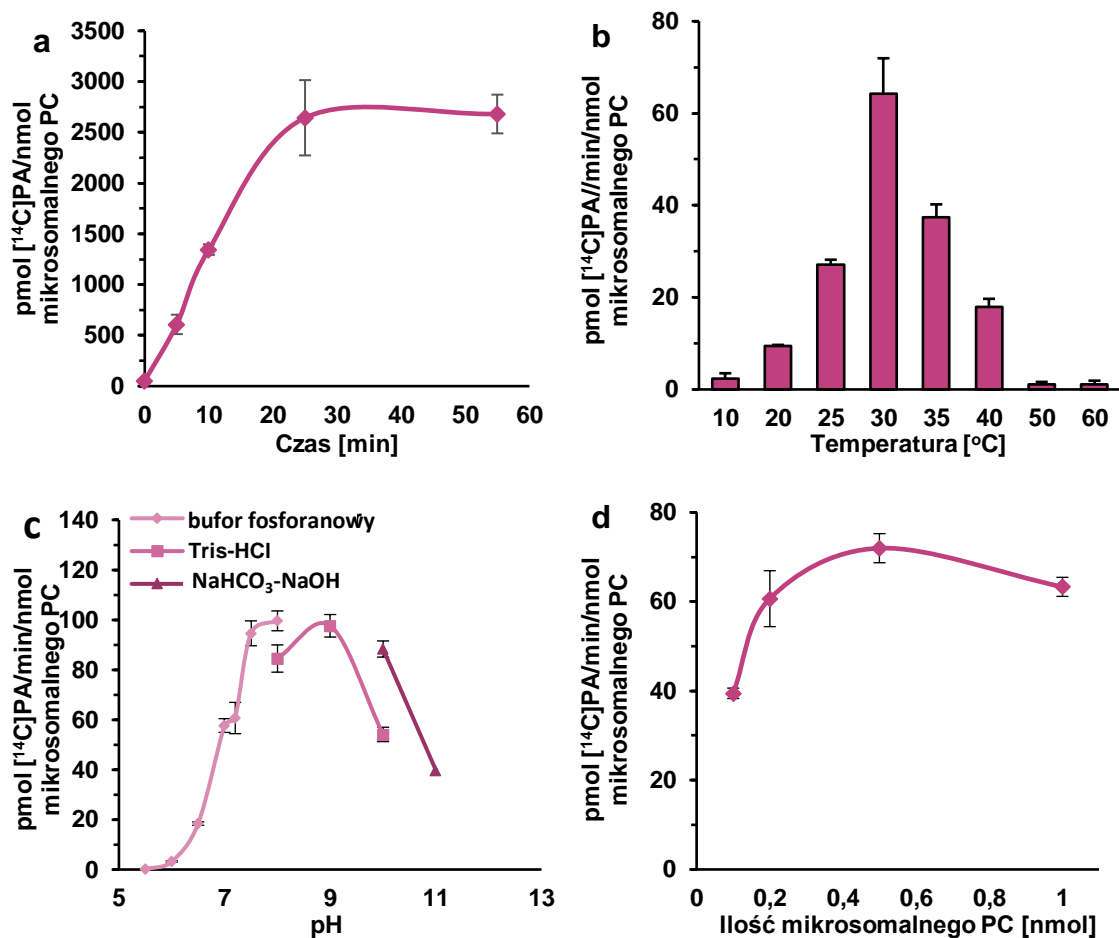
Rys. 24. Aktywność acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina (LPEAT) obecnych w nasionach *C. sativa* w stosunku do pięciu różnych acylo-CoA dodawanych do reakcji w równo molowych stężeniach. **a** – mieszaniny reakcyjne nie zawierały BSA; **b** – mieszaniny reakcyjne zawierały BSA (0,2 mg/reakcja). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

4.3.5. Optymalizacja reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy LPAAT obecne w nasionach *Camelina sativa*

Kolejnym z enzymów typu LPLAT, którego aktywność wykryto w nasionach *C. sativa* był enzym LPAAT katalizujący syntezę kwasu fosfatydowego. Podobnie jak w przypadku dwóch poprzednich analizowanych enzymów typu LPAAT, badania rozpoczęto od ustalenia optymalnych warunków reakcji enzymatycznych katalizowanych przez LPAATy w warunkach *in vitro*.

Testy określające zależność aktywności enzymów LPAAT od czasu reakcji, wykazały, że enzymy te utrzymują liniowość reakcji aż do 30 minuty, po czym następuje faza plateau, w której nie następował już przyrost *de novo* syntetyzowanego [^{14}C]PA (Rys. 25a). W tej fazie wydaje się, że reakcje syntezy i przekształcania powstającego [^{14}C]PA osiągnęły równowagę. Trudno bowiem założyć, że po 30 minutach testowane enzymy straciły nagle aktywność. Badania dotyczące wpływu temperatury wykazały, że enzymy LPAAT są najbardziej aktywne w temperaturze 30 °C, a temperatura zarówno zmniejszona, jak i podwyższona o zaledwie 5 °C prowadzi do spadku aktywności odpowiednio o około 60% i 42%. W temperaturze 20 °C, enzymy zachowywały zaledwie 15% maksymalnej aktywności, podczas gdy najniższa z testowanych temperatur (10 °C)

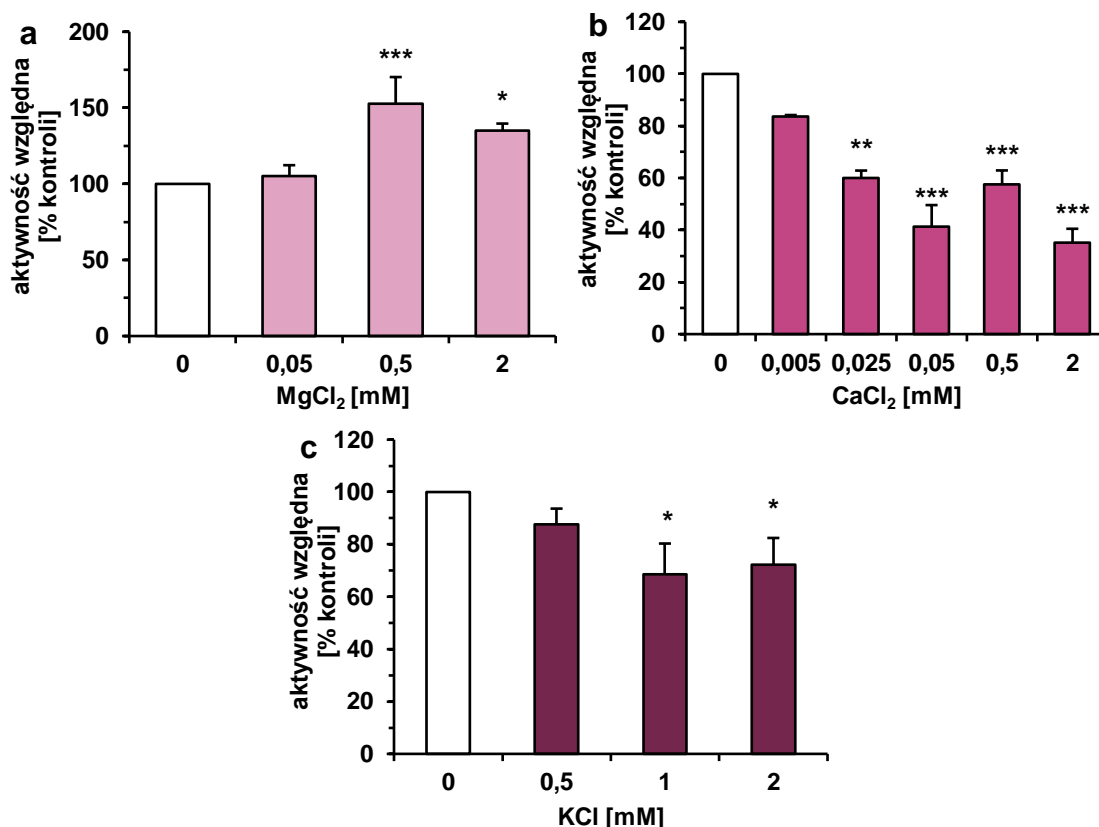
oraz temperatura 50 °C prowadziły do ich prawie całkowitej dezaktywacji (Rys. 25b). Optymalną ilością frakcji mikrosomalnej, przy której LPAATy były najaktywniejsze były alikwoty tej frakcji zawierające 0,5 nmol mikrosomalnego PC (odpowiadające 2,2 µg mikrosomalnego białka). Zmniejszenie ilości mikrosomów do alikwotów zawierających 0,2 nmol, jak i zwiększenie do 1 nmol mikrosomalnego PC powodowało spadek aktywności o około 15%, podczas gdy obniżenie ilości dodawanej do testów frakcji mikrosomalnej do alikwotów zawierających 0,1 nmol mikrosomalnego PC wywoływało redukcję tej aktywności o ponad 55% (Rys. 25d). W badaniach wpływu pH na aktywność enzymów LPAAT wykorzystano trzy 0,1 M bufor: fosforanowy – 5,5-8,0; Tris-HCl – 8,0-10,0 oraz NaHCO₃-NaOH – 10,0-11,0. Enzymy typu LPAAT wykazywały maksymalną aktywność w zakresie pH 7,5-9,0 (przy zastosowaniu buforu fosforanowego oraz Tris-HCl). Ich aktywność wahała się wówczas w granicach 94,6 – 97,6 nmol [¹⁴C]PA/min/nmol mikrosomalnego PC. Wzrost pH w kierunku odczynu bardziej alkalicznego prowadził do obniżenia aktywności, którego efekt zależał od zastosowanego buforu. W przypadku wykorzystania buforu NaHCO₃-NaOH spadek stanowił zaledwie 10% maksymalnej aktywności dla pH 10,0 i aż 60% dla pH 11,0. Natomiast w przypadku wykorzystania buforu Tris-HCl o pH 10,0 enzymy zachowywały jedynie połowę wartości swojej maksymalnej aktywności. Enzymy LPAAT w pH 7,2, czyli wartości zbliżonej do warunków naturalnego występowania tych enzymów utrzymywały ponad 61% maksymalnej aktywności. Dalszy spadek pH, zwiększający kwasowość mieszanin reakcyjnych, prowadził stopniowo do całkowitego zaniku aktywności tych enzymów (Rys. 25c).



Rys. 25. Optymalizacja warunków reakcji dla acylotransferaz acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy (LPAAT) obecnych w nasionach *C. sativa*. **a** – zależność aktywności LPEAT od czasu reakcji, **b** – zależność aktywności LPEAT od temperatury reakcji, **c** – zależność aktywności LPEAT od pH buforu inkubacyjnego, **d** – zależność aktywności LPEAT od zagęszczenia frakcji mikrosomalnej. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

Badania wpływu różnych jonów na aktywność enzymów LPAAT wykazały, że spośród trzech testowanych jonów, jedynie dodatek jonów magnezu stymulował aktywność tych enzymów. Efekt ten był zauważalny już przy stężeniu 0,05 mM, kiedy to odnotowano zwiększenie aktywności o 5%. Wzrost stężenia jonów Mg^{2+} do 0,5-2 mM powodował wzmocnienie tego efektu nawet o około 40-50% (Rys. 26a). Dodatek jonów wapnia oraz potasu wywoływał efekty odwrotne. Jony wapnia już przy najniższym ze stężeń, wynoszącym 0,005 mM, powodowały zahamowanie aktywności o około 16%, podczas gdy stężenie 2 mM prowadziło do zmniejszenia aktywności LPAAT do 35% wartości kontroli (Rys. 26b). Dodatek jonów potasu również prowadził do inhibicji aktywności enzymów LPAAT, aczkolwiek efekt ten nie był tak drastyczny jak

w przypadku dodatku jonów wapnia. Jony K^+ prowadziły do redukcji aktywności LPAAT o około 30% w stężeniach powyżej 1 mM (Rys. 26c).



Rys. 26. Wpływ różnych jonów na aktywność acylotransferaz acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy (LPAAT) obecnych w nasionach *C. sativa*. **a** – wpływ jonów magnezu, **b** – wpływ jonów wapnia, **c** – wpływ jonów potasu. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy kontrolą (testy bez dodatku jonów), a testowanym stężeniem jonów, która została wyznaczona przy zastosowaniu testu t-Studenta, gdzie * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$.

4.3.6. Specyficzność substratowa w reakcjach *forward* enzymów LPAAT obecnych w nasionach *Camelina sativa*

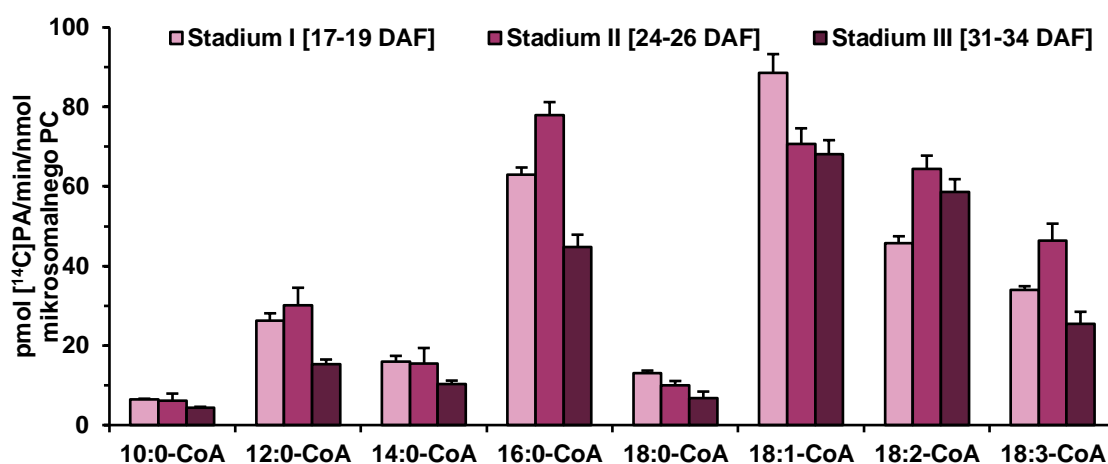
Specyficzność substratową oraz aktywność enzymów LPAAT, występujących w nasionach *C. sativa* w poszczególnych stadiach rozwojowych, określano przy zastosowaniu parametrów wyznaczonych podczas etapu optymalizacji. Jako egzogenne substraty wykorzystano kombinacje ośmiu znakowanych węglem [¹⁴C]acylo-CoA z *sn*-1-18:1-LPA. Źródłem badanych enzymów były zaś frakcje mikrosomalne otrzymane z trzech stadiów rozwojowych nasion. Mieszanki reakcyjne (100 μ l 0,1 M buforu

fosforanowego o pH 7,2) z testowanymi substratami oraz alikwotami frakcji mikrosomalnych zawierających 0,5 nmol mikrosomalnego PC, inkubowano przez 30 minut w 30 °C i poddawano dalszym analizom określającym ilość powstającego [¹⁴C]PA, produktu reakcji katalizowanych przez LPAATy.

Otrzymane wyniki wykazały, że enzymy LPAAT, w zależności od zastosowanego w reakcji donora grup acylowych, są najbardziej aktywne w I bądź II stadium rozwoju nasion *C. sativa*. Spośród testowanych donorów kwasów tłuszczowych, 18:0-CoA oraz 18:1-CoA były najefektywniej wykorzystywane w stadium I, podczas gdy 12:0-CoA, 16:0-CoA, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA w stadium II. W stosunku do pozostałych donorów grup acylowych aktywność w obu z rozważanych stadiów była taka sama. Najniższą z aktywności LPAAT odnotowano w nasionach zebranych 31-34 DAF, jedynie w stosunku do 18:2-CoA najniższą aktywność zaobserwowano w nasionach pochodzących z 17-19 DAF. Niemniej jednak, większość ze zmian w aktywności w stosunku do testowanych acylo-CoA pomiędzy poszczególnymi etapami rozwoju nasion była niewielka. Największe z różnic dostrzegalne były pomiędzy stadium III oraz aktywnością maksymalną odnotowaną dla danego acylo-CoA (takich jak 12:0-CoA, 16:0-CoA, 18:0-CoA oraz 18:3-CoA) w innych stadiach rozwojowych, jednakże nawet wówczas (stadium III) LPAATy osiągały co najmniej 50% ich najwyższej aktywności (Rys. 27).

Enzymy LPAAT szczególnie preferowały acylo-CoA z nienasyconymi 18-węglowymi kwasami tłuszczowymi oraz 16:0-CoA. Odnotowane preferencje zmieniały się jednak wraz z rozwojem nasion *C. sativa*. Wśród acylo-CoA z nienasyconymi 18-węglowymi kwasami tłuszczowymi szczególnie preferowany był 18:1-CoA, następnie 18:2-CoA, a najmniej 18:3-CoA. Maksymalną aktywność enzymów LPAAT odnotowano dla nasion ze stadium I, w stosunku do 18:1-CoA; wynosiła ona 88 pmol [¹⁴C]PA/min/nmol mikrosomalnego PC. Wraz z rozwojem nasion aktywność w stosunku do 18:1-CoA zmniejszyła się odpowiednio o około 20% (stadium II) oraz 23% (stadium III) jednakże również w stadium III była najwyższa spośród wszystkich testowanych acylo-CoA. Wyjątek stanowiło stadium II rozwoju nasion, gdzie odnotowano najwyższą specyficzność w stosunku do 16:0-CoA wynoszącą 77 pmol [¹⁴C]PA/min/nmol mikrosomalnego PC. W stadium I, ten acylo-CoA był jako drugi najlepiej preferowany (zaraz po 18:1-CoA), a na stadium III jako trzeci (zaraz za 18:1-CoA oraz 18:2-CoA). Spośród wszystkich badanych enzymów typu LPLAT, enzymy LPAAT wykazywały najwyższą z aktywności względem acylo-CoA

z nasyconymi średniołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi. Szczególnie preferowany był 12:0-CoA względem, którego aktywność oscylowała w granicach 22-42% aktywności w stosunku do najlepiej akceptowanego – 18:1-CoA. Pozostałe z tego typu donorów grup acylowych również były efektywnie utylizowane, jednak z intensywnością nie przekraczającą 20% maksymalnej aktywności odnotowanej dla 18:1-CoA (Rys. 27).

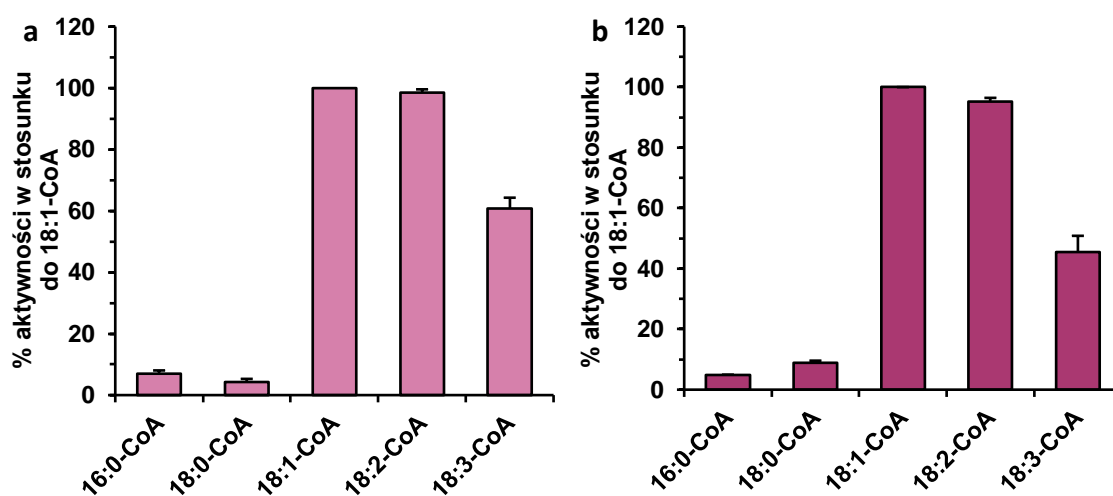


Rys. 27. Specyficzność substratowa acylotransferaz acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy (LPAAT) obecnych w nasionach *C. sativa* względem różnych acylo-CoA. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

Testy kompetencji, weryfikujące zaobserwowane w testach z użyciem pojedynczych donorów acylo-CoA preferencje, zostały przeprowadzone dla enzymów LPAAT obecnych w nasionach *C. sativa* w III stadium ich rozwoju. Jako donory grup acylowych przygotowano mieszaninę składającą się z równo molowych ich ilości acylo-CoA z kwasami tłuszczowymi, których obecność wykryto w nasionach *C. sativa* (Rys. 9). Testy przeprowadzono w dwóch wariantach bez dodatku oraz z dodatkiem BSA. Wyniki przedstawione zostały na poniższych wykresach (Rys. 28), a aktywność w stosunku do różnych acylo-CoA została przedstawiona jako % aktywności względem 18:1-CoA, dla którego odnotowano najwyższą aktywność.

Podobnie jak w testach określających specyficzność względem pojedynczych acylo-CoA, w testach kompetencji odnotowano wysoką aktywność w stosunku do 18:1-CoA oraz 18:2-CoA. Oba z donorów grup acylowych były wykorzystywane na prawie takim samym poziomie zarówno w testach bez dodatku, jak i z dodatkiem BSA. Trzeci z acylo-CoA z nienasyconym 18-węglowym kwasem tłuszczowym (18:3-CoA), był akceptowany o około 40% i 55% słabiej niż 18:1-CoA, odpowiednio w testach bez oraz

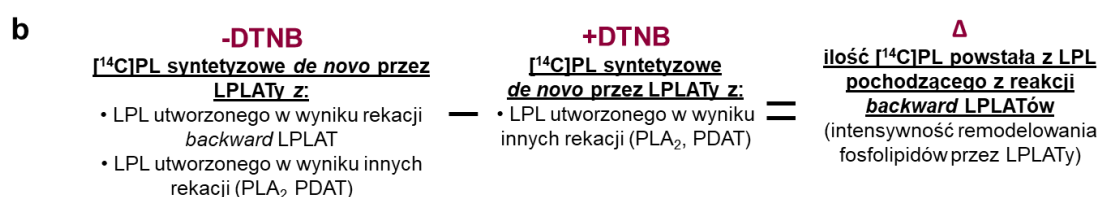
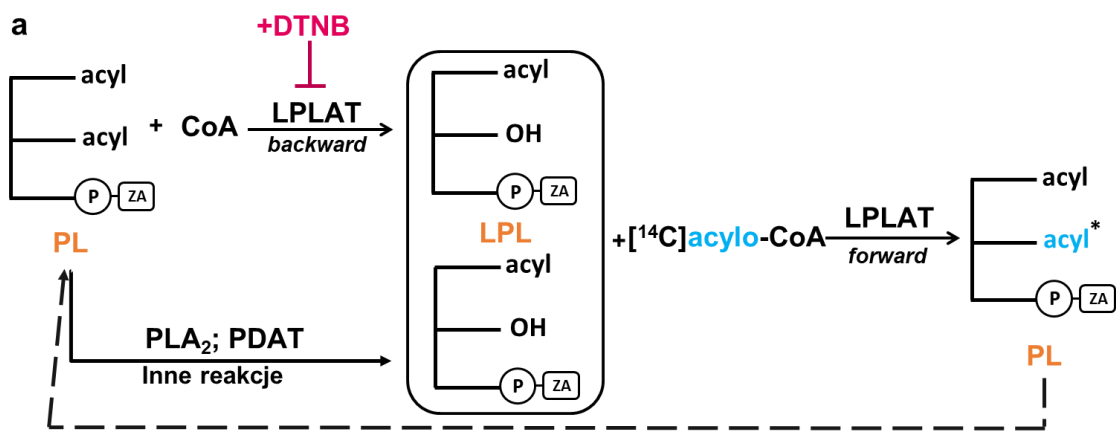
z dodatkiem BSA. Tendencje odnotowane dla tych acylo-CoA odzwierciedlają preferencje wykazane przez LPAATy nasion *C. sativa* w poprzednich testach określających ich aktywność względem pojedynczych acylo-CoA. Z drugiej strony, w stosunku do acylo-CoA z nasyconymi kwasami tłuszczowymi, obecnymi w mieszaninie różnych acylo-CoA, wykazano znacznie niższą preferencję enzymów LPAAT niż w testach z pojedynczymi acylo-CoA. Szczególnie istotną redukcję preferencji zaobserwowano względem 16:0-CoA. Wykorzystanie tego donora w testach kompetencji, wynosiło zaledwie 6% i 4% wykorzystania 18:1-CoA w tego typu testach, odpowiednio bez oraz z dodatkiem BSA, podczas gdy w testach z pojedynczymi acylo-CoA aktywność testowanych LPAATów względem 16:0-CoA wynosiła nie mniej niż 70% aktywności odnotowanej dla 18:1-CoA (Rys. 27 i 28). Również preferencja testowanych LPAATów w stosunku do 18:0-CoA zmniejszyła się w tego typu testach, chociaż mniej drastycznie niż w stosunku do 16:0-CoA. Obecność BSA w mieszaninie reakcyjnej poprawiała znacząco jego wykorzystanie (dwukrotny wzrost), które zbliżało się wtedy do jego wykorzystania w testach z pojedynczymi acylo-CoA (Rys. 27 i 28).



Rys. 28. Aktywność acylotransferaz acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy (LPAAT) obecnych w nasionach *C. sativa* w stosunku do pięciu różnych acylo-CoA dodawanych do reakcji w równo molowych stężeniach. **a** – mieszaniny reakcyjne nie zawierały BSA; **b** – mieszaniny reakcyjne z dodatkiem BSA (0,2 mg/reakcja). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

4.3.7. Aktywność i specyficzność substratowa w reakcjach *backward* enzymów typu LPLAT obecnych w nasionach *Camelina sativa*

Kolejnym etapem badań było określenie aktywności oraz specyficzności substratowej testowanych enzymów typu LPLAT w reakcjach „do tyłu”. Reakcje te przeprowadza się w warunkach *in vitro* w obecności donora grup acylowych, wolnego koenzymu A, BSA oraz badanych frakcji mikrosomalnych stanowiących źródło zarówno LPLATów, jak i fosfolipidów ulegających procesowi remodelowania. Podczas reakcji „do tyłu” dochodzi do odłączania grup acylowych od fosfolipidów, które kolejno przenoszone są na koenzym A, a następnie do cytoplazmatycznej puli acylo-CoA. Równocześnie produkowane są odpowiednie lizofosfolipidy, które mogą zostać wykorzystane w reakcjach „do przodu”. Pula endogennych lizofosfolipidów może być także tworzona w wyniku innych reakcji, takich jak aktywność fosfolipaz (cykl Lands’a) oraz w reakcjach katalizowanych przez enzymy PDAT. Jednakże dodatek DTNB, do przeprowadzanych *in vitro* reakcji enzymatycznych, wpływa na zahamowanie reakcji *backward* katalizowanych przez LPLATy, ponieważ związek ten kowalencyjnie wiąże się z grupą tiolową (-SH) koenzymu A, uniemożliwiając wiązanie się do niego grup acylowych w reakcjach typu „do tyłu”. Równocześnie, dodatek tego związku do reakcji nie wpływa na aktywność LPLATów w reakcjach „do przodu”. W ramach badań przeprowadzone zostały dwa rodzaje testów: z dodatkiem oraz bez dodatku DTNB. Przeprowadzenie reakcji bez dodatku DTNB pozwalało na określenie udziału zarówno enzymów typu LPLAT, jak i innych enzymów (biorących udział w powstawaniu lizofosfolipidów – LPL) w procesie remodelowania mikrosomalnych fosfolipidów, podczas gdy reakcje z DTNB pozwalały na określenie udziału w remodelowania fosfolipidów jedynie „innych” reakcji (biorących udział w powstawaniu LPL z wyłączeniem reakcji typu *backward* przeprowadzanych przez enzymy LPLAT). W obu typach testów syntetyzowana była *de novo* pula [¹⁴C]PL przez enzymy LPLAT (reakcje „do przodu”) wykorzystujące pulę endogennych LPL i egzogennych [¹⁴C]acylo-CoA, jednakże w obecności DTNB pula wykorzystywanych endogennych LPL pochodziła z reakcji „innych” niż reakcje „do tyłu” przeprowadzane przez LPLATy. Przeprowadzenie obu wariantów testów, a następnie odjęcie ilości *de novo* syntetyzowanego [¹⁴C]PL w testach z DTNB od ilości [¹⁴C]PL syntetyzowanego w testach bez dodatku DTNB umożliwiało określenie aktywności enzymów LPLAT w reakcjach typu *backward*. Schemat przebiegu obu reakcji oraz schemat wykonywanych obliczeń został przedstawiony na Rys. 29.



Rys. 29. Schemat syntezy lizofosfolipidów w wyniku reakcji katalizowanych przez aktywność *backward* enzymów LPLAT oraz innych reakcji (PLA₂, PDAT), które kolejno wykorzystywane są do syntezy *de novo* puli fosfolipidów (a). Powyższa reakcja przeprowadzana jest w warunkach *in vitro* bez lub z dodatkiem DTNB, a na podstawie otrzymanych wyników z obu rodzajów testów możliwe jest obliczenie intensywności reakcji *backward* LPLAT, według przedstawionego wzoru (b). DTNB – (kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy)), LPL – lizofosfolipid, LPLAT – acylotransferaza acylo-CoA:lizofosfolipid, PLA₂ – fosfolipaza A₂, PDAT – acylotransferaza fosfolipid:diacyloglicerol.

Do przeprowadzenia reakcji zastosowano parametry, które już uprzednio wykorzystano w tego typu testach (Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2016). Jako źródło enzymów i fosfolipidów podlegających remodelowaniu użyto frakcje mikrosomalne otrzymane ze wszystkich trzech badanych stadiów rozwojowych nasion *C. sativa*. Dodatkowo do reakcji wykorzystano [¹⁴C]acylo-CoA, niezbędne do przeprowadzenia procesu edycji grup acylowych i stymulacji reakcji *forward*. Do testów użyto 16:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA, jednakże w przypadku zastosowania 16:0-CoA nie odnotowano żadnej aktywności bądź była ona na granicy detekcji, w związku z czym poniżej przedstawiono wyniki jedynie dla pozostałych donorów grup acylowych. Uznano w nich, że proces remodelowania PC jest wynikiem działania LPCATów zaś proces remodelowania PE i PA efektem działania odpowiednio LPEATów i LPAATów. Jest to pewne uproszczenie, albowiem LPCATy są zdolne do remodelowania nie tylko PC,

a LPEATy i LPAATy nie tylko PE i PA, ale w pewnym stopniu również innych fosfolipidów.

Spośród wszystkich testowanych enzymów, enzymy o aktywności LPCAT (przy założeniu przedstawionym wyżej) wykazywały największą zdolność do katalizowania reakcji typu *backward* (przedstawionej jako Δ w poniższej Tabeli 10). Jednakże zarówno dla enzymów o aktywności LPEAT, jak i LPAAT (również przy założeniu przedstawionym wyżej) odnotowano zdolność do przeprowadzania tego typu reakcji. Odpowiednio każdy z nich katalizował reakcję „do tyłu” z maksymalnie 9% oraz 21% wydajnością odnotowaną dla aktywności LPCATów. Dla enzymów LPCAT oraz LPEAT największą aktywność odnotowano w pierwszym z analizowanych stadiów rozwojowych nasion *C. sativa* (17-19 DAF), podczas gdy dla enzymów LPAAT było to stadium II (24-26 DAF). W stadium III (31-34 DAF) odnotowano najniższe aktywności dla wszystkich z badanych enzymów, przy czym dla LPCATów wartości te niewiele różniły się w porównaniu do stadium II. Wyniki tego typu potwierdzają w pewnym stopniu założenie, że za remodelowanie PC, PE i PA odpowiadają, odpowiednio, głównie LPCATy, LPEATy oraz LPAATy.

Enzymy LPCAT o najwyższej z aktywności *backward* charakteryzowały się również zmienną intensywnością wykorzystania donorów grup acylowych na poszczególnych etapach rozwoju nasion. Dla nasion zebranych 17-19 DAF najwyższą specyficzność odnotowano w stosunku do 18:1-CoA, wykorzystywanego do remodelowania puli PC. W kolejnych analizowanych etapach rozwoju nasion aktywność ta odpowiednio stanowiła 60% oraz 35% aktywności odnotowanej w stadium I. Wraz z rozwojem nasion specyficzność tych enzymów, w wykorzystaniu acylo-CoA do przebudowy puli PC, skierowała się ku 18:2-CoA. Wykorzystanie 18:1-CoA i 18:3-CoA przez LPCATy nasion z drugiego stadium rozwoju było również wysokie i stanowiło odpowiednio, 97% oraz 65% wydajności reakcji z wykorzystaniem 18:2-CoA, podczas gdy LPCATy ze stadium III wykorzystywały te donory prawie dwukrotnie mniej efektywnie niż 18:2-CoA. Udział reakcji „innych” (cyklu Lands’a, aktywności enzymów PDAT) w procesie przebudowy puli PC średnio wynosił około 35%, a maksymalnie zbliżał się do 50% - dla procesu remodelowania z wykorzystaniem 18:1-CoA w reakcjach z wykorzystaniem frakcji mikrosomalnych ze stadium III rozwoju nasion (Tabela 10).

Drugimi z enzymów przeprowadzających z najwyższą intensywnością reakcje typu *backward* były LPAATy. Odnotowano dla nich najwyższą specyficzność, spośród wszystkich wykorzystywanych w reakcjach acylo-CoA, w stosunku do 18:1-CoA prawie

w każdym z analizowanych stadiów rozwoju nasion *C. satvia* (w stadium III nieco lepsze aktywności odnotowano dla testów z 18:2-CoA). Odnotowana aktywność LPAATów w procesie remodelowania PA przy udziale 18:1-CoA była najwyższa w reakcjach z udziałem frakcji mikrosomalnych z nasion z II stadium ich rozwoju. Odpowiednio aktywność ta wynosiła około 62% oraz 31% aktywności odnotowanej w stadium II w reakcjach z mikrosomami z nasion ze stadium I i stadium III. Wykorzystanie w procesie remodelowania PA, w reakcjach z mikrosomami z II stadium rozwoju badanych nasion, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA było o około 19% oraz 69% niższe (odpowiednio) niż wykorzystanie 18:1-CoA. W reakcjach z mikrosomami z pozostałych stadiów rozwoju nasion (stadium I i III) intensywność reakcji typu *backward* była również najwolniejsza przy obecności w mieszaninie reakcyjnej 18:3-CoA. Wykorzystanie 18:2-CoA w tego typu reakcjach z mikrosomami z nasion z I stadium rozwojowego było o około 30% słabsze niż przy udziale 18:1-CoA, a w reakcjach z mikrosomami z nasion z III stadium rozwoju nawet nieco intensywniejsze. Udział „innych” reakcji w procesie remodelowania puli PA w testach z udziałem frakcji mikrosomalnych z dwóch pierwszych analizowanych etapów rozwoju nasion był znikomy, natomiast w testach z mikrosomami z nasion zebranych 31-34 DAF udział tych reakcji był prawie taki sam lub większy niż udział reakcji *backward* enzymów LPAAT (Tabela 10).

Ostatnia badana grupa enzymów – LPEATy – przeprowadzała reakcje typu *backward* z najmniejszą intensywnością. Tak jak podano to na początku tego rozdziału, ich efektywność w tego typu reakcjach była oceniana poprzez pomiar edycji grup acylowych obecnych w fosfatydyloetanoloamine. Proces ten zachodził najlepiej wówczas, gdy 18:2-CoA, był wykorzystywany do przebudowy puli PE. Aktywność typu *backward* w testach z tym substratem malała wraz z rozwojem nasion, a efektywność procesu remodelowania w wyniku aktywności *backward* w kolejno następujących stadiach zachowywała jedynie 80% oraz 25% aktywności odnotowanej w reakcjach z frakcją mikrosomalną z nasionach z 17-19 DAF. W reakcjach z udziałem obu pozostałych donorów grup acylowych (18:1-CoA i 18:3-CoA) również odnotowano spadek aktywności *backward* w kolejnych stadiach rozwojowych nasion, przy czym w reakcjach z udziałem frakcji mikrosomalnej z nasion ze stadium III aktywność ta była poniżej poziomu detekcji. Udział reakcji „innych” w procesie remodelowania PE w dwóch pierwszych analizowanych stadiach rozwoju nasion był porównywalny do efektywności reakcji typu „do tyłu” katalizowanej przez LPEATy. W stadium III

dominujący udział miały tzw. „inne” reakcje; katalizowane np. przez fosfolipazy czy enzym PDAT (Tabela 10).

Specyficzności substratowe odnotowane dla reakcji *backward* katalizowanych przez enzymy LPLAT na każdym ze stadiów rozwoju nasion zostały również potwierdzone w testach kompetencji. Do ich przeprowadzenia wykorzystano równo molowe ilości trzech najlepiej, akceptowanych donorów grup acylowych (18:1-CoA, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA). Jako źródło enzymów wykorzystano frakcje mikrosomalne otrzymane z nasion pochodzących z II stadium ich rozwoju. Enzymy LPCAT wykazywały najwyższą preferencję z stosunku do 18:2-CoA, podobnie jak w testach z dodatkiem jednego acylo-CoA. Pozostałe substraty były o 24% (18:1-CoA) oraz 72% (18:3-CoA) mniej wydajnie wykorzystywane do przebudowy puli PC. Reakcja *backward* katalizowana przez LPAATy najefektywniej przebiegała w obecności 18:1-CoA, dla pozostałych dwóch donorów odnotowano wydajność na poziomie 77% (dla 18:2-CoA) oraz 54% (18:3-CoA) aktywności odnotowanej dla 18:1-CoA. Enzymy LPEAT, ponownie najlepiej przeprowadzały ten proces w obecności 18:2-CoA. Jednak drugim najlepiej akceptowanym donorem grup acylowych był 18:3-CoA, podczas gdy 18:1-CoA nie był zupełnie wykorzystywany w reakcjach *backward* (w testach kompetencji) przeprowadzonych przez te enzymy (Tabela 11). Efektywność całego procesu remodelowania PC w reakcjach *backward* w testach kompetencji (suma włączanych do PC [¹⁴C]acyli) była wyższa od średniej efektywności remodelowania tego fosfolipidu w testach z pojedynczymi acylo-CoA; odpowiednio remodelowaniu ulegało 1,82 i 1,26 pmol z jednego nmol mikrosomalnego PC w ciągu minuty. Również efektywność całego procesu remodelowania PE i PA była wyższa w testach kompetencji (suma włączonych [¹⁴C]acyli z wszystkich znajdujących się w testach acylo-CoA) niż średnia efektywność remodelowania w testach z pojedynczymi acylo-CoA; odpowiednio 0,13 i 0,23 w porównaniu do 0,07 i 0,20 pmol z PE i PA obecnych w alikwotach frakcji mikrosomalnych zawierających 1 nmol mikrosomalnego PC w ciągu minuty. Udział „innych” reakcji w procesie remodelowania PC, PE i PA uległ również znacznemu zwiększeniu w testach kompetencji (suma włączonych [¹⁴C]acyli z wszystkich znajdujących się w testach acylo-CoA) w porównaniu do średniego udziału tych reakcji w testach z pojedynczymi acylo-CoA; odpowiednio 2,43, 0,14 i 0,05 w porównaniu do 0,61, 0,07 i 0,026 pmol mikrosomalnego PC, PE i PA obecnych w alikwotach frakcji mikrosomalnych zawierających 1 nmol mikrosomalnego PC w ciągu minut (Tabele 10 i 11).

Tabela 10. Efektywność włączania [¹⁴C]grup acylowych z [¹⁴C]acylo-CoA do odpowiednich fosfolipidów: fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy oraz kwasu fosfatydowego w wyniku aktywność typu „do tyłu – *backward*” połączonej z aktywnością „do przodu – *forward*” przeprowadzanej przez odpowiednie acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid: LPCATy, LPEATy oraz LPAATy. Reakcje zostały przeprowadzone bez dodatku do reakcji DTNB (lizofosfolipidy wytwarzane w reakcjach „do tyłu – *backward*” przeprowadzane przez LPLATy oraz przez reakcje innego typu) oraz z dodatkiem DTNB (lizofosfolipidy wytwarzane jedynie przez „inne” reakcje). Delta reprezentuje efektywność wymiany grup acylowych w wyniku aktywności typu „do tyłu” przez badane acylotransferazy (od wartości uzyskanych z testów bez dodatku DTNB odjęto wartości uzyskane z testów z DTNB). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym (n ≥ 3). Remodelowanie PC uznano za efekt działania LPCATów zaś remodelowanie PE i PA za efekt działania LPEATów i LPAATów odpowiednio.

Stadium rozwojowe nasion	Donor [acyl-CoA]	LPCAT			LPEAT			LPAAT		
		pmol [¹⁴ C]PC/min/nmol mikrosomalnego PC	pmol [¹⁴ C]PE/min/nmol mikrosomalnego PC	pmol [¹⁴ C]PA/min/nmol mikrosomalnego PC	-DTNB	+DTNB	Δ	-DTNB	+DTNB	Δ
Stadium I [17-19 DAF]	[¹⁴ C]18:1-CoA	3.16 ± 0.4	0.76 ± 0.1	2.4	0.23 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.11	0.18 ± 0.03	0	0.18
	[¹⁴ C]18:2-CoA	2.65 ± 0.5	0.91 ± 0.05	1.74	0.36 ± 0.03	0.2 ± 0.003	0.16	0.12 ± 0.01	0	0.12
	[¹⁴ C]18:3-CoA	1.78 ± 0.05	0.78 ± 0.1	1.0	0.16 ± 0.017	0.12 ± 0.01	0.04	0.08 ± 0.003	0	0.08
Stadium II [24-26 DAF]	[¹⁴ C]18:1-CoA	2.04 ± 0.2	0.64 ± 0.01	1.4	0.12 ± 0.018	0.06 ± 0.006	0.06	0.31 ± 0.02	0.02 ± 0.001	0.29
	[¹⁴ C]18:2-CoA	2.16 ± 0.1	0.72 ± 0.06	1.44	0.23 ± 0.008	0.1 ± 0.008	0.13	0.26 ± 0.02	0.03 ± 0.004	0.23
	[¹⁴ C]18:3-CoA	1.39 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.93	0.09 ± 0.009	0.06 ± 0.004	0.03	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.004	0.09
Stadium III [31-34 DAF]	[¹⁴ C]18:1-CoA	1.8 ± 0.1	0.95 ± 0.05	0.85	0.08 ± 0.007	0.10 ± 0.001	0	0.17 ± 0.018	0.08 ± 0.005	0.09
	[¹⁴ C]18:2-CoA	2.56 ± 0.06	0.94 ± 0.06	1.62	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.019	0.04	0.18 ± 0.018	0.07 ± 0.003	0.11
	[¹⁴ C]18:3-CoA	1.51 ± 0.1	0.65 ± 0.06	0.86	0.04 ± 0.001	0.05 ± 0.0	0	0.08 ± 0.013	0.05 ± 0.003	0.03

Tabela 11. Efektywność włączania [¹⁴C]grup acylowych z [¹⁴C]acylo-CoA do odpowiednich fosfolipidów: fosfatydylocholino, fosfatydyloetanolaminy oraz kwasu fosfatydowego w wyniku aktywność typu „do tyłu – *backward*” połączonej z aktywnością „do przodu – *forward*” przeprowadzanej przez odpowiednie acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid: LPCATy, LPEATy oraz LPAATy w obecności mieszaniny zawierającej równo molowe ilości donorów grup acylowych. Reakcje zostały przeprowadzone bez dodatku do reakcji DTNB (lizofosfolipidy wytwarzane w reakcjach „do tyłu – *backward*” przeprowadzane przez LPLATy oraz przez reakcje innego typu) oraz z dodatkiem DTNB (lizofosfolipidy wytwarzane jedynie przez inne reakcje). Delta reprezentuje efektywność wymiany grup acylowych w wyniku aktywności typu „do tyłu” przez badane acylotransferazy (od wartości uzyskanych z testów bez dodatku DTNB odjęto wartości uzyskane z testów z DTNB). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym (n ≥ 3). Remodelowanie PC uznano za efekt działania LPCATów zaś remodelowanie PE i PA za efekt działania LPEATów i LPAATów odpowiednio.

Enzym LPLAT	Rodzaj reakcji	Donor [acylo-CoA]		
		18:1-CoA	18:2-CoA	18:3-CoA
LPCAT pmol [¹⁴ C]PC/min/nmol mikrosomalnego PC	-DTNB	1,65 ± 0,16	1,66 ± 0,16	1,01 ± 0,04
	+DTNB	0,97 ± 0,06	0,76 ± 0,05	0,76 ± 0,03
	Δ	0,68	0,89	0,25
LPEAT pmol [¹⁴ C]PE/min/nmol mikrosomalnego PC	-DTNB	0,07 ± 0,001	0,11 ± 0,01	0,02 ± 0,001
	+DTNB	0,07 ± 0,001	0,06 ± 0,001	0,01 ± 0,001
	Δ	0	0,05	0,01
LPAAT pmol [¹⁴ C]PA/min/nmol mikrosomalnego PC	-DTNB	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,09 ± 0,001
	+DTNB	0	0,03 ± 0,001	0,02 ± 0,001
	Δ	0,13	0,1	0,07

4.3.8. Udział enzymów LPLAT w transferze kwasów tłuszczowych z puli fosfolipidów do puli acylo-CoA w nasionach *Camelina sativa*

Podczas reakcji typu *backward*, katalizowanych przez enzymy LPLAT poza powstającą pulą lizofosfolipidów, powstaje również równo molowa ilość acylo-CoA, głównie tworzona przez grupy acylowe obecne w pozycji *sn-2* fosfolipidów (Lager i in., 2013). W związku z powyższym, wyznaczony uprzednio udział tych enzymów w procesie remodelowania fosfolipidów (Tabela 10) odzwierciedla także ich zdolność do remodelowania cytoplazmatycznej puli acylo-CoA, dostępnej jako źródło grup

acylowych dla różnych acylotransferaz. Uwzględniając tą zależność, możliwe było wykonanie obliczeń odzwierciedlających potencjalną ilość kwasów tłuszczowych, które mogłyby zostać przeniesione z puli fosfolipidów do puli acylo-CoA, poprzez reakcje typu *backward* prowadzone przez enzymy LPLAT, w celu udostępnienia ich jako substraty do innych reakcji takich jak synteza triacylogliceroli, czy remodelowanie innych fosfolipidów. W celu przeprowadzenia tych obliczeń pod uwagę brano: intensywność reakcji *backward* odpowiednich enzymów LPLAT w testach wykorzystujących [¹⁴C]18:1-CoA (Tabela 10, wartości oznaczone jako Δ), średnią ilość nmol PC obecnego w pojedynczym nasieniu *C. sativa* (Rys. 10) umożliwiającą określenie całkowitej aktywności tych enzymów w całym nasieniu oraz czas pomiędzy analizowanymi fazami rozwoju nasion *C. sativa*. Jako intensywność tego procesu między 10, a 17 DAF przyjęto aktywność reakcji „do tyłu” w 17 DAF (ponieważ dla nasion 10 DAF nie było możliwe wykonanie izolacji frakcji mikrosomalnej z zarodków), natomiast aktywność dla okresów pomiędzy 17, a 24 DAF oraz 24, a 31 DAF określono poprzez wyznaczenie średniej aktywności odnotowanej dla obu stadiów. Kolejno wszystkie dane pomnożono według wzoru:

średnia intensywność reakcji *backward* enzymów LPLAT przy wykorzystaniu 18:1-CoA ([¹⁴C]PL/min/nmol mikrosomalnego PC) x średnia ilość PC obecnej w jednym nasieniu (nmol) x czas między analizowanymi etapami rozwoju (min) = **ilość kwasów tłuszczowych przenoszona z puli PL do puli acylo-CoA przez reakcję *backward* enzymów LPLAT pomiędzy analizowanymi stadiami rozwoju nasion *C. sativa*.**

Zgodnie z powyższym wzorem obliczono również potencjalny transfer kwasów tłuszczowych przenoszonych z puli fosfolipidów do puli acylo-CoA w wyniku zarówno reakcji *backward* LPLAT jak i reakcji „innych” (aktywność enzymów PDAT, cykl Lands’a). W tym celu do obliczeń wykorzystano intensywność remodelowania odpowiednich fosfolipidów w testach bez dodatku DTNB (Tabela 10).

Część z wyników, określająca rolę reakcji *backward* w procesie remodelowania puli acylo-CoA została przedstawiona na Rys. 30, gdzie dodatkowo znajdują się dane dotyczące zawartości kwasów tłuszczowych we wszystkich acylolipidach oraz w puli TAG (określone na podstawie danych z Rys. 9 oraz Tabeli 7). Natomiast dane dotyczące udziału w tym procesie poszczególnych enzymów LPLAT (reakcje *backward*) oraz udziału tych enzymów sumarycznie z innymi enzymami zostały przedstawione osobno dla każdego z fosfolipidów na Rys. 31.

Potencjalny transfer kwasów tłuszczowych z puli PC do puli acylo-CoA poprzez reakcję „do tyłu” enzymów LPCAT był bardzo wysoki i na wczesnych etapach rozwoju nasion (tj. 10-17 DAF) wynosił ponad 90% całkowitej zawartości kwasów tłuszczowych zgromadzonych w puli TAG. Wraz z rozwojem nasion, enzymy te były zdolne do przeniesienia z puli PC do puli acylo-CoA prawie połowę kwasów tłuszczowych obecnych w puli TAG (Rys. 30). W drugim i trzecim z analizowanych stadiów rozwojowych nasion *C. sativa* wzrastał również znacząco udział „innych” reakcji w transferze kwasów tłuszczowych z PC do puli acylo-CoA. Potencjalna sumaryczna efektywność przenoszenia tych związków przy udziale wszystkich z możliwych reakcji była o około 34% oraz o około 45% większa od potencjalnej efektywności tego procesu jedynie na drodze reakcji *backward* przeprowadzanej przez LPLATy odpowiednio w okresie 17-24 DAF oraz 24-31 DAF (Rys. 31a).

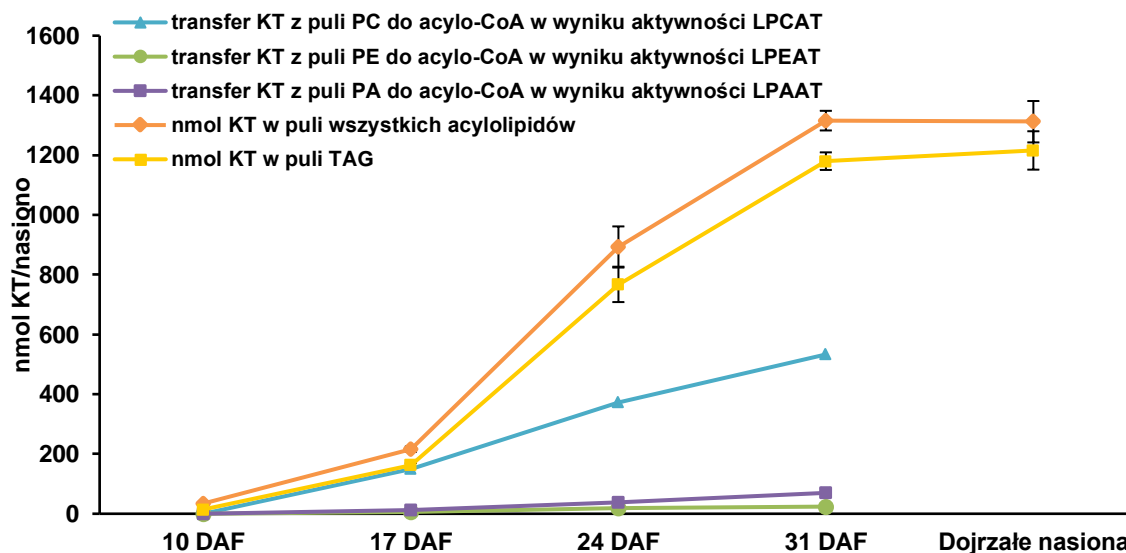
Efektywność przenoszenia kwasów tłuszczowych z puli PE do puli acylo-CoA poprzez enzymy LPEAT okazała się być niewielka i stanowiła zaledwie 7, 18 oraz 24 nmol kolejno po każdym z etapów rozwoju nasion: 17, 24 oraz 31 DAF. Stanowiło to około 7%, 2,6% i 2,2% kwasów tłuszczowych TAG nasion z tych okresów rozwojowych. Proces ten był jednak prawie dwukrotnie wydajniejszy wówczas, gdy uwzględniony został także udział innych enzymów uczestniczących w transferze kwasów tłuszczowych z puli PE do puli acylo-CoA (Rys. 31b).

Aktywność *backward* enzymów LPAAT okazała się być wiodąca w transferze kwasów tłuszczowych między pulą tego fosfolipidu, a pulą acylo-CoA. Do 24 DAF praktycznie tylko one uczestniczyły w transferze kwasów tłuszczowych z PA do puli cytoplazmatycznego acylo-CoA. Po tym czasie ich udział tylko nieznacznie się zmniejszył; „inne” reakcje były odpowiedzialne za około 6% tego transferu pomiędzy II, a III z badanych stadiów rozwojowych nasion. Potencjalna ilość kwasów tłuszczowych przeniesionych z PA do puli cytoplazmatycznego acylo-CoA wynosiła około 5-7% kwasów tłuszczowych obecnych w TAG nasion z analizowanych okresów rozwojowych (Rys. 31c).

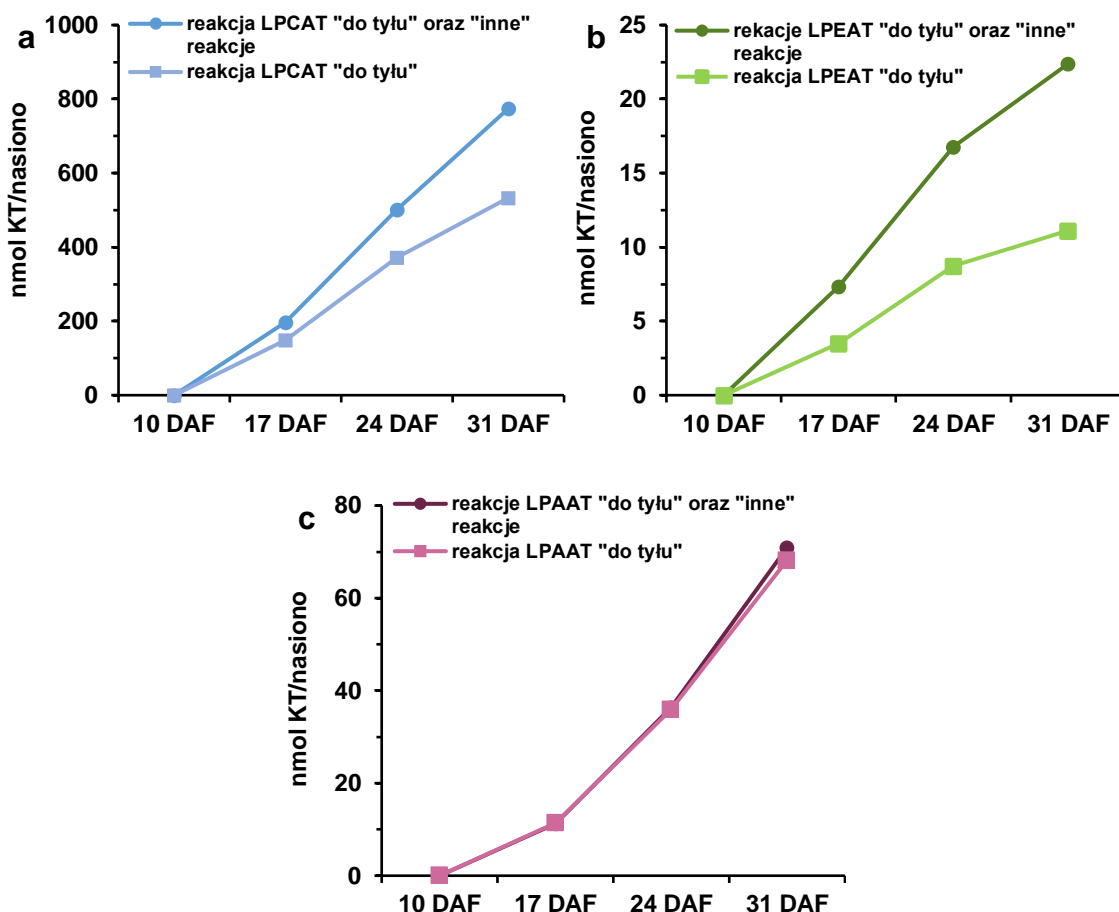
Biorąc pod uwagę, że względna ilość PUFA w puli TAG nasion *C. sativa* stanowi około 50% wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w tej klasie lipidów (Rys. 10), można wnioskować, że efektywność reakcji *backward* katalizowanych przez LPCATy jest wystarczająca do przeniesienia wszystkich tych kwasów tłuszczowych z miejsca ich syntezy (fosfatydylocholiny) do puli acylo-CoA, stając się w ten sposób źródłem substratów (donorów grup acylowych) dla innych acylotransferaz. Enzymy LPAAT

mogą odpowiadać za przeniesienie około 5,9% kwasów tłuszczowych obecnych ostatecznie w puli lipidów zapasowych. Ich udział w suplementacji puli acylo-CoA wykorzystywanej do produkcji TAG w początkowych etapach rozwoju jest wyższy i stanowi nawet około 7% (dla okresu pomiędzy 10-17 DAF), po czym stopniowo maleje. W przypadku enzymów LPEAT, ich udział w tym procesie jest niewielki i może odpowiadać jedynie za około 2,2% kwasów tłuszczowych obecnych w puli TAG. Jednak podobnie jak w przypadku LPAATów, ich udział na początkowych etapach rozwoju nasion *C. sativa* jest wyższy, wówczas enzymy te mogą przenosić nawet do 7% kwasów tłuszczowych do puli acylo-CoA, wykorzystywanych następnie do syntezy TAG. Uwzględniając również udział innych reakcji w suplementacji puli acylo-CoA i zawartość wszystkich acylolipidów, odpowiednio z puli PC, PE oraz PA może pochodzić około 59%, 3,6% oraz 5,3% kwasów tłuszczowych wykorzystywanych zarówno do syntezy puli TAG, jak i remodelowania innych lipidów (Rys. 30 oraz 29).

Wykonane obliczenia przedstawiają jedynie szacowaną, teoretyczną oraz maksymalną możliwość przenoszenia grup acylowych pomiędzy fosfolipidami, a pulą cytoplazmatycznego acylo-CoA.



Rys. 30. Zawartość wszystkich acylolipidów oraz triacylogliceroli (TAG) w rozwijających się nasionach *C. sativa* oraz potencjalna ilość kwasów tłuszczowych, która może być przeniesiona z puli odpowiednich fosfolipidów do puli acylo-CoA w wyniku aktywności enzymów LPLAT (acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfolipid) w reakcji „do tyłu” (ang. *backward*). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). KT – kwasy tłuszczowe, PA – kwas fosfatydowy, PC – fosfatydylocholina, PE – fosfatydyloetanolamina.



Rys. 31. Potencjalna ilość kwasów tłuszczowych, która może zostać przeniesiona z puli fosfatydylocholiny (a), fosfatydyloetanolaminy (b) lub kwasu fosfatydowego (c) do puli acylo-CoA, w wyniku aktywności typu „do tyłu” (ang. *backward*) katalizowanej odpowiednio przez LPCATy, LPEATy oraz LPAATy oraz sumarycznie przez te enzymy i inne reakcje. Badania przeprowadzono dla poszczególnych stadiów rozwojowych nasion *C. sativa*. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowych ($n \geq 3$).

4.3.9. Czas całkowitej wymiany kwasów tłuszczowych w puli fosfolipidów obecnych w nasionach *Camelina sativa*

Na podstawie wyznaczonej intensywności remodelowania puli różnych fosfolipidów obecnych w nasiona *C. sativa* możliwe również było obliczenie szacunkowego czasu niezbędnego do wymiany wszystkich kwasów tłuszczowych w tych lipidach. W tym celu do obliczeń wykorzystano ilość kwasów tłuszczowych obecnych w odpowiednich fosfolipidach w jednym nasieniu (Rys. 10), intensywność procesu remodelowania wyznaczoną w testach bez dodatku DTNB (Tabela 10 – dane oznaczone jako „-DTNB”) oraz ilość PC obecną w jednym nasionku niezbędną do określenia

całkowitej aktywności enzymów w całym nasionku. Następnie obliczenia wykonano według wzoru:

ilość PL w nasionku (pmol) / [intensywność procesu remodelowania dla danych PL w obecności różnych acylo-CoA w reakcjach bez dodatku DTNB (pmol [¹⁴C]PL/min/nmol mikrosomalnego PC) x ilość PC obecnej w jednym nasionie w danym stadium rozwoju (nmol)] x 2 (w celu określenia wymiany kwasów w obu pozycjach *sn-1* oraz *sn-2*) = **czas wymiany grup acylowych między pulą fosfolipidu, a pulą acylo-CoA w pozycji *sn-1* oraz *sn-2* (min).**

Należy jednak pamiętać, że wyznaczony czas wymiany grup acylowych w pozycji *sn-2* jest najprawdopodobniej krótszy, a w pozycji *sn-1* dłuższy niż obliczony średni czas całkowitej edycji grup acylowych, gdyż proces ten przebiega intensywniej w pozycji *sn-2* (Lager i in., 2013). Określony w ramach niniejszej pracy czas wymiany dostarcza jedynie przybliżonych informacji dotyczących czasu całkowitej wymiany kwasów tłuszczowych w badanych fosfolipidach nasion *C. sativa* przy założeniu, że aktywność enzymów biorących udział w remodelowaniu badanych fosfolipidów w warunkach *in vivo* jest zbliżona do tej uzyskiwanej w testach *in vitro*.

Otrzymane wyniki wykazały, że najefektywniej odbywała się przebudowa puli PA. Całkowita wymiana kwasów tłuszczowych w tym fosfolipidzie odpowiednio oscylowała od 3,8 do 13,8 godz. oraz 4,4 do 12,8 godz., gdy intensywność tej wymiany była określana na podstawie testów odpowiednio z dodatkiem 18:1-CoA i 18:2-CoA. Czas potrzebny do całkowitej wymiany kwasów tłuszczowych w PA wyliczony na podstawie testów z użyciem 18:3-CoA był dłuży i wynosił około 9,6-29,4 godz. Potencjalny czas potrzebny do całkowitej wymiana kwasów tłuszczowych w puli PA wyliczony na podstawie przeprowadzonych testów był najdłuższy dla nasion 31 DAF, a najkrótszy dla nasion w 24 DAF. Spośród testowanych fosfolipidów najdłuższy czas remodelowania odnotowano dla puli PE. Czas wymiany grup acylowych w tej puli wydłużał się wraz z rozwojem nasion. Wymiana ta w 17 DAF wyliczona na podstawie testów z użyciem odpowiednio 18:1-CoA, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA wynosiła 77,4 godz., 49,2 godz. oraz 111,2 godz., natomiast w 31 DAF wydłużyła się około 2-krotnie, a dla 18:3-CoA nawet około 3-krotnie. Dla puli PC najefektywniejszą wymianę kwasów tłuszczowych odnotowano w 17 DAF. Wyliczony na podstawie testów wykorzystujących do wymiany grup acylowych odpowiednio 18:1-CoA, 18:2-CoA i 18:3-CoA czas tej wymiany wynosił odpowiednio około 10,6 godz., 12,6 godz. i 18,8 godz. Czas wymiany

kwasów tłuszczowych w puli PC nasion z pozostałych dwóch stadiach rozwoju, był dłuższy, jednak różnice w czasie wymiany były mniejsze niż w przypadku dwóch pozostałych fosfolipidów. Maksymalnie czas całkowitej wymiany był dłuższy (w porównaniu do czasu wymiany wyliczonego dla nasion 17 DAF) o 77% w nasionach 31 DAF przy wykorzystywaniu 18:1-CoA do tej wymiany oraz o 22% i 27% w przypadku wymiany na 18:2-CoA i 18:3-CoA odpowiednio, w nasionach 24 DAF (Tabela 12).

Tabela 12. Szacowany czas całkowitej wymiany, w różnych etapach rozwoju nasion *C. sativa*. grup acylowych obecnych w puli fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy oraz kwasu fosfatydowego tych nasion na kwasy tłuszczowe znajdujące się w puli acylo-CoA.

Donor [acylo-CoA]	Stadium rozwojowe nasion	Czas wymiany grup acylowych z obu pozycji <i>sn</i> puli PC, PE oraz PA na grupy acylowe z puli acylo-CoA [godz.]		
		PC	PE	PA
[¹⁴ C]18:1-CoA	17 DAF	10,6	77,4	4,8
	24 DAF	16,4	120,4	3,8
	31 DAF	18,8	155,6	13,8
[¹⁴ C]18:2-CoA	17 DAF	12,6	49,2	7,0
	24 DAF	15,4	61,8	4,4
	31 DAF	13	102,4	12,8
[¹⁴ C]18:3-CoA	17 DAF	18,8	111,2	10,4
	24 DAF	24,0	157,8	9,6
	31 DAF	22,0	338,4	29,4

4.4. Wpływ warunków hodowli na właściwości biochemiczne LPLATów obecnych w liściach *Camelina sativa* oraz na intensywność procesu remodelowania fosfolipidów tych liści

Celem kolejnej części badań było określenie aktywności oraz specyficzności substratowej enzymów typu LPLAT występujących w tkankach wegetatywnych *C. sativa*. Szczególną uwagę skupiono na zbadaniu wpływu warunków hodowli (*in vivo* oraz *in vitro*) na aktywność i specyficzność substratową tych enzymów obecnych w liściach, ponieważ już w poprzedniej części badań (rozdział: 4.1.5, 4.1.6 oraz 4.1.7) dotyczącej składu acylolipidów, odnotowano znaczące różnice w ilości i składzie tych związków pomiędzy liśćmi hodowanymi w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Następnie, przeprowadzone zostały badania dotyczące procesu remodelowania fosfolipidów obecnych w liściach *C. sativa* z obu warunków hodowli.

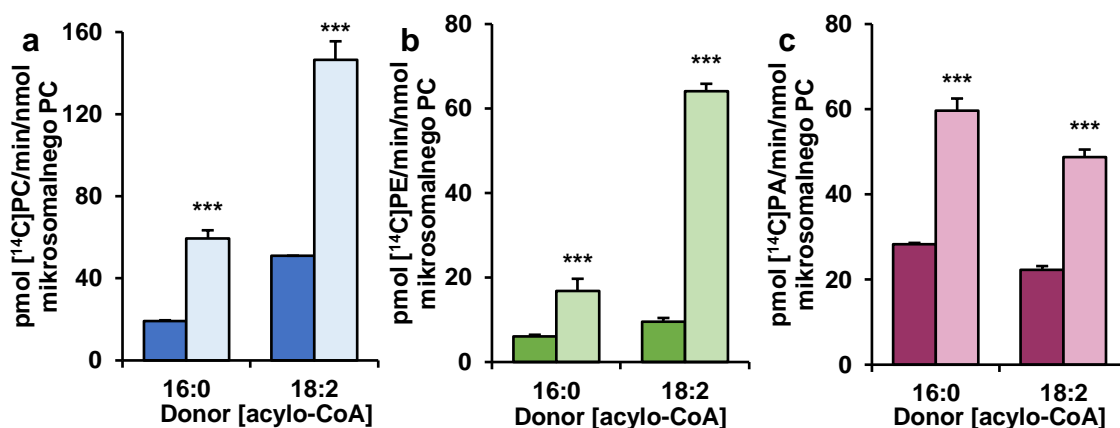
Fracje mikrosomalne stanowiące źródło badanych enzymów wyizolowano z liści hodowanych *in vivo* oraz *in vitro*, a testy enzymatyczne przeprowadzono stosując parametry wyznaczone uprzednio dla enzymów LPLAT, obecnych w nasionach *C. sativa*. Weryfikację zoptymalizowanych parametrów wykonano jedynie dla enzymów LPEAT obecnych w liściach roślin hodowanych w warunkach *in vivo*, które okazały się być tożsame z wynikami otrzymanymi dla tych enzymów obecnych w nasionach (Aneks Rys. A3).

4.4.1. Aktywność i specyficzność substratowa w reakcjach *forward* enzymów typu LPLAT obecnych w liściach *Camelina sativa* z hodowli w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*

Testy enzymatyczne przeprowadzono w celu określenia aktywności i specyficzności enzymów LPCAT, LPEAT oraz LPAAT. Badania te przeprowadzono w obecności odpowiedniego *sn*-1-18:1-LPL jako akceptora grup acylowych oraz dziesięciu różnych donorów grup acylowych. Do prezentacji wyników dotyczących aktywności testowanych enzymów wybrano wyniki testów wykorzystujące 16:0-CoA oraz 18:2-CoA jako donory grup acylowych (Rys. 32). Aktywność badanych enzymów względem pozostałych testowanych acylo-CoA przedstawiono w Aneksie na Rys. A4.

Aktywność wszystkich testowanych enzymów okazała się być znacząco wyższa w liściach z hodowli w warunkach *in vitro* niż z warunków *in vivo* (Rys. 3, Aneks Rys. A4). Enzymy LPCAT wykazywały około 3 oraz 2,8 razy większą aktywność, natomiast

enzymy LPEAT około 2,8 oraz 6,8 razy wyższą aktywność odpowiednio dla testów wykorzystujących 16:0-CoA oraz 18:2-CoA. Oba enzymy efektywniej prowadziły proces acylacji w obecności 18:2-CoA. Dla enzymów LPCAT było to około 2,5 i 2,6 razy wydajniej, podczas gdy dla LPEAT około 1,6 i 3,5 razy efektywniej odpowiednio dla enzymów obecnych w liściach z warunków *in vivo* oraz *in vitro* (Rys. 32ab). Enzymy LPAAT wykazywały tendencję odwrotną. Z obu testowanych donorów grup acylowych preferowały one o około 1,2 razy lepiej 16:0-CoA. Jednakże wciąż dla enzymów pochodzące z tkanek *in vitro* odnotowywano ponadto dwukrotnie wyższe aktywności (Rys. 32c).



Rys. 32. Aktywność enzymów typu LPCAT – acylotransferazy acylo-CoA: lizofosfatydylocholina (a), LPEAT – acylotransferazy acylo-CoA: lizofosfatydyloetanolamina (b) oraz LPAAT – acylotransferazy acylo-CoA:kwas lizofosfatydowy (c) obecnych we frakcjach mikrosomalnych liści *C. sativa* z hodowli *in vivo* oraz *in vitro*. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością testowanych LPLATów w stosunku do danego donora grup acylowych dla liści *in vivo* (słupki po lewej – ciemniejsze), a aktywnością dla liści *in vitro* (słupki po prawej – jaśniejsze), która została wyznaczona przy zastosowaniu testu t-Studenta, gdzie *** - $p \leq 0,001$.

W celu przeprowadzenia szczegółowej analizy specyficzności substratowej enzymów LPLAT, wyniki przeprowadzonych testów wykorzystujących kombinacje odpowiednich lizolipidów z 10-ciomą różnymi acylo-CoA przedstawiono jako procent aktywności w stosunku do 16:0-CoA (wartość referencyjna). Na poszczególnych wykresach przedstawiono w ten sposób wyniki otrzymane w testach wykorzystujących frakcje mikrosomalne z liści z warunków *in vivo* oraz *in vitro*.

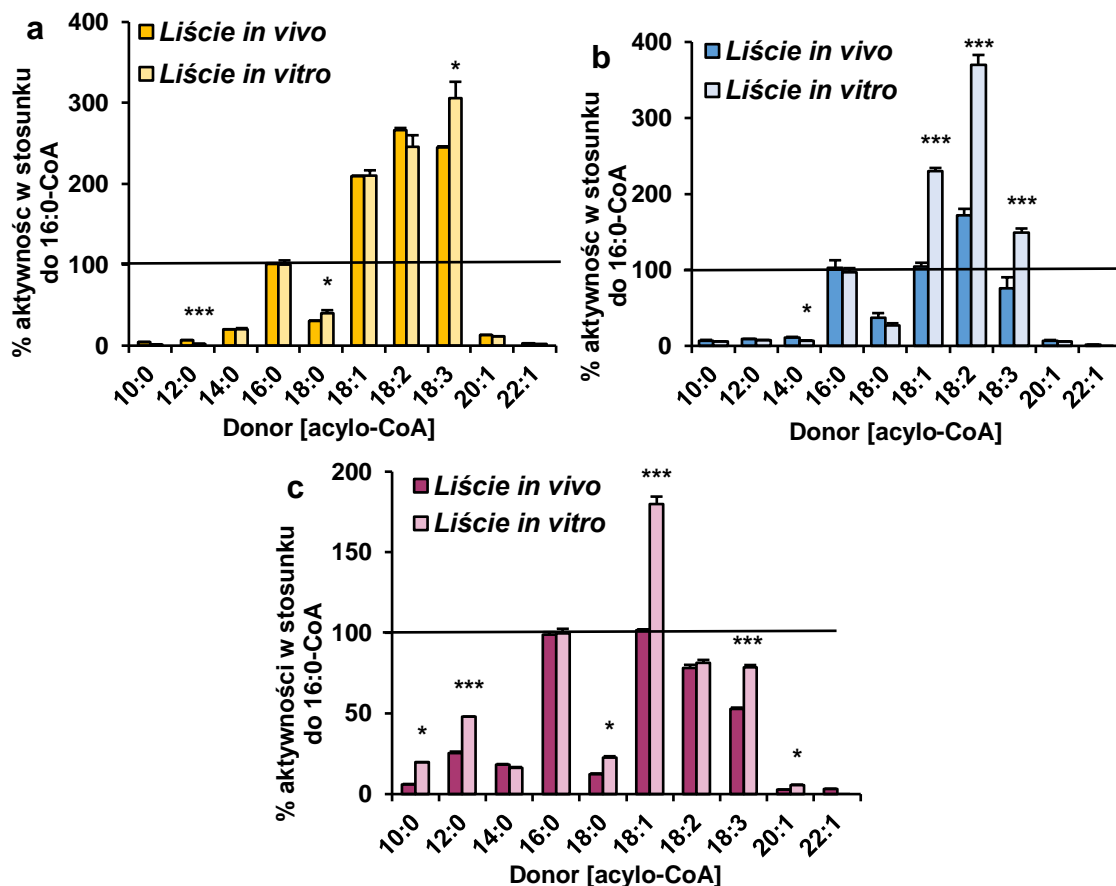
Enzymy LPCAT obecne we frakcjach mikrosomalnych liści *C. sativa* z hodowli zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* wykazywały najwyższą aktywność w stosunku do acylo-CoA z nienasyconymi 18-węglowymi kwasami tłuszczowymi. Aktywność ta była nawet o 2-3 razy większa niż w stosunku do 16:0-CoA. Warunki hodowli tylko nieznacznie wpływały na zmianę specyficzności substratowej enzymów LPCAT. Enzymy te obecne w tkankach *in vitro* wykazywały np. najwyższą aktywność w testach z 18:3-CoA, podczas gdy te z frakcji mikrosomalnej z liści z warunków *in vivo* najefektywniej wykorzystywały 18:2-CoA. Względem pozostałych testowanych donorów grup acylowych aktywność była dużo niższa; maksymalnie 20% aktywności w stosunku do 16:0-CoA. Brak było również wyraźnych różnic w wykorzystywaniu tych acylo-CoA przez LPCATy obecne w obu testowanych tkankach (Rys. 33a).

Warunki hodowli istotnie wpłynęły natomiast na specyficzność substratową enzymów LPEAT. Specyficzność tych enzymów, w porównaniu do specyficzności referencyjnej tj. w stosunku do 16:0-CoA, była w testach z frakcjami mikrosomalnymi z liści z hodowli *in vitro* o wiele wyższa do acylo-CoA z nienasyconymi 18-to węglowymi kwasami tłuszczowymi niż w testach z frakcjami mikrosomalnymi z liści z warunków *in vivo*. W przypadku 18:1-CoA było to odpowiednio (około) 100% i 200%, w testach z 18:2-CoA odpowiednio 170% i 370%, a w testach z 18:3-CoA odpowiednio 80% i 150% wartości referencyjnej. Dla pozostałych acylo-CoA odnotowano odwrotną tendencję; zaobserwowano spadek względnej aktywności enzymów LPEAT występujących w liściach hodowanych w warunkach *in vitro*, w stosunku do nasyconych acylo-CoA oraz bardzo długołańcuchowych acylo-CoA. Należy jednak zaznaczyć, że względna aktywność testowanych LPEATów w stosunku do tych acylo-CoA nie przekraczała 10% aktywności w stosunku do 16:0-CoA, oprócz 18:0-CoA dla którego wynosiła odpowiednio 37% i 27% wartości referencyjnej (Rys. 33b).

Względna aktywność enzymów LPAAT występujących we frakcji mikrosomalnej z liści z hodowli *in vitro* była wyższa w porównaniu do względnej aktywności tych enzymów z frakcji mikrosomalnych liści z hodowli *in vivo* dla większości z testowanych acylo-CoA. Najbardziej drastyczny wzrost preferencji wykryto w stosunku do 18:1-CoA, względem, którego aktywność wzrosła z około 100% do około 180% aktywności referencyjnej (tj. w stosunku do 16:0-CoA). Znaczące rozbieżności zaobserwowano również w preferencji tych enzymów do 10:0-CoA (wzrost o 14% wartości referencyjnej), 12:0-CoA (wzrost o 22%), 18:0-CoA (wzrost z 11%), 18:3-CoA (wzrost o 26%) oraz 20:1-CoA (wzrost o 3%). Względna aktywność wobec 14:0-CoA

oraz 18:2-CoA była taka sama w testach z frakcjami mikrosomalnymi z warunków *in vivo*, jak i *in vitro* (Rys. 33c).

Dla enzymów LPEAT oraz enzymów LPAAT występujących w liściach hodowanych w warunkach *in vitro* nie odnotowano aktywności w stosunku do 22:1-CoA. Wartości bezwzględne aktywności badanych enzymów względem wszystkich donorów grup acylowych przedstawiono w Aneksie na Rys. A4.



Rys. 33. Specyficzność substratowa enzymów typu LPCAT (a), LPEAT (b) oraz LPAAT (c) występujących w liściach *C. sativa* z hodowli w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Aktywność każdego z enzymów jest przedstawiona jako względna aktywność w stosunku do 16:0-CoA. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Asteryksy oznaczają istotność statystyczną pomiędzy aktywnością testowanych LPLAT w stosunku do danego donora grup acylowych dla liści *in vivo*, a aktywnością LPLAT obecnych w liściach *in vitro*, która została wyznaczona przy zastosowaniu testu t-Studenta, gdzie * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$.

4.4.2. Intensywność remodelowania fosfolipidów obecnych w liściach *Camelina sativa* hodowanej w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*

Do przeprowadzenia doświadczeń określających intensywność remodelowania fosfolipidów obecnych w liściach *C. sativa* wykorzystano zmodyfikowaną metodę opisaną poprzednio w punkcie 3.17.5. W tym celu wykorzystano alikwoty frakcji mikrosomalnych (zawierające 10 nmol mikrosomalnego PC) z liści otrzymanych z obu rodzajów hodowli. Test przeprowadzano w obecności trzech różnych znakowanych węglem [¹⁴C] donorów grup acylowych, które były głównie akceptowane przez te LPLATy obecne w tkankach roślinnych tj. przy obecności [¹⁴C]18:1-CoA, [¹⁴C]18:2-CoA i [¹⁴C]18:3-CoA. Ponadto do testów nie dodawano DTNB, aby określić efektywność całego procesu reedycji grup acylowych fosfolipidów, z uwzględnieniem reakcji *backward* LPLAT oraz innych reakcji. W celu zniwelowania błędów wynikających z syntezy *de novo* fosfolipidów z obecnej we frakcjach mikrosomalnych endogennej puli lizofosfolipidów, przeprowadzono dodatkowo 5 minutowe reakcje, podczas których pula ta zostaje wykorzystana, a otrzymane wartości odjęto od wartości otrzymanych dla reakcji 60-minutowych.

Otrzymane wyniki jasno wykazały, że remodelowanie zarówno puli PC, PE, jak i PA jest znacznie szybsze we frakcjach mikrosomalnych liści z warunków *in vitro* niż *in vivo*. Intensywność remodelowania puli PC była około 3-3,7 razy szybsza, puli PE około 3-4 razy szybsza, natomiast puli PA około 2 do 8,7 razy szybsza, w zależności od zastosowanego donora grup acylowych. Na efektywność remodelowania wpływał zatem nie tylko rodzaj hodowli, ale także rodzaj acylo-CoA, którego kwas tłuszczowy miał zostać włączony do puli PL. Największą intensywność tego procesu odnotowano w obecności 18:1-CoA i była ona około 2-2,8 razy większa niż w obecności dwóch pozostałych testowanych acylo-CoA. Kolejno, w procesie remodelowania PC oraz PE, najefektywniej wykorzystywany był 18:2-CoA, a następnie 18:3-CoA. Wyjątek od tej reguły odnotowano dla PA z frakcji mikrosomalnych liści z warunków *in vivo*, którego remodelowanie przebiegało najszybciej w testach z 18:3-CoA (Tabela 13).

Tabela 13. Całkowita intensywność remodelowania – inkorporacji grup [¹⁴C] acylowych z puli [¹⁴C] acylo-CoA do puli fosfatydylocholiny (PC), fosfatydyloetanoloaminy (PE) oraz kwasu fosfatydowego (PA) frakcji mikrosomalnych z liści *C. sativa* z hodowli w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym (n ≥ 3).

Rodzaj hodowli	Donor [acylo-CoA]	Intensywność remodelowania [pmol [¹⁴ C]PL/nmol mikrosomalnego PC/min]		
		PC	PE	PA
<i>In vivo</i>	[¹⁴ C]18:1-CoA	0.85 ±0.01	0.15 ±0.01	0.03 ±0.002
	[¹⁴ C]18:2-CoA	0.47 ±0.01	0.09 ±0.005	0.03 ±0.001
	[¹⁴ C]18:3-CoA	0.43 ±0.02	0.07 ±0.005	0.06 ±0.001
<i>In vitro</i>	[¹⁴ C]18:1-CoA	3.18 ±0.07	0.59 ±0.01	0.26 ±0.02
	[¹⁴ C]18:2-CoA	1.56 ±0.05	0.31 ±0.02	0.1 ±0.008
	[¹⁴ C]18:3-CoA	1.3 ±0.09	0.21 ±0.007	0.12 ±0.009

4.4.3. Czas całkowitej wymiany kwasów tłuszczowych w puli wybranych fosfolipidów liści *Camelina sativa* z hodowli w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*

Biorąc pod uwagę ilości poszczególnych fosfolipidów: PC, PE oraz PA obecnych w liściach *C. sativa* oraz intensywność remodelowania tych lipidów możliwe było określenie szacunkowego czasu całkowitej wymiany grup acylowych między nimi, a pulą cytoplazmatycznego acylo-CoA. Obliczenia wykonane zostały zgodnie ze wcześniej opisanym schematem w punkcie 4.3.9.

Wyniki przedstawione w Tabeli 14 wykazały, że czas remodelowania fosfolipidów obecnych w liściach z hodowli *in vitro* może być wyraźnie szybszy od tego procesu zachodzącego w liściach z hodowli *in vivo*. Najszybsza wymiana kwasów tłuszczowych wydaje się odbywać w puli PA. Na podstawie testów z frakcjami mikrosomalnymi z liści roślin hodowanymi w warunkach *in vitro* wykazano, że całkowita wymiana kwasów tłuszczowych w puli PA tych liści potencjalnie mogłaby dokonać się w około 2,3 godz. (w obecności 18:1-CoA) oraz w około 2,8 godz. (w obecności 18:2-

CoA oraz 18:3-CoA). Kwasy tłuszczowe w puli PA, obecnej w liściach *in vivo*, potencjalnie mogłyby być wymieniane odpowiednio 24, 19 i 9,5 razy dłużej przy wykorzystaniu do tej wymiany odpowiednio 18:1-CoA, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA. Najdłuższy proces całkowitej edycji grup acylowych wydaje się dotyczyć puli PE obecnej w liściach *C. sativa*. Na podstawie wyników testów, wykorzystujących do wymiany 18:1-CoA, wykazano, że w liściach z warunków *in vivo* proces ten trwałby 96,9 godz., a w liściach z warunków *in vitro* 17,2 godz., zaś przy wykorzystaniu 18:2-CoA odpowiednio 160,4 godz. oraz 32,4 godz., a w obecności 18:3-CoA odpowiednio 218,6 godz. oraz 98,2 godz. Pula PC testowanych frakcji mikrosomalnych ulegała procesowi remodelowania najefektywniej w obecności 18:1-CoA. Wyliczony na podstawie tych testów proces całkowitej wymiany kwasów tłuszczowych w PC liści z warunków *in vivo* oraz PC liści z warunków *in vitro* oscylowałby w granicach 39,2 godz. oraz 10,5 godz., odpowiednio przy wykorzystaniu pozostałych donorów grup acylowych czas całkowitej wymiany wydłużył się o około 1,8 -2,5 razy (Tabela 14).

Tabela 14. Szacowany czas całkowitej wymiany grup acylowych obecnych w puli fosfatydylocholiny, fosfatydyloetanolaminy oraz kwasu fosfatydowego z kwasami tłuszczowymi znajdującymi się w puli acylo-CoA w liściach *C. sativa* z hodowli w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*.

Rodzaj hodowli	Donor [acylo-CoA]	Czas wymiany grup acylowych z obu pozycji sn puli PC, PE oraz PA na grupy acylowe z puli acylo-CoA [godz.]		
		PC	PE	PA
<i>In vivo</i>	[¹⁴ C]18:1-CoA	39,2	96,9	56,1
	[¹⁴ C]18:2-CoA	70,6	160,4	53
	[¹⁴ C]18:3-CoA	76,7	218,6	26,5
<i>In vitro</i>	[¹⁴ C]18:1-CoA	10,5	17,2	2,3
	[¹⁴ C]18:2-CoA	21,4	32,4	2,8
	[¹⁴ C]18:3-CoA	26,2	98,2	2,8

4.5. Charakterystyka enzymów LPEAT obecnych w tkankach *Camelina sativa*

Jak wykazano w powyżej omawianych badaniach, na aktywność enzymów LPLAT ma wpływ zarówno stadium rozwojowe, jak w przypadku nasion, czy wpływ warunków hodowli, jak w przypadku tych enzymów obecnych w liściach *C. sativa*.

Fosfolipidy, będące głównym produktem reakcji *forward* enzymów LPLAT, szczególnie fosfatydylocholina oraz fosfatydyloetanolamina oraz ich skład kwasów tłuszczowych wpływają na płynność membran biologicznych, stabilizując ich strukturę w różnych warunkach temperaturowych. Dotychczas rola enzymów LPLAT w tym procesie nie została poznana, w związku z czym dalsza część badań została poświęcona zweryfikowaniu wpływu temperatury na aktywność i specyficzność substratową enzymów LPLAT syntezujących te fosfolipidy.

Na podstawie otrzymanych wyników podjęto kolejne etapy badań mające na celu zbadanie ekspresji genów kodujących te enzymy, sklonowanie tych genów oraz poznanie zarówno ich struktury aminokwasowej, jak i pochodzenia ewolucyjnego.

4.5.1. Zależność aktywności oraz specyficzności substratowej enzymów LPCAT oraz LPEAT obecnych w tkankach wegetatywnych oraz generatywnych *Camelina sativa* od temperatury

Do zweryfikowania wpływu temperatury na aktywność wybranych enzymów z grupy LPLAT wykorzystano frakcje mikrosomalne, będące źródłem testowanych enzymów, z tkanek wegetatywnych: liści i korzeni z hodowli *in vitro*, liści z hodowli *in vivo* oraz nasion otrzymanych z drugiego stadium rozwojowego. Testy te przeprowadzono w obecności odpowiednich *sn-1-18:1-LPL* oraz pięciu wybranych donorów grup acylowych, które występują w tkankach *C. sativa*, a kwasy tłuszczowe występujące w tych acylo-CoA są rozpatrywane jako te które głównie wpływają na regulację płynności membran biologicznych tj. kwasy nienasycone (18:1, 18:2, 18:3) oraz dwa z kwasów nasyconych (16:0 oraz 18:0). Badania prowadzono w czterech temperaturach: 10, 20, 30 oraz 40 °C.

Wstępnie przeprowadzone badania jednoznacznie wykazały, że specyficzność substratowa enzymów LPCAT w stosunku do acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi nie zmieniała się znacząco pod wpływem temperatury bez względu na to czy ich źródłem były tkanki nadziemne, czy podziemne. Wraz ze wzrostem temperatury reakcji wykazywały one podobny wzrost aktywność w stosunku do wszystkich badanych

acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. W testach z tymi acylo-CoA, w zakresie temperatur pomiędzy 10, a 40 °C, dla enzymów LPCAT obecnych w liściach z hodowli *in vivo* odnotowano wzrost aktywności o około 3,3-3,9 razy, a dla LPCATów z frakcji mikrosomalnych korzeni z warunków *in vitro* wzrost aktywności o około 2,5-3,1 razy. Specyficzność badanych LPCATów względem nasyconych acylo-CoA ulegała także pewnym zmianom w zakresie badanych temperatur. Względna aktywność tych enzymów zarówno w stosunku do 16:0-CoA, jak i 18:0-CoA była wyższa w niższych temperaturach. Wraz ze wzrostem temperatury reakcji ich aktywność rosła szybciej w stosunku do acylo-CoA z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi niż do tych z nasyconymi. W przypadku 16:0-CoA tendencje te odnotowywano dopiero w temperaturach wyższych niż 20 °C (Rys. 34).

Całkowicie odmienny wzór wpływu temperatury na specyficzność substratową odnotowano dla enzymów LPEAT obecnych w tkankach *C. sativa*. Preferencje tych enzymów w stosunku do testowanych acylo-CoA zależały istotnie od temperatury. Ponadto zaobserwowane tendencje były powtarzalne we wszystkich testowanych tkankach, zarówno wegetatywnych, jak i generatywnych.

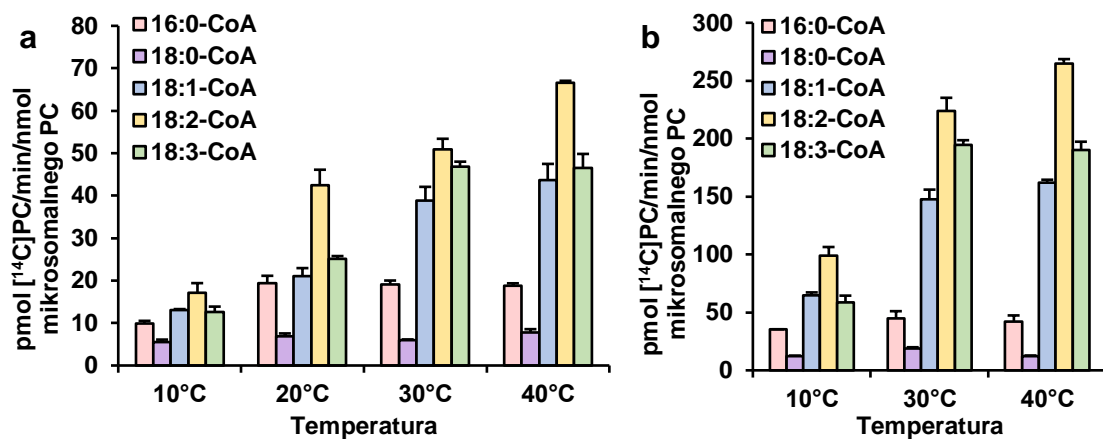
Najwyższą aktywność enzymów LPEAT, również niezależną od tkanki stanowiącej ich źródło, odnotowano względem 18:2-CoA. Maksimum tej aktywności w testach z mikrosomami z tkanek wegetatywnych przypadało jednak na 30 °C, a w testach z mikrosomami z nasion na 20 °C (Rys. 35). Z drugiej strony, enzymy te wykazywały najmniejszą specyficzność w stosunku do 18:0-CoA ze wszystkich testowanych acylo-CoA. Aktywność badanych LPEATów w stosunku do tego acylo-CoA była stosunkowo niska i wynosiła najwyżej 11% maksymalnej aktywności odnotowanej dla 18:2-CoA w testach z trzema z badanych frakcji mikrosomalnych, a w testach z frakcją mikrosomalną z liści z warunków *in vivo* osiągała wyższe wartości – nawet do 23% aktywności w stosunku do 18:2-CoA. Zmiany temperatury nie wpływały znacząco na względną (mierzoną jako procent aktywności referencyjnej tj. w stosunku do 18:2-CoA) intensywność wykorzystania tego donora grup acylowych (Rys. 35).

Oprócz enzymów LPEAT obecnych w liściach z hodowli *in vivo*, enzymy te obecne w pozostałych trzech frakcjach mikrosomalnych nie wykazywały znaczących zmian w preferencjach w stosunku do drugiego acylo-CoA z nasyconym kwasem tłuszczowym tj. w stosunku do 16:0-CoA. Ich względna aktywność (mierzona jako % aktywności referencyjnej) była zbliżona we wszystkich testowanych temperaturach (Rys. 35). Jednakże w przypadku LPEATów frakcji mikrosomalnej liści z warunków *in*

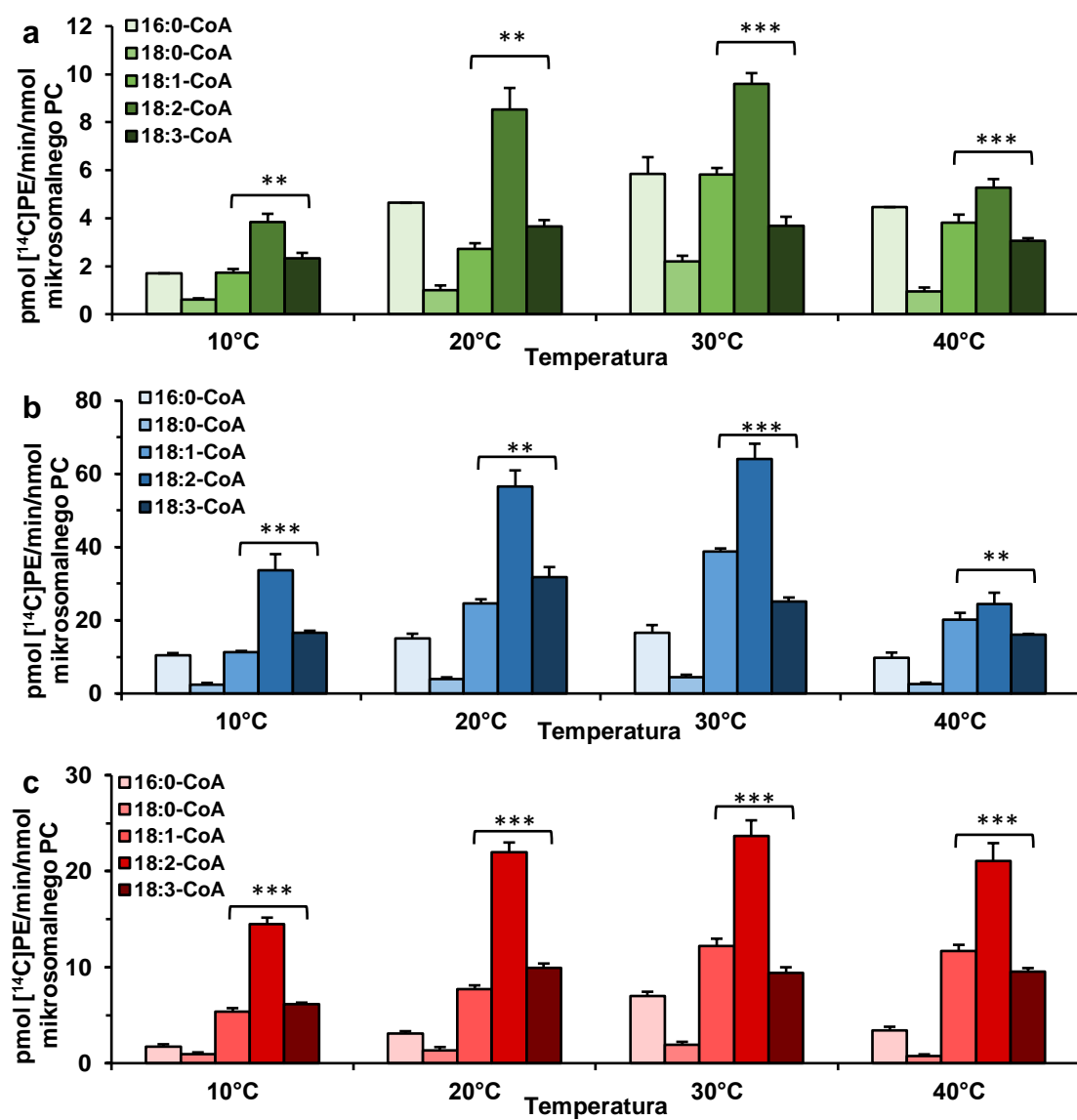
vivo względna aktywność LPEATów w stosunku do 16:0-CoA wzrastała mocno w wyższych z testowanych temperatur. W temperaturze 40 °C aktywność ta wynosiła 85% aktywności w stosunku do 18:2-CoA, podczas gdy w temperaturze 10 °C było to poniżej 50% tej aktywności (Rys. 35a).

Zarówno w stosunku do 18:1-CoA, jak i do 18:3-CoA odnotowano wysoką aktywność LPEATów we wszystkich badanych tkankach. Preferencje tych enzymów względem obu wskazanych donorów grup acylowych były jednak mocno uzależnione od temperatury. Efekt ten dotyczył przede wszystkim enzymów LPEAT występujących w tkankach wegetatywnych. W temperaturze 10 oraz 20 °C enzymy te preferowały wykorzystanie 18:3-CoA odpowiednio w liściach z hodowli *in vivo* o około 35 i 33% efektywnie niż 18:1-CoA, w liściach z warunków *in vitro* o około 46 i 29%, a w korzeniach *in vitro* o około 13 oraz 28%. Odwrotne tendencje odnotowano w wyższych temperaturach, 30 oraz 40 °C, gdzie bardziej faworyzowany był 18:1-CoA. Odpowiednio w 30 °C aktywność w stosunku do tego donora była około 30-58% wyższa, natomiast w 40 °C około 20-30% wyższa niż aktywność w stosunku do 18:3-CoA (Rys. 35a-c). Podobne zmiany w preferencji kwasu oleinowego oraz linolenowego odnotowano dla enzymów LPEAT obecnych w nasionach *C. sativa*. Przy czym tendencje te odnotowano tylko dla temperatury 30 oraz 40 °C, gdzie odpowiednio odnotowano o około 1,2 i 1,3 razy efektywniejsze wykorzystanie 18:3-CoA niż 18:1-CoA (Rys. 35d).

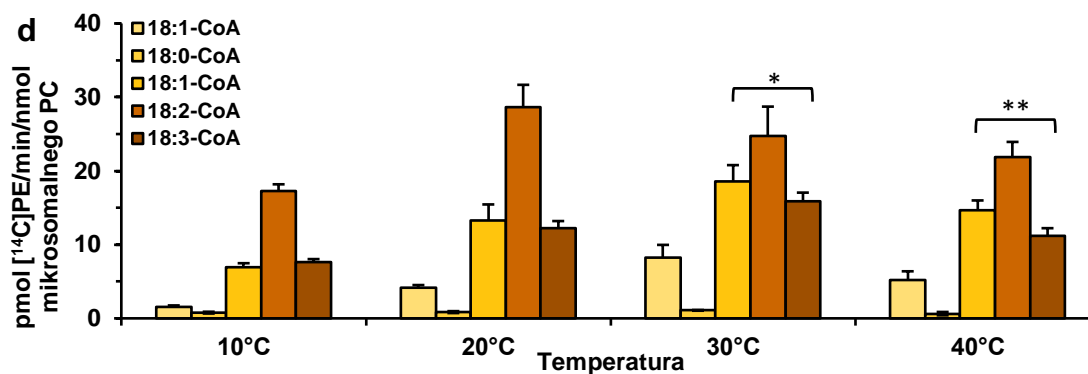
Spośród wszystkich badanych tkanek *C. sativa* najniższą aktywność enzymów LPEAT odnotowano dla frakcji mikrosomalnych z liści roślin hodowanych *in vivo*. Najwyższą zaś aktywność LPEATów zaobserwowano we frakcjach mikrosomalnych z liści z warunków *in vitro*. Aktywność LPEAT w liściach z warunków *in vitro* w porównaniu do tej aktywności w liściach z warunków *in vivo* była średnio nawet 8,8 razy większa wówczas, gdy testy przeprowadzano w 10 °C, około 6,6 razy większa w 20 i 30 °C i około 4,7 razy wyższa w 40 °C (średnia różnica aktywności w danej temperaturze w stosunku do wszystkich testowanych acylo-CoA); (Rys. 35a-b). Dla enzymów LPEAT obecnych w korzeniach *in vitro* oraz nasionach zebranych w 24-26 DAF odnotowano stosunkowo porównywalne aktywności. Również dla tych enzymów nie zaobserwowano znaczącego wpływu wysokiej temperatury (40 °C) na spadek ich aktywności, tak jak w przypadku enzymów LPEAT obecnych w liściach *in vitro*, gdzie skrajnie, wysoka testowana temperatura prowadziła do spadku o nawet 60% aktywności w stosunku do 18-węglowych nienasyconych acylo-CoA (Rys. 35b-d).



Rys. 34. Wpływ temperatury na specyficzność substratową enzymów typu LPCAT występujących we frakcjach mikrosomalnych z: liści *C. sativa* hodowanej w warunkach *in vivo* (a) oraz z korzeni *C. sativa* z warunków *in vitro* (b). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).



verte



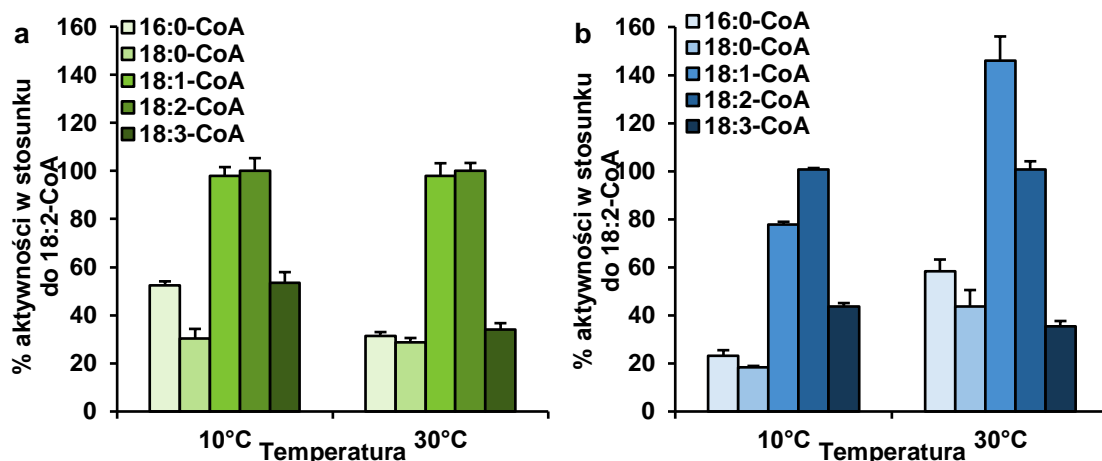
Rys. 35. Wpływ temperatury na aktywność enzymów LPEAT obecnych we frakcjach mikrosomalnych różnych tkanek *C. satvia*. **a** – liście *in vivo*, **b** – liście *in vitro*, **c** – korzenie *in vitro*, **d** – nasiona. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Asteryksy oznaczają istotność statystyczną w odnotowanej aktywności pomiędzy testami enzymatycznymi z dodatkiem 18:1-CoA, a z dodatkiem 18:3-CoA. Istotność ta została wyznaczona przy zastosowaniu testu t-Studenta, gdzie * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$.

W celu zweryfikowania odnotowanych tendencji do zmian, pod wpływem temperatury, specyficzności substratowej enzymów LPEAT w tkankach wegetatywnych, głównie w liściach, przeprowadzono testy selektywności z wykorzystaniem jako źródło enzymów, frakcji mikrosomalnych z tych tkanek z roślin hodowanych w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Testy przeprowadzono w 10 oraz 30 °C, czyli temperaturach, w których odnotowano największe rozbieżności w preferencjach LPEAT. Eksperymenty dla obu z frakcji mikrosomalnych przeprowadzono w obecności BSA (imitującego naturalnie występujące białko wiążącego acylo-CoA). Wyniki zostały przedstawione jako % aktywności odnotowanej w stosunku do najlepiej wykorzystywanego acylo-CoA, czyli 18:2-CoA.

Enzymy LPEAT z frakcji mikrosomalnych liści z warunków *in vivo* wykazały niezależnie od temperatury niemal takie same preferencję w stosunku do 18:1-CoA oraz 18:2-CoA. Efektywność w wykorzystaniu 16:0-CoA, 18:0-CoA oraz 18:3-CoA w temperaturze 30 °C była do siebie bardzo zbliżona i wynosiła około 30% aktywności w stosunku do 18:2-CoA (traktowanej jako aktywność referencyjna). W temperaturze 10 °C, względna aktywność (% aktywności referencyjnej) w stosunku do 18:0-CoA była bardzo podobna jak w testach przeprowadzonych w 30 °C, podczas gdy wykorzystanie 16:0-CoA oraz 18:3-CoA wynosiło aż około 52% aktywności referencyjnej (Rys. 36a). Tendencje w zmianach aktywności względnej w stosunku do 18:3-CoA pozostały więc takie same jak obserwowane w testach wykorzystujących pojedyncze acylo-CoA.

Nie odnotowano jednak wpływu temperatury na aktywność względną tych enzymów w stosunku do 18:1-CoA.

W przypadku enzymów LPEAT obecnych we frakcjach mikrosomalnych z liści *C. sativa* hodowanej w warunkach *in vitro* odnotowano nieco podobny wpływ temperatury na ich aktywność względną w stosunku do 18:1-CoA i 18:3-CoA jak w testach z pojedynczymi substratami. Wzrost temperatury reakcji powodował znaczący wzrost tej aktywności w stosunku do 18:1-CoA (w 30 °C aktywność w stosunku do tego acylo-CoA była 1,5 razy wyższa niż w stosunku do 18:2-CoA) i pewien spadek tej aktywności w stosunku do 18:3-CoA. Wzrost temperatury reakcji wywoływał również wzrost aktywności względnej omawianych enzymów LPEAT w stosunku do 16:0-CoA i 18:0-CoA (Rys. 36b).



Rys. 36. Aktywność acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydyloetanoloamina (LPEAT) obecnych we frakcjach mikrosomalnej z liści *C. sativa* hodowanej w warunkach *in vivo* (a) oraz *in vitro* (b) względem pięciu różnym donorom grup acylowych dodawanych do mieszaniny reakcyjnej w równo molowym stężeniu wraz z BSA. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

4.5.2. Wpływ temperatury na intensywność procesu remodelowania puli fosfatydyloetanoloaminy, obecnej w liściach *Camelina sativa* hodowanej w warunkach *in vivo*

Kolejnym etapem badań było zweryfikowanie w jaki sposób temperatura wpływa na proces remodelowania puli fosfatydyloetanoloaminy, który jest katalizowany zarówno przez aktywność *backward* enzymów LPEAT, jak i wspólnie z aktywnością fosfolipazy A_2 i enzymów PDAT. Testy te przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym

w rozdziale 3.17.5, natomiast wyniki zostały obliczone zgodnie ze wzorem opisanym w rozdziale 4.3.7.

Badania dotyczące wpływu temperatury na proces edycji grup acylowych w puli PE przeprowadzono wyłącznie na frakcjach mikrosomalnych liści hodowanych w warunkach *in vivo*, ponieważ są to warunki najbardziej odzwierciedlające naturalne warunki hodowli roślin, a to właśnie w tych warunkach rośliny są szczególnie narażone na nagłe zmiany temperatury. Ponadto dla enzymów typu LPEAT obecnych w tych tkankach odnotowano największe zmiany w specyficzności substratowej względem testowanych donorów grup acylowych.

Wykonane badania wyraźnie wykazały, że proces remodelowania jest znacznie intensywniejszy w temperaturze 40 °C, niż w temperaturze 10 °C. Zmiany w intensywności remodelowania odnotowano dla reakcji wykorzystujących trzy z czterech testowanych acylo-CoA; dla 18:1-CoA, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA. Nie odnotowano natomiast żadnej aktywności bądź była ona poniżej poziomu detekcji, dla tych reakcji w testach z udziałem 16:0-CoA. Odpowiednio dla reakcji z wykorzystaniem 18:1-CoA odnotowano 3,7-krotny, dla reakcji wykorzystujących 18:2-CoA 4,6-krotny, a dla tych z 18:3-CoA 3,3-krotny wzrost całkowitej intensywności remodelowania (reakcje bez dodatku DTNB). Podobne tendencje odnotowano dla procesu remodelowania w wyniku aktywności wyłącznie fosfolipaz oraz enzymów PDAT („inne” reakcje) oraz dla procesów katalizowanych jedynie przez aktywność *backward* enzymów LPEAT. Udział tych ostatnich reakcji był jednak dużo mniejszy niż udział tzw. „innych” reakcji w procesie remodelowania puli PE. Wahał się on od 0% (reakcje z udziałem 18:3-CoA w 40 °C) do około 19% - reakcje z udziałem 18:1-CoA w 10 °C (Tabela 15).

Biorąc pod uwagę całkowitą intensywność procesu remodelowania puli PE (reakcję bez dodatku DTNB) oraz zawartość tego fosfolipidu w liściach *C. sativa* hodowanej w warunkach *in vivo* możliwe było określenie szacunkowego czasu całkowitej wymiany kwasów tłuszczowych występujących w tej puli PE, który został wyliczony zgodnie ze wzorem omówionym w rozdziale 4.3.9. Otrzymane wyniki wykazały, że w temperaturze 10 °C, wymiana trwałaby od około 7,2 do 13,8 dni, a w temperaturze 40 °C od około 1,8 do 5,1 dni. Czas tej wymiany i w jednej i drugiej z testowanych temperatur zależał od wykorzystywanego w testach donora grup acylowych i był najwolniejszy w przypadku obecności 18:3-CoA (Tabela 15).

Tabela 15. Wpływ temperatury na efektywność włączania [¹⁴C]grup acylowych z [¹⁴C]acylo-CoA do puli fosfatydyloetanolaminy obecnej we frakcji mikrosomalnej z liści *C. sativa* (hodowanej w warunkach *in vivo*) w wyniku aktywność typu „do przodu – *forward*” przeprowadzanej przez acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina (LPEAT) połączonej z aktywnością typu „do tyłu – *backward*” przeprowadzanej przez te enzymy oraz z aktywnością innych enzymów uczestniczących w wytwarzaniu LPE. Reakcje zostały przeprowadzone bez dodatku do reakcji DTNB (LPE wytwarzana w reakcjach „do tyłu – *backward*” przeprowadzanych przez LPEATy oraz przez reakcje innego typu) oraz z dodatkiem DTNB (lizofosfolipidy wytwarzane jedynie przez „inne” reakcje). Delta reprezentuje efektywność wymiany grup acylowych w wyniku aktywności typu „do tyłu” przez badane acylotransferazy (od wartości uzyskanych z testów bez dodatku DTNB odjęto wartości uzyskane z testów z DTNB). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowych ($n \geq 3$).

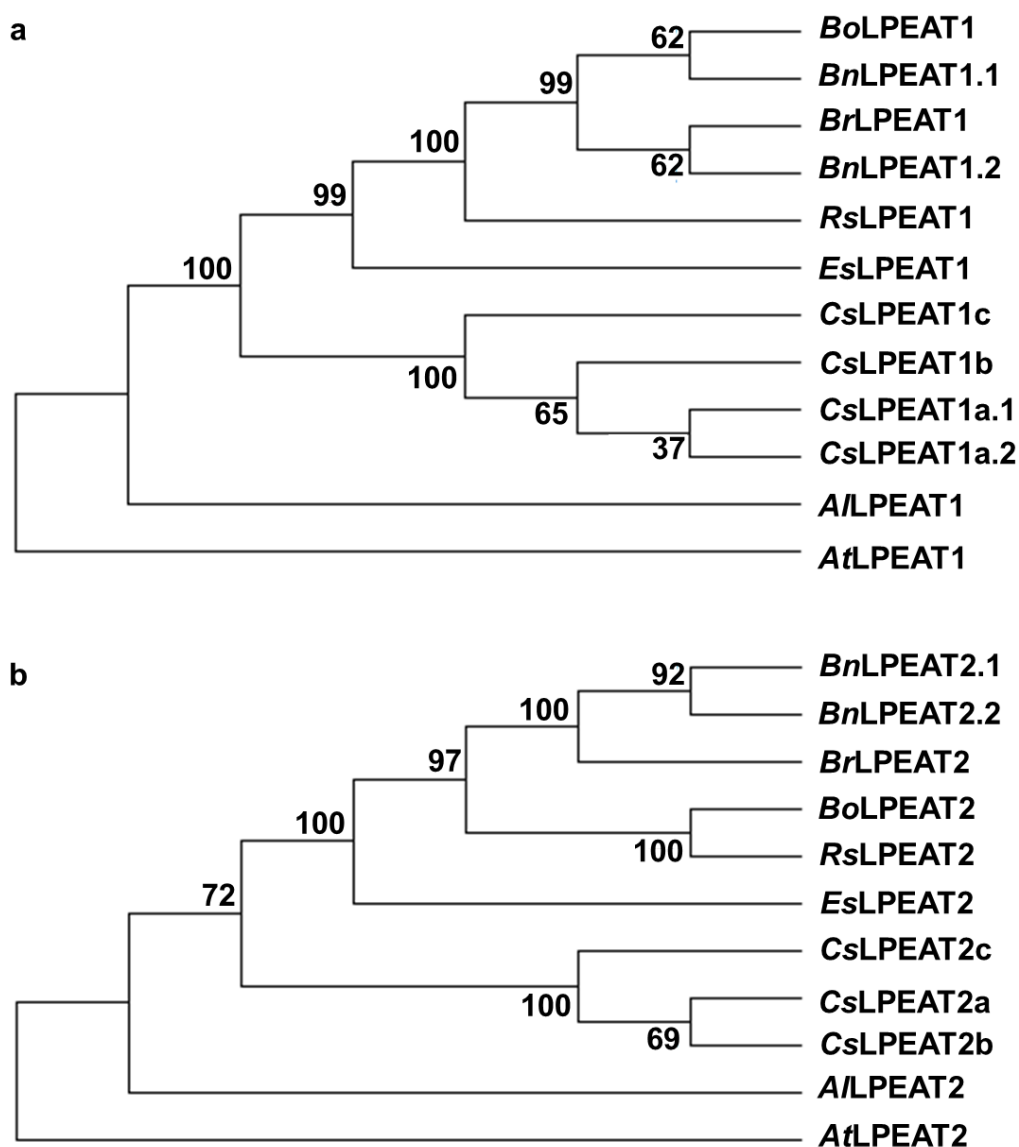
Temperatura	Donor [acylo-CoA]	pmol [¹⁴ C]PE/nmol mikrosomalnego PC/min			Czas wymiany grup acylowych z obu pozycji <i>sn</i> puli PE na grupy acylowe z puli acylo-CoA (dni [godz.])
		-DTNB	+DTNB	Δ	
10 °C	[¹⁴ C]18:1-CoA	0,08 ± 0,003	0,07 ± 0,001	0,015	7,2 [173,2 godz.]
	[¹⁴ C]18:2-CoA	0,07 ± 0,001	0,06 ± 0,002	0,01	8,9 [215,5 godz.]
	[¹⁴ C]18:3-CoA	0,04 ± 0,003	0,04 ± 0,002	0,005	13,8 [331,7 godz.]
40 °C	[¹⁴ C]18:1-CoA	0,3 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,048	2,0 [48 godz.]
	[¹⁴ C]18:2-CoA	0,32 ± 0,01	0,28 ± 0,003	0,044	1,8 [43,7 godz.]
	[¹⁴ C]18:3-CoA	0,13 ± 0,001	0,13 ± 0,001	0	5,1 [112,9 godz.]

4.5.3. Analiza filogenetyczna wariantów izoformy CsLPEAT1 oraz CsLPEAT2

Dalsza część prowadzonych badań skupiała się na sklonowaniu oraz analizie sekwencji genomowych oraz aminokwasowych enzymów LPEAT obecnych w tkankach *C. sativa*.

C. sativa jest rośliną posiadającą heksaploidalny genom w skład, którego wchodzi trzy subgenomy. Dwa z nich pochodzą od auto-allotetraploidalnej *Camalina neglecta*, trzeci zaś został dołączony w wyniku hybrydyzacji z *Camelina hispida* (dokładny opis genomu *C. sativa* został już omówiony rozdziale 1.6.6). W związku z tym każda z izoform LPEAT – LPEAT1 oraz LPEAT2 będzie posiadała trzy różne warianty. W przeprowadzonych testach enzymatycznych odnotowano różne wzory aktywności enzymów CsLPEAT zarówno ze względu na ich miejsce występowania, warunki hodowli roślin oraz temperaturę. Pozwoliło to na wysnucie przypuszczenia, że testowane frakcje mikrosomalne zawierały różne izoformy badanych LPEATów i potencjalnie warianty tych izoform. Z sukcesem udało się zamplifikować sekwencje kodujące kolejno CsLPEAT1a.1 oraz CsLPEAT1a.2, będące wariantami splicingowymi CsLPEAT1a, a także CsLPEAT2a, CsLPEAT2b oraz CsLPEAT2c. Do konstrukcji drzewa filogenetycznego obrazującego pochodzenie ewolucyjne poszczególnych wariantów obu izoform *C. sativa* LPEAT użyto dodatkowo, pochodzące z baz danych, sekwencje referencyjne dwóch wariantów, których nie udało się zamplifikować: CsLPEAT1b oraz CsLPEAT1c oraz sekwencje aminokwasowe LPEAT pochodzące z organizmów innych przedstawicieli rodziny *Brassicaceae*. Wykonana analiza filogenetyczna wykazała, że wariant CsLPEAT1a oraz CsLPEAT1b, a także CsLPEAT2a oraz CsLPEAT2b są ze sobą bliżej spokrewnione niż z wariantami CsLPEAT1c oraz CsLPEAT2c. Homologia sekwencji aminokwasowych tych ostatnich dwóch wariantów była wysoka i różniła się znacznie od sekwencji pozostałych analizowanych wariantów, na podstawie czego wysunięto wniosek, że warianty CsLPEAT1c oraz CsLPEAT2c pochodzą z genomu *C. hispida*, natomiast pozostałe analizowane warianty pochodzą z *C. neglecta*.

Ponadto na podstawie wygenerowanych drzew filogenetycznych można zauważyć, że LPEATy *C. sativa* są mniej spokrewnione z LPEATami *Arabidopsis* niż z LPEATami pozostałych przedstawicieli rodziny *Brassicaceae* (Rys. 37).



Rys. 37. Analiza filogenetyczna sekwencji aminokwasowych kodujących izoformy acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina (LPEAT) wstępujących u różnych przedstawicieli rodziny *Brassicaceae*. Powyżej odpowiednio przedstawiono drzewa filogenetyczne dla wariantów izoformy *CsLPEAT1* i izoform LPEAT1 z innych organizmów roślinnych (**a**) oraz dla wariantów izoformy *CsLPEAT2* i izoform LPEAT2 z innych roślin (**b**). Oba drzewa zostały ukorzenione przy wykorzystaniu sekwencji ortologicznych LPEAT1 oraz LPEAT2 występujących w *A. thaliana* (*AtLPEAT1* oraz *AtLPEAT2*). Wszystkie sekwencje wykorzystane do analizy oraz ich numery referencyjne zostały zamieszczone w Tabeli 5.

4.5.4. Uliniowanie sekwencji aminokwasowych poszczególnych wariantów izofromy CsLPEAT1 oraz CsLPEAT2

Kolejnym etapem badań było szczegółowe porównanie sekwencji aminokwasowych enzymów LPEAT, które udało się amplifikować na bazie materiału genetycznego wyizolowanego z różnych tkanek *C. sativa*.

Dla sekwencji aminokwasowych izoform CsLPEAT1: CsLPEAT1a.1 i CsLPEAT1a.2 oraz izoform CsLPEAT2: CsLPEAT2a, CsLPEAT2b i CsLPEAT2c określono procentowe podobieństwo (Tabela 16 oraz 17). Dodatkowo przy pomocy programu MEGA X dopasowano do siebie badane sekwencje z uwzględnieniem sekwencji referencyjnych kodujących odpowiednio LPEAT1 lub LPEAT2 z *A. thaliana* oraz sekwencji kodujących dwa niesklonowane warianty CsLPEAT1: CsLPEAT1b oraz CsLPEAT1c. Weryfikacja obecności domen konserwatywnych została przeprowadzona przy wykorzystaniu wyszukiwarki tych struktur udostępnionej na witrynie internetowej National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>; Marchler-Bauer i in., 2015).

Analiza skupiająca się na dwóch sklonowanych wariantach splicingowych CsLPEAT1a wykazała, że ich sekwencje aminokwasowe są do siebie podobne w 99,24% (Tabela 16). Ich sekwencje białkowe różniły się jedynie trzema aminokwasami (oznaczone jako czerwone asterysky na Rys. 38). Jedna ze zmian znajdowała się w pozycji 206, w obrębie miejsca aktywnego odpowiedzialnego za wiązanie lizofosfolipidu (ang. LPL-binding domain) i dotyczyła wymiany niepolarniej, aromatycznej fenyloalaniny na polarną cysteinę. Dwie pozostałe modyfikacje wiązały się z wymianą lizyny na kwas glutaminowy (w pozycji 16) oraz glicyny na alaninę (w pozycji 111).

Najmniejsze różnice w sekwencji białkowej odnotowano pomiędzy CsLPEAT2a oraz CsLPEAT2b, dla których podobieństwo wynosiło aż 98,17%, podczas gdy obie te sekwencje były podobne do CsLPEAT2c w 97,61%. Zaobserwowane wyniki korelują z pokrewieństwem tych sekwencji wykrytym na podstawie analizy filogenetycznej (Rys. 37). Na podstawie dopasowania sekwencji aminokwasowych tych enzymów, a następnie wykorzystaniu algorytmów wyszukujących domeny konserwatywne wykryto, podobnie jak w przypadku CsLPEAT1, domeny odpowiedzialne za miejsce aktywne wiązania LPL. Dodatkowo w obrębie tych sekwencji odnotowano występowanie domen wiążących wapń (ang. Ca²⁺-binding domain), charakterystycznych dla białek uczestniczących w szlakach sygnałowych zależnych od wapnia. Jednak poprzednio przeprowadzone

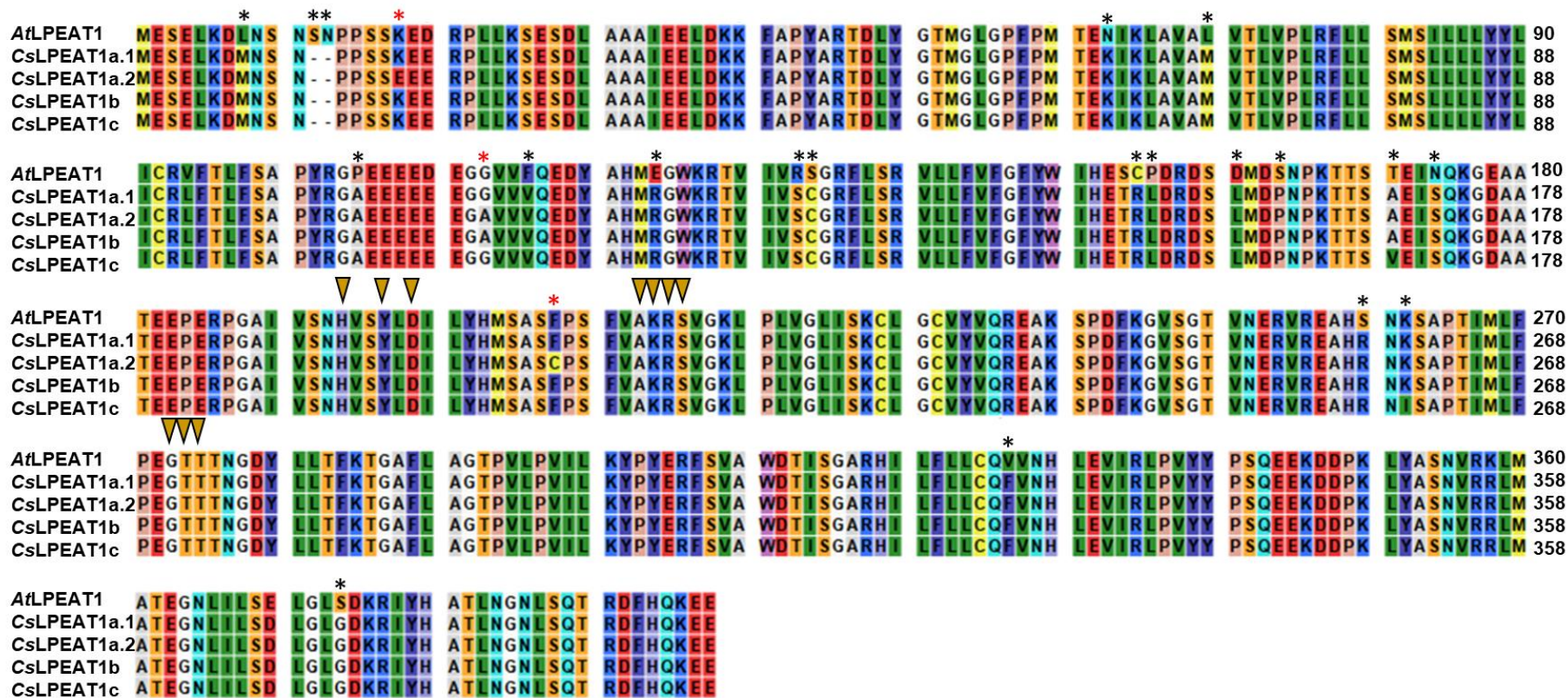
badania dotyczące optymalizacji aktywności enzymów LPEAT obecnych w nasionach *C. sativa* wykazały, że dodatek jonów wapnia nie stymuluje aktywności tych enzymów, a wręcz odwrotnie zaobserwowano efekt hamujący (rozdział 4.2.5; Rys. 22a). Różnice w obecności poszczególnych aminokwasów odnotowano głównie na początku sekwencji białkowych tych enzymów, jedynie dla wariantu CsLPEAT2a zaobserwowano wymianę metioniny na izoleucynę oraz wymianę kwasu glutaminowego na kwas asparaginowy w obrębie domeny wiążącej wapń (Rys. 39).

Tabela 16. Procentowe porównanie podobieństwa sekwencji aminokwasowych wariantów izoformy CsLPEAT1.

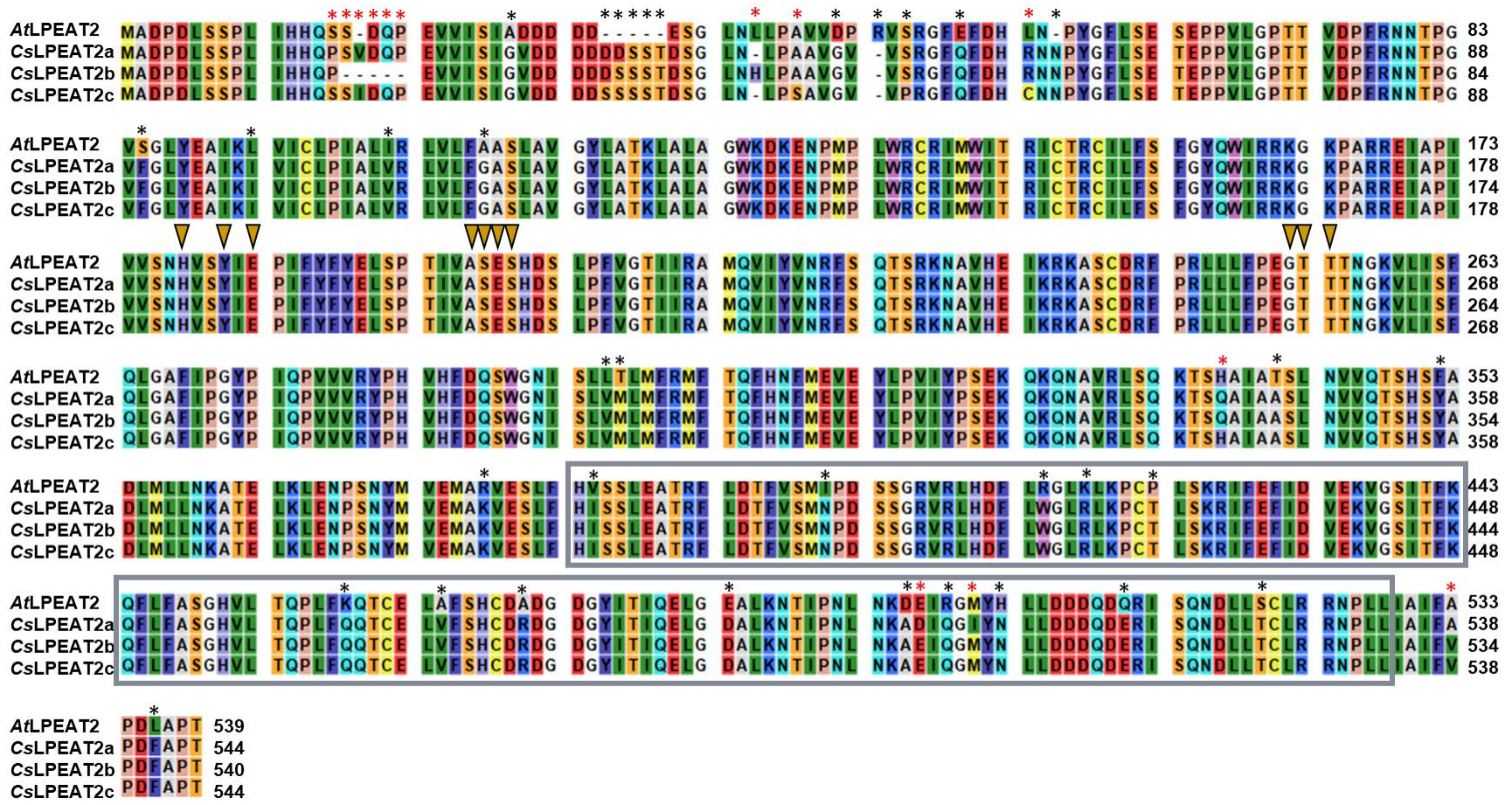
a	CsLPEAT1a.1	CsLPEAT1a.2
CsLPEAT1a.1		99.24%
CsLPEAT1a.2	99.24%	

Tabela 17. Procentowe porównanie podobieństwa sekwencji aminokwasowych wariantów izoformy CsLPEAT2.

b	CsLPEAT2a	CsLPEAT2b	CsLPEAT2c
CsLPEAT2a		98.17%	98.17%
CsLPEAT2b	98.17%		97.61%
CsLPEAT2c	97.61%	97.61%	



Rys. 38. Dopasowanie sekwencji aminokwasów dla czterech wariantów izoformy *CsLPEAT1* oraz sekwencji aminokwasowej *AtLPEAT1*. Żółtymi trójkątami oznaczono miejsca wiązania LPE (ang. LPE-binding site). Czarne asteryksy oznaczają różnice w sekwencjach aminokwasowych pomiędzy sekwencjami *C. sativa*, a *A. thaliana*. Czerwone asteryksy oznaczają różnice w sklonowanych sekwencjach aminokwasowych wariantów izoformy *CsLPEAT1a*. Uliniowania dokonano przy pomocy programu CLC Main WorkBench.

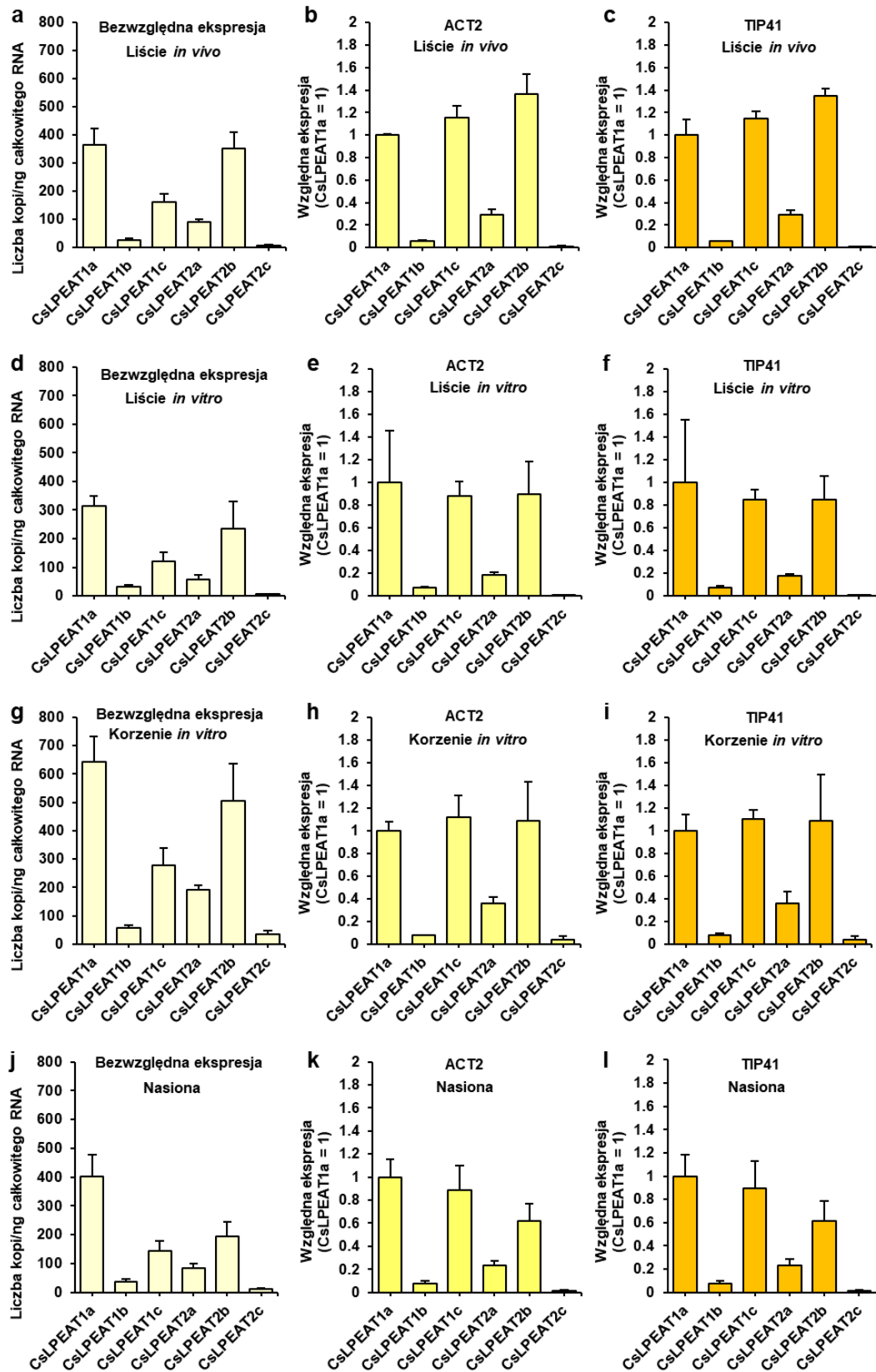


Rys. 39. Dopasowanie sekwencji aminokwasów dla trzech wariantów izoformy CsLPEAT2 oraz sekwencji aminokwasowej AtLPEAT2. Żółtymi trójkątami oznaczono miejsca wiązania LPE (ang. LPE-binding site), natomiast miejsca wiązania Ca²⁺ oznaczono srebrną ramką. Czarne asteryksy oznaczają różnice w sekwencjach aminokwasowych pomiędzy sekwencjami *C. sativa*, a *A. thaliana*. Czerwone asteryksy oznaczają różnice pomiędzy sklonowanymi sekwencjami aminokwasowymi wariantów izoformy CsLPEAT2. Uliniowania dokonano przy pomocy programu CLC Main WorkBench.

4.5.5. Względna i bezwzględna ekspresja genów kodujących CsLPEAT w poszczególnych tkankach *Camelina sativa*

W celu uzupełnienia badań skupiających się na enzymach o aktywności LPEAT przeprowadzona została analiza ekspresji genów kodujących CsLPEAT zarówno w tkankach wegetatywnych takich jak liście i korzenie z roślin hodowanych *in vitro* oraz liście z warunków *in vivo*, a także tkankach generatywnych – nasionach pochodzących z II stadium ich rozwoju. Badania przeprowadzono przy zastosowaniu metody RT-qPCR, a jako geny referencyjne, niezbędne do normalizacji poziomu ekspresji badanych wariantów izoform wybrano dwa geny: *ACT2*, kodujący β -aktynę, oraz *TIP41*, kodujący aktywator fosfatazy typu 2A. Oba geny wybrano na podstawie danych literaturowych wskazujących, że są one stabilnie ekspresjonowane w różnych komórkach *C. sativa* (Chao i in., 2019; Dixit i in., 2019). Analizę ekspresji przeprowadzono dla genów kodujących poszczególne warianty CsLPEAT obecnych w tkankach *C. sativa*, włącznie z genami wariantów CsLPEAT, których nie udało się sklonować; niezbędne dla nich startery do reakcji zaprojektowano na podstawie dostępnych baz danych. Analiza ekspresji genów została wykonana we współpracy z dr. Kamilem Demskim.

Uzyskane wyniki dotyczące względnej ekspresji zostały przedstawione na Rys. 39. Dla większości z genów kodujących izoformy CsLPEAT wzorce zarówno bezwzględnej, jak i względnej ekspresji były do siebie podobne. Wyjątek stanowił jedynie wariant *CsLPEAT1c*, dla którego odnotowano wyższy poziom ekspresji wówczas, gdy przeprowadzono pomiar względnej ekspresji. Spośród *CsLPEAT1* najlepiej ekspresjonowany był gen kodujący wariant *CsLPEAT1a*, natomiast spośród *CsLPEAT2* był to gen kodujący wariant *CsLPEAT2b*, którego szczególnie wysoką ekspresję odnotowano w tkankach wegetatywnych. Z drugiej strony, odwrotny efekt (najniższą ekspresję) odnotowano dla *CsLPEAT1b* oraz *CsLPEAT2c*. Biorąc pod uwagę ekspresję wszystkich genów kodujących badane warianty obu izoform, to ekspresja genów kodujących izoformę CsLPEAT1 dominuje nad ekspresją genów kodujących izoformę CsLPEAT2, szczególnie w nasionach (Rys. 39). Najwyższy poziom bezwzględnej ekspresji genów kodujących warianty obu izoform CsLPEAT odnotowano w korzeniach z hodowli *in vitro*. Bezwzględna ekspresja genów kodujących CsLPEAT w liściach *C. sativa*, również z hodowli *in vitro* była około 3-krotnie niższa. W pozostałych tkankach odnotowano poziom bezwzględnej ekspresji nieco podobny do tego odnotowanego dla liści z warunków *in vitro* (Rys. 39a, d, g, j).



Rys. 39. Analiza ekspresji genów kodujących warianty izoformy CslPEAT1 oraz CslPEAT2 w różnych tkankach roślinnych: liście *in vivo* (a-c), liście *in vitro* (d-f), korzenie *in vitro* (g-i) oraz nasiona (j-l). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

4.6. Charakterystyka biochemiczna poszczególnych izoenzymów CsLPEAT

Kolejnym etapem badań było zbadanie osobno każdego z wariantów CsLPEAT1 oraz CsLPEAT2, tak aby poznać ich właściwości biochemiczne takie jak optymalne warunki reakcji enzymatycznych *in vitro*, aktywność oraz specyficzność w stosunku do różnych akceptorów oraz donorów grup acylowych. Dodatkowo celem tej części badań było zweryfikowanie wpływu temperatury na aktywność poszczególnych wariantów CsLPEAT1 oraz CsLPEAT2. W tym celu sklonowane sekwencje poszczególnych wariantów badanych izoenzymów CsLPEAT zostały wprowadzone do systemu drożdżowego i poddane dalszym badaniom opisanym poniżej.

Do transformacji komórek szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta ALE1$ wprowadzono 5 uprzednio sklonowanych sekwencji kodujących poszczególne warianty izoenzymów CsLPEAT. Dwie z wklonowanych sekwencji, będące wariantami splicingowymi, kodowały odpowiednio CsLPEAT1a.1 oraz CsLPEAT1a.2, natomiast trzy kolejne były sekwencjami kodującymi warianty izoformy CsLPEAT2: CsLPEAT2a, CsLPEAT2b oraz CsLPEAT2c. Wykorzystany do transformacji szczep drożdży $\Delta ALE1$, posiada delecję głównego genu (*ALE1*) odpowiedzialnego za aktywność acylotransferazy typu acylo-CoA:lizofosfolipid, specyficzną w stosunku do LPC oraz LPE, a więc wprowadzenie do niego sekwencji kodujących białka o aktywności LPEAT powinno prowadzić do całkowitej komplementacji syntezy PE. Należy jednak zaznaczyć, że synteza PE, w komórkach drożdży może odbywać się w pewnym stopniu za pośrednictwem drugiej z acylotransferaz typu acylo-CoA:lizofosfolipid – Slc1 (Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2016). W związku z tym w części z przeprowadzonych testów w ramach poniżej opisanych badań niezbędne było wykonanie równoległe dwóch testów: jednego przy wykorzystaniu frakcji mikrosomalnej pochodzącej z hodowli drożdży z wprowadzoną badaną sekwencją oraz drugiego z frakcją mikrosomalną otrzymaną z hodowli drożdży transformowanych pustym plazmidem (stanowiącym „tło” reakcji). Ostateczny wynik aktywność badanych wariantów enzymów CsLPEAT otrzymywano poprzez odjęcie ilości syntetyzowanego *de novo* [^{14}C]PE w testach określających „tło” reakcji od ilości syntetyzowanego *de novo* [^{14}C]PE w reakcjach z wykorzystaniem mikrosomów z drożdży niosących badaną sekwencję.

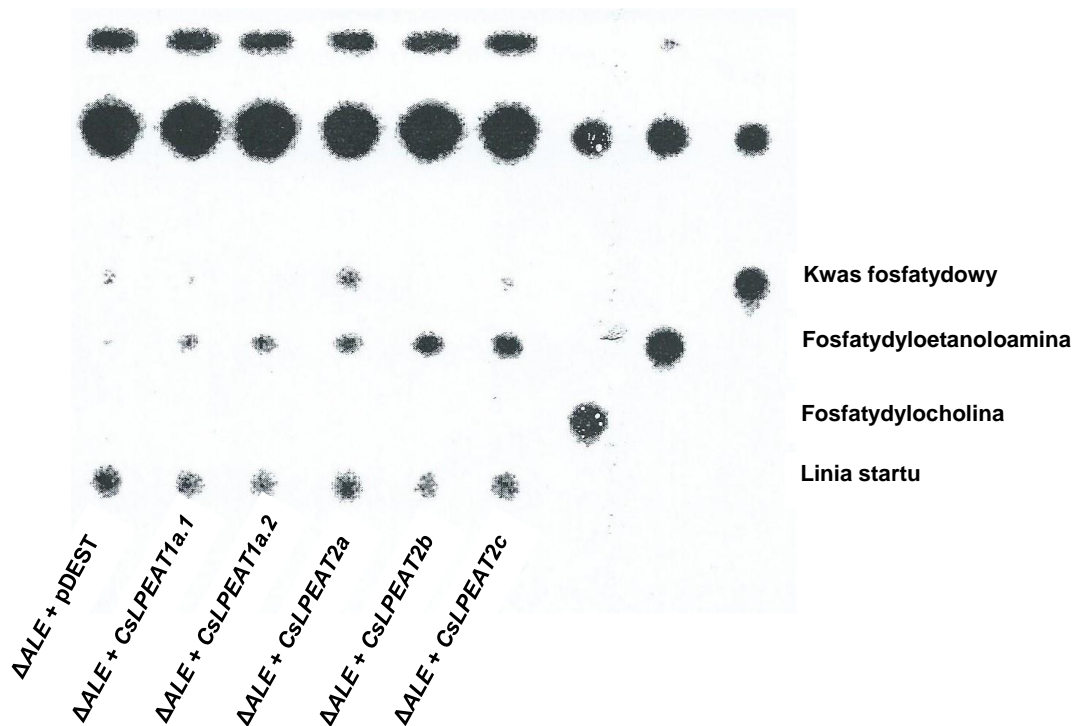
Enzymy CsLPEAT charakteryzowały się w dotychczas przeprowadzonych badaniach najniższą aktywnością spośród badanych enzymów CsLPLAT. Również dość małe aktywności odnotowano dla tych enzymów w transformowanych szczepach drożdży. W związku z tym w celu czytelniejszej wizualizacji otrzymanych wyników,

ilość *de novo* syntetyzowanej PE została przedstawiona jako ilość pmol [¹⁴C]PE/min/mg białka mikrosomalnego. Do obliczeń wykorzystano stałą wartość wyznaczoną dla komórek drożdżowych określającą, że 1 nmol mikrosomalnego PC odpowiada 4,4 µg białka mikrosomalnego.

4.6.1. Efekt transformacji szczepu $\Delta ALE1$ *Saccharomyces cerevisiae* różnymi wariantami *CsLPEAT1* oraz *CsLPEAT2*

W celu potwierdzenia aktywności enzymatycznej typu LPEAT, kodowanej przez sekwencje wprowadzone do systemu drożdżowego, przeprowadzona została izolacja frakcji mikrosomalnych z transformowanych linii, które kolejno wykorzystano do testów enzymatycznych *in vitro*. Testy przeprowadzono w obecności akceptora grup acylowych w postaci: *sn*-1-18:1-LPE, natomiast jako donor grup acylowych wykorzystano [¹⁴C]18:1-CoA.

Wyniki znajdujące się na Rys. 40, przedstawiają zdjęcie autoradiogramu płytki z rozdzielonymi ekstraktami uzyskanymi w wyniku reakcji enzymatycznych *in vitro* z udziałem badanych frakcji mikrosomalnych. Na załączonym zdjęciu można zaobserwować, że wszystkie z badanych transformantów były zdolne do syntezy fosfatydyloetanolaminy. Otrzymane wyniki jasno potwierdzają, że wprowadzone do systemu drożdżowego sekwencje kodują białka o aktywności LPEAT.



Rys. 40. Komplementacja szlaku syntezy fosfatydyloetanolaminy w komórkach drożdży *S. cerevisiae* Δ *ALE1* w wyniku wprowadzenia do ich genomu sekwencji genowych poszczególnych wariantów *CsLPEAT*. Do komórek drożdżowych wprowadzono geny kodujące: *CsLPEAT1a.1*, *CsLPEAT1a.2*, *CsLPEAT2a*, *CsLPEAT2b* and *CsLPEAT2c*. Na zdjęciu przedstawiony został wyniki testu radioizotopowego sczytany przy pomocy autoradiografu. Test wykonano przy wykorzystaniu *sn*-1-18:1-LPE jako akceptora oraz 18:1-CoA jako donora grup acylowych. Pierwsza kolumna przedstawia kontrole negatywną - szczep Δ *ALE1*, który nie posiada zdolności do syntezy fosfatydyloetanolaminy poprzez szlak LPLAT. Wzorce fosfolipidów, rozdzielanych łącznie z badanymi ekstraktami, otrzymano w wyniku reakcji enzymatycznej przeprowadzonej z frakcją mikrosomalną ze szczepu dzikiego drożdży BY4742.

4.6.2. Optymalizacja parametrów reakcji enzymatycznych katalizowanych przez różne izoenzymy CsLPEAT

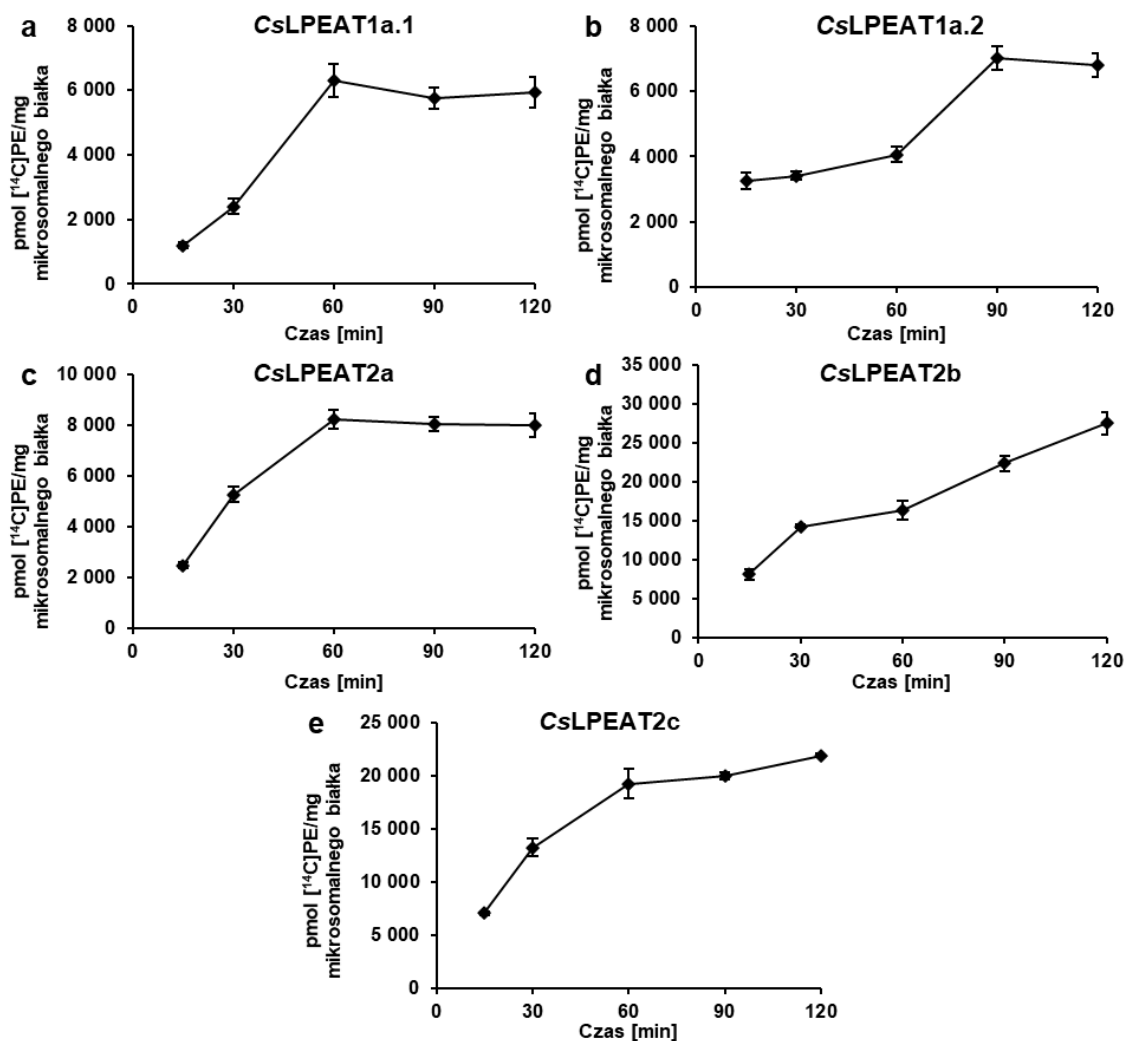
Przed rozpoczęciem badań dotyczących wpływu temperatury na aktywność oraz specyficzność substratową poszczególnych wariantów CsLPEAT, przeprowadzona została optymalizacja dwóch podstawowych parametrów reakcji enzymatycznych *in vitro* prowadzonych przez te enzymy. W ramach tych doświadczeń wyznaczony został optymalny czas reakcji oraz optymalna ilość frakcji mikrosomalnej. Wszystkie z eksperymentów przeprowadzono w obecności *sn*-1-18:1-LPE i [¹⁴C]18:1-CoA oraz 0,1 M buforu fosforanowego o pH 7,2, który również jak w przypadku testów z wykorzystaniem roślinnych frakcji mikrosomalnych, imituje środowisko naturalne badanych enzymów. We wszystkich eksperymentach optymalizacyjnych zastosowano temperaturę 30 °C, ponieważ w tych warunkach odnotowano najwyższą aktywność enzymów LPEAT obecnych w tkankach roślinnych (Rys. 32).

Dla trzech z pięciu badanych CsLPEAT, tj. CsLPEAT1a.1, CsLPEAT2a oraz CsLPEAT2c zaobserwowano, że reakcja przez nie katalizowana przebiega liniowo aż do 60 minut. Kolejno po tym czasie następuje faza plateau, podczas której synteza *de novo* PE ulega zwolnieniu (CsLPEAT2c) lub przebiega na podobnym poziomie jak reakcje związane z jej przekształceniami (CsLPEAT1a.1, CsLPEAT2a); (Rys. 41a, c, e). Dla enzymu kodowanego przez drugi wariant splicingowy sekwencji *lpeat1a.2* – CsLPEAT1a.2, nie odnotowano liniowego przebiegu reakcji, jednakże w reakcji 90 minutowej wykryto największą ilość syntetyzowanego produktu. Dodatkowo była to ilość pozwalająca na bezproblemowe odczytanie wartości na autoradiogramie, co jest szczególnie ważne, ponieważ w dalszych badaniach wykorzystane były inne donory grup acylowych, słabiej akceptowane przez CsLPEAT (Rys. 41b). Dla ostatniego badanego enzymu – CsLPEAT2b, wyznaczono, że optymalnym czasem reakcji jest 30 minut; po tym czasie ilość syntetyzowanego produktu wprawdzie dalej rosła, ale już z mniejszą intensywnością (Rys. 41d).

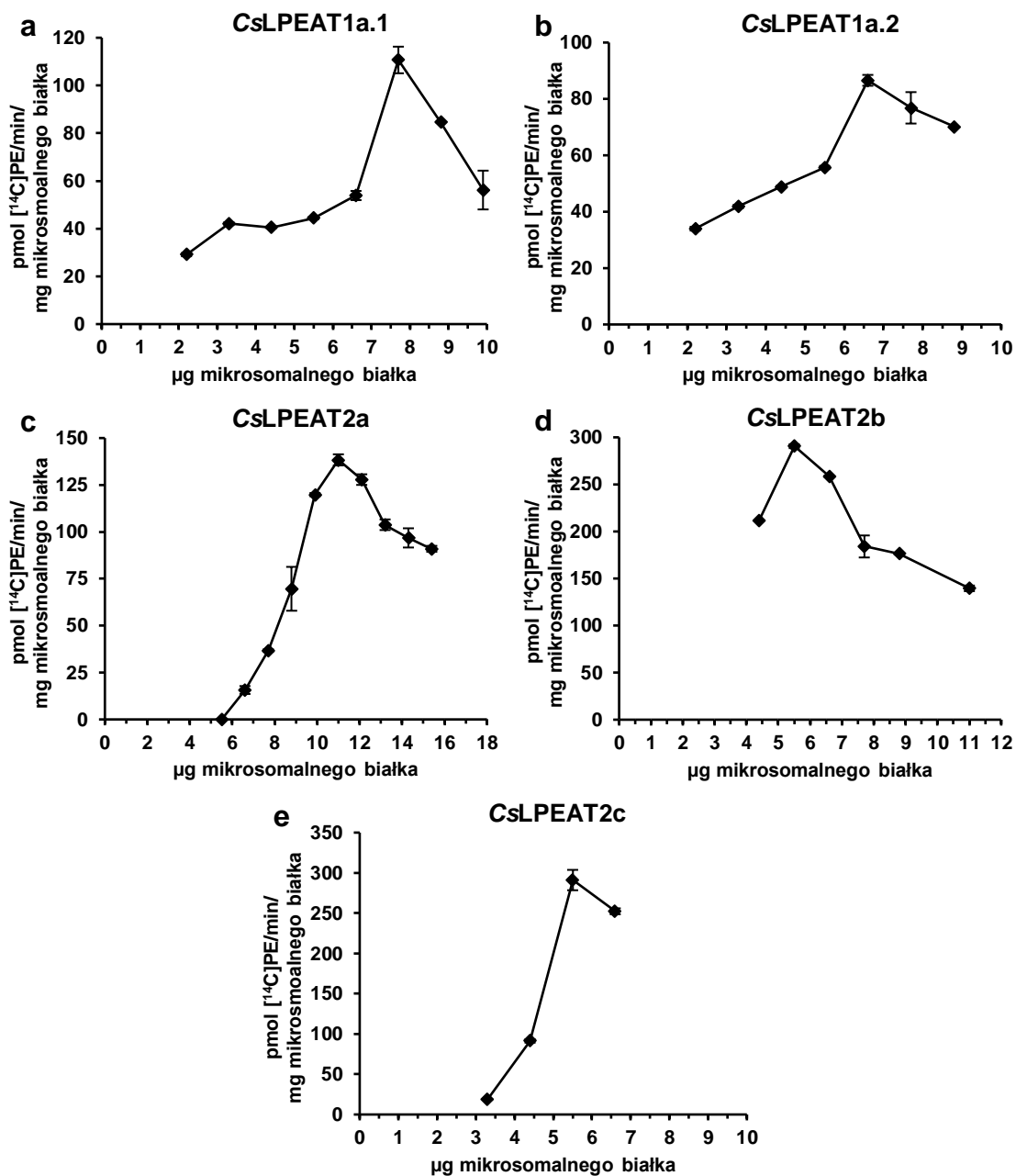
Drugim z wyznaczanych parametrów była ilość frakcji mikrosomalnej dodawanej do reakcji enzymatycznej jako źródło badanych enzymów. Jej zawartość została przedstawiona jako µg mikrosomalnego białka. Ilość ta została wyliczona na podstawie stałej wartości, dla której 1 nmol mikrosomalnego PC obecnego we frakcjach mikrosomalnych z komórek drożdży wynosi 4,4 µg mikrosomalnego białka. Dla wariantów CsLPEAT2b oraz CsLPEAT2c wyznaczone zostały te same ilości mikrosomów, przy których reakcja zachodzi najwydajniej. Wartość ta wynosiła 5,5 µg

mikrosomalnego białka (czyli 1,25 nmol mikrosomalnego PC/test). Podwyższenie lub obniżenie ilości frakcji mikrosomalnej dodawanej do mieszaniny reakcyjnej już o zaledwie 1,1 µg białka mikrosomalnego prowadził do znacznego zmniejszenia aktywności tych wariantów CsLPEAT2 (Rys. 42de). Dla trzeciego z wariantów CsLPEAT2 – CsLPEAT2a, największą aktywność odnotowano podczas reakcji zawierających aż 11 µg mikrosomalnego białka, co odpowiadało 2,5 nmol mikrosomalnego PC. Stopniowe zmniejszenie oraz zwiększenie zawartości białka mikrosomalnego w mieszaninie reakcyjnej prowadziło do zmniejszania aktywności CsLPEAT2a; zmniejszenie tej ilości do 5,5 µg/test powodowało redukcję tej aktywności poniżej poziomu detekcji (Rys. 42c). Dla obu badanych wariantów CsLPEAT1 odnotowano jeszcze inne optymalne wartości „stężenia” frakcji mikrosomalnej. CsLPEAT1a.1 wykazywał najwyższą aktywność w reakcji z dodatkiem 7,7 µg mikrosomalnego białka, podczas gdy CsLPEAT1a.2 wykazywał najwyższą aktywność przy obecności alikwotów frakcji mikrosomalnej zawierających 6,6 µg białka (Rys. 42ab).

Największą aktywność odnotowano dla wariantów CsLPEAT2, szczególnie dla CsLPEAT2b oraz CsLPEAT2c, których aktywność była około 2,6 razy oraz 3 razy większa odpowiednio w odniesieniu do CsLPEAT1a.1 oraz CsLPEAT1a.2. Chociaż dla białek kodowanych przez badane warianty splicingowe *lpeat1a* odnotowano podobne aktywność, jednakże dla każdego z nich wyznaczono inny optymalny czas reakcji oraz inną optymalną ilość frakcji mikrosomalnej. Również dla wariantów CsLPEAT2 ujawniono odmienne optymalne parametry reakcji, co wyraźnie wskazuje, że sklonowane sekwencje kodują inne izoenzymy o różnych właściwościach biochemicznych.



Rys. 41. Optymalizacja czasu reakcji enzymatycznych katalizowanych przez badane warianty acylotransferaz acylo-CoA:lizofosfatydyloetanolamina (LPEAT) z *C. sativa* ekspymowanych w systemie drożdżowym. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).



Rys. 42. Optymalizacja ilości frakcji mikrosomalnych dla reakcji enzymatycznych katalizowanych przez badane warianty acylotransferaz acylo-CoA: lizofosfatydyloetanoloamina (LPEAT) z *C. sativa* eksprymowanych w systemie drożdżowym. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Czas reakcji dla izoenzymów: CsLPEAT1a.1, CsLPEAT2a oraz CsLPEAT2c wynosił 60 min, dla CsLPEAT1a.2 było to 90 min a dla CsLPEAT2b – 30 min.

4.6.3. Wpływ temperatury na aktywność oraz specyficzność substratową poszczególnych izoenzymów CsLPEAT

Po potwierdzeniu zdolności do syntezy PE przez badane warianty izoenzymów CsLPEAT oraz wykonanej optymalizacji warunków reakcji *in vitro* dla każdego z nich, przeprowadzona została analiza ich specyficzności substratowej względem pięciu wybranych donorów grup acylowych (16:0-CoA, 18:0-CoA, 18:1-CoA, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA). Eksperymenty wykonano przy zastosowaniu zoptymalizowanych parametrów reakcji, a jako akceptor grup acylowych wykorzystywano *sn*-1-18:1-LPE, który wcześniej był stosowany w testach z frakcjami mikrosomalnymi otrzymanymi z tkanek wegetatywnych. Uzyskane wyniki prezentujące aktywności badanych CsLPEAT przedstawiono na Rys. 43. Dodatkowo aktywność uzyskana w testach z każdym z badanych acylo-CoA (dla każdej z testowanych temperatur) została zaprezentowana jako procent wartości referencyjnej tj. odnotowanej dla CsLPEAT2b (Rys. 44).

Otrzymane wyniki wykazały, że wszystkie z badanych wariantów CsLPEAT charakteryzowały się szczególnie wysoką preferencją w stosunku do 16:0-CoA niezależnie od temperatury reakcji. CsLPEAT1a.1 oraz CsLPEAT1a.2 osiągały najwyższą aktywność względem tego substratu w temperaturze 30 °C. Między minimalną, odnotowaną w 10 °C, a maksymalną aktywnością dla CsLPEAT1a.1 wartość ta wzrosła o około 2,7 razy (do 798 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka), podczas gdy dla CsLPEAT1a.2 wzrosła dwukrotnie (do 892 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka). Dalszy wzrost temperatury do 40 °C prowadził do spadku aktywności o około 6 oraz 25% odpowiednio dla CsLPEAT1a.1 oraz CsLPEAT1a.2 w porównaniu do ich aktywności w 30 °C. Oba z omawianych wariantów CsLPEAT1a wykazywały stosunkowo niską aktywność w porównaniu do pozostałych badanych wariantów CsLPEAT. W testach z 16:0-CoA, odnotowano dla nich odpowiednio zaledwie 32-52% oraz 34-56% aktywności referencyjnej tj. określonej dla CsLPEAT2b. Najwyższą aktywność w testach z 16:0-CoA odnotowano dla reakcji katalizowanych przez CsLPEAT2b oraz CsLPEAT2c. W obrębie wszystkich testowanych temperatur wyróżniały się one dominującą aktywnością, osiągającą maksimum tej aktywności w 40 °C (odpowiednio 1922 oraz 1827 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka). Dla trzeciego z wariantów CsLPEAT2 – CsLPEAT2a, w testach z 16:0-CoA odnotowano niewielki wpływ temperatury na jego aktywność. Oscylowała ona w granicach 329-414 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Spośród wszystkich badanych CsLPEAT,

w testach z 16:0-CoA dla tego wariantu odnotowano (oprócz 10 °C) najniższą aktywność, która początkowo w 10 °C stanowiła około 36% i wraz ze wzrostem temperatury zmniejszyła się do zaledwie 21% aktywność referencyjnej tj. odnotowanej dla CsLPEAT2b (Rys.43a, 44a, f, k, p).

Drugim, wykorzystanym w testach enzymatycznych donorem grup acylowych był 18:0-CoA. Był on najlepiej wykorzystywany przez CsLPEAT2c, z wyjątkiem temperatury 30 °C (gdzie odnotowano nieco wyższą aktywność w stosunku do tego donora dla CsLPEAT2b). W pozostałych temperaturach, enzym ten wykazywał w testach z udziałem 18:0-CoA aktywność wyższą od 5 do 20% od aktywności referencyjnej tj. wykazywanej przez CsLPEAT2b. Aktywność CsLPEAT2c w testach z 18:0-CoA wzrastała wraz temperaturą; w 40 °C wynosiła 745 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka, czyli około 3,5 razy więcej niż w 10 °C. Podobną tendencję, wzrostu aktywności wraz ze wzrostem temperatury odnotowano dla CsLPEAT1a.2 oraz CsLPEAT2b, których aktywność wzrosła między minimalną, a maksymalną testowaną temperatura odpowiednio o około 346% i 275%. CsLPEAT1a.2 charakteryzował się podobnym jak w przypadku omawianych dwóch poprzednich wariantów wzrost aktywności (o około 2,5 razy) ale tylko pomiędzy 10 °C, a 30 °C. Dalszy wzrost temperatury nieznacznie wpływał zaś na obniżenie jego aktywności. Podobnie jak w przypadku testów z wykorzystaniem 16:0-CoA, aktywność CsLPEAT2a w stosunku do 18:0-CoA nie ulegała znaczącym zmianom w zależności od temperatury, a jego aktywność wahała się w granicach 151-204 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Względna aktywność CsLPEAT1a.1, CsLPEAT1a.2 oraz CsLPEAT2a nie przekraczała odpowiednio 61, 69 oraz 77% aktywności odnotowanej dla CsLPEAT2b w żadnej z testowanych temperatur (Rys.43b, 44b, g, l, r).

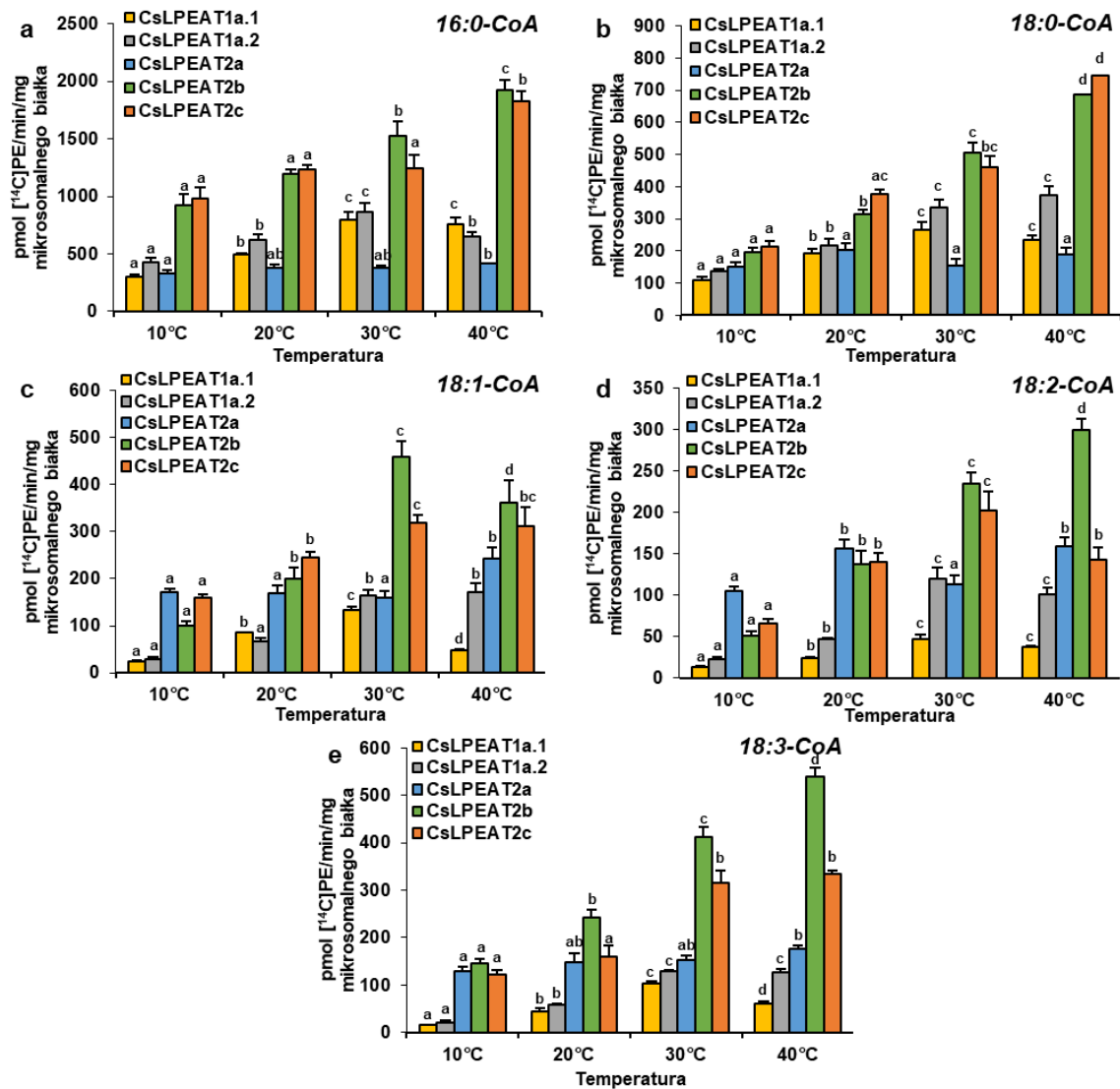
Aktywność badanych wariantów CsLPEAT w stosunku do kolejnego z testowanych donorów grup acylowych – 18:1-CoA, odznaczała się największą zmiennością. W temperaturze 10 °C szczególnie wysoką zdolność do wykorzystywania tego substratu odnotowano dla CsLPEAT2a oraz CsLPEAT2c, których aktywność wynosiła odpowiednio 171 oraz 158 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka i była to aktywność odpowiednio o około 70 oraz 58% większa niż aktywność referencyjna (CsLPEAT2b). Bezwzględna aktywność CsLPEAT2a zwiększała się stosunkowo niewiele wraz z rosnącą temperaturą, a maksimum wynoszące około 242 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka, osiągała przy 40 °C. Wraz ze wzrostem temperatury względna aktywność CsLPEAT2a spadała do 35% wartości referencyjnej,

w temperaturze 30 °C, po czym w temperaturze 40 °C wzrosła do 67%. Aktywność CsLPEAT2c w stosunku do 18:1-CoA była również najwyższa, w porównaniu do aktywności odnotowanej dla pozostałych wariantów CsLPEAT, w temperaturze 20 °C. W porównaniu do aktywności referencyjnej (CsLPEAT2b) była o około 24% wyższa, a w wartościach bezwzględnych wynosiła około 246 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Wzrost temperatury do 30 °C wpływał stymulująco na bezwzględną aktywność CsLPEAT2c, jednakże w temperaturze 40 °C aktywność ta nieznacznie spadła. Aktywności CsLPEAT2b (traktowana jako wartość referencyjna) wzrastała wraz ze wzrostem temperatury do 30 °C, gdzie osiągnęła wartość 460 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Dalszy wzrost temperatury reakcji enzymatycznej prowadził do około 22% zmniejszenia tej aktywności chociaż była to wciąż najwyższa aktywność w porównaniu do aktywności odnotowanej dla pozostałych wariantów CsLPEAT w tych warunkach temperaturowych. CsLPEAT1a.1 i CsLPEAT1a.2 wykazywały niewielką zdolność do wykorzystania 18:1-CoA jako donora grup acylowych. Dla obu z nich najwyższą aktywność odnotowano w 30 °C, która stanowiła odpowiednio dla CsLPEAT1a.1 oraz CsLPEAT1a.2 około 134 oraz 164 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Aktywność ta nie przekraczała jednak odpowiednio 29 oraz 35% aktywności referencyjnej (CsLPEAT2b). Dalszy wzrost temperatury zmniejszał aktywność CsLPEAT1a.1 o około 65%, podczas gdy aktywność CsLPEAT1a.2 pozostawała bez istotnych zmian (Rys.43c, 44c, h, m, s).

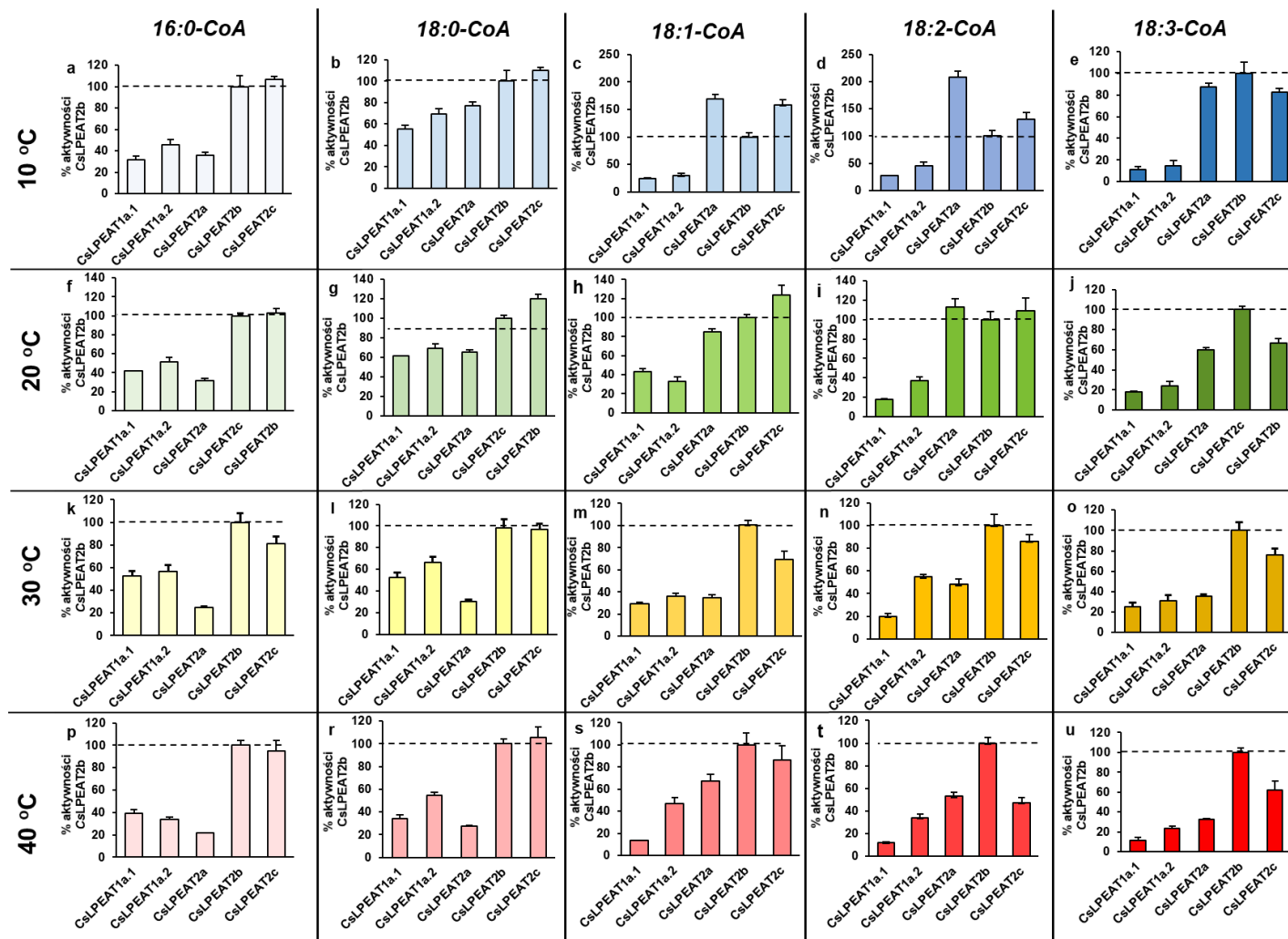
Podobnie jak w przypadku 18:1-CoA wykorzystanie 18:2-CoA przez testowane warianty CsLPEAT zmieniało się w zależności od temperatury reakcji. Należy jednak podkreślić, że 18:2-CoA był najslabiej wykorzystywanym, spośród wszystkich testowanych acylo-CoA, przez badane warianty CsLPEAT. W niższych z testowanych temperatur tj. 10 i 20 °C 18:2-CoA był najefektywniej wykorzystywany przez CsLPEAT2a. Aktywność względem tego donora grup acylowych wyniosła odpowiednio 104 oraz 150 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. W tych temperaturach, aktywność ta była o około 107 oraz o około 13% wyższa niż aktywność referencyjna tj. wykazywana przez CsLPEAT2b. W wyższych temperaturach aktywność CsLPEAT2a nie ulegała już podwyższeniu i oscylowała w granicach 112-158 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka i stanowiła około 48-53% aktywności referencyjnej. W zakresie temperatur 10-20 °C, drugim efektywnie syntetyzującym PE wariantem CsLPEAT był CsLPEAT2c. W tych temperaturach jego aktywność względem 18:2-CoA była o około 31 oraz 9% wyższa od aktywności referencyjnej (CsLPEAT2b). W temperaturze 30 °C

zdolność tego wariantu CsLPEAT do syntezy PE wzrosła z 66 (10 °C) do 202 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka, a w 40 °C zmniejszyła się o około 30% maksymalnej aktywności. Względna aktywność tego wariantu CsLPEAT w 40 °C stanowiła jedynie 48% wartości referencyjnej. W temperaturze 30 oraz 40 °C syntezę PE w obecności 18:2-CoA najefektywniej katalizował CsLPEAT2b, którego aktywność wzrastała wraz z temperaturą osiągając najwyższą aktywność wynoszącą 299 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka, w temperaturze 40 °C. W 20 °C jego aktywność oscylowała w granicach aktywności dwóch pozostałych wariantów CsLPEAT2, podczas gdy w 10 °C reakcja katalizowana przez CsLPEAT2b była najmniej efektywna spośród testowanych wariantów CsLPEAT2. Dla CsLPEAT1a.1 i CsLPEAT1a.2 odnotowane aktywności były najniższe (oprócz aktywności odnotowanej w 30 °C dla CsLPEAT1a.2) spośród testowanych wariantów CsLPEAT. Najwydajniej wykorzystywały one 18:2-CoA w temperaturze 30 °C, CsLPEAT1a.1 – 47 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka oraz CsLPEAT1a.2 – 119 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka, co stanowiło odpowiednio 20 oraz 55% aktywności referencyjnej (Rys.43d, 44d, i, n, t).

Ostatnim z donorów grup acylowych względem, którego testowano aktywność różnych wariantów CsLPEAT był 18:3-CoA. Szczególnie wysoką zdolność do wykorzystywania tego substratu odnotowano dla wariantów CsLPEAT2. Wraz ze wzrostem temperatury z 10 do 40 °C zaobserwowano wzrost aktywności CsLPEAT2b oraz CsLPEAT2c odpowiednio o około 3,7 oraz 2,8 razy. W wartościach bezwzględnych aktywność ta w 40 °C wynosiła odpowiednio 539 oraz 333 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Aktywność CsLPEAT2a nie była już tak wyraźnie zależna od temperatury. Wahala się ona od około 128 (10 °C) do około 175 (40 °C) pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Względna aktywność tego wariantu CsLPEAT2 osiągała maksimum w 10 °C (około 88% wartości referencyjnej) i następnie spadała do 33% w 40 °C. Testowane warianty CsLPEAT1 tj. CsLPEAT1a.1 i CsLPEAT1a.2 w 10 °C wykazywały znikomą aktywność stanowiącą odpowiednio 11% oraz 15% aktywności referencyjnej (CsLPEAT2b). Wraz ze wzrostem temperatury reakcji zwiększała się efektywność reakcji katalizowanych przez oba omawiane warianty CsLPEAT1, osiągając swoje maksimum w 30 °C – 103 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka dla CsLPEAT1a.1 oraz 125 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka dla CsLPEAT1a.2. Wzrost temperatury do 40 °C nie wpłynął znacząco na aktywność CsLPEAT1a.1 natomiast wpłynął na obniżenie aktywności CsLPEAT1a.2 – o około 40% (Rys. 43e, 44e, j, o, u).



Rys. 43. Specyficzność substratowa poszczególnych wariantów CsLPEAT względem pięciu donorów grup acylowych (acyl-CoA) w różnych temperaturach, przy wykorzystaniu *sn*-1-18:1-LPE jako akceptora grup acylowych. Odpowiednio na rysunku znajdują się dane dla reakcji prowadzonych z dodatkiem 16:0-CoA (a), 18:0-CoA (b), 18:1-CoA (c), 18:2-CoA (d), 18:3-CoA (e). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Analizę statystyczną przeprowadzono, dla aktywności każdego z wariantów CsLPEAT w danej temperaturze, przy zastosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie wykonaniu testu post-hoc (test Tukeya). Różne litery wskazują na istotność statystyczną na poziomie $p \leq 0.05$.



Rys. 44. Preferencje poszczególnych wariantów CsLPEAT w stosunku do pięciu donorów grup acylowych (acylo-CoA) w różnych temperaturach. W kolejnych panelach przedstawiona jest aktywność w stosunku do: 16:0-CoA (a, f, k, p), 18:0-CoA (b, g, l, r), 18:1-CoA (c, h, m, s), 18:2-CoA (d, i, n, t) oraz 18:3-CoA (e, j, o, u). Aktywności zostały przedstawione jako procent aktywności odnotowanej dla CsLPEAT2b w testach z poszczególnymi acylo-CoA. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

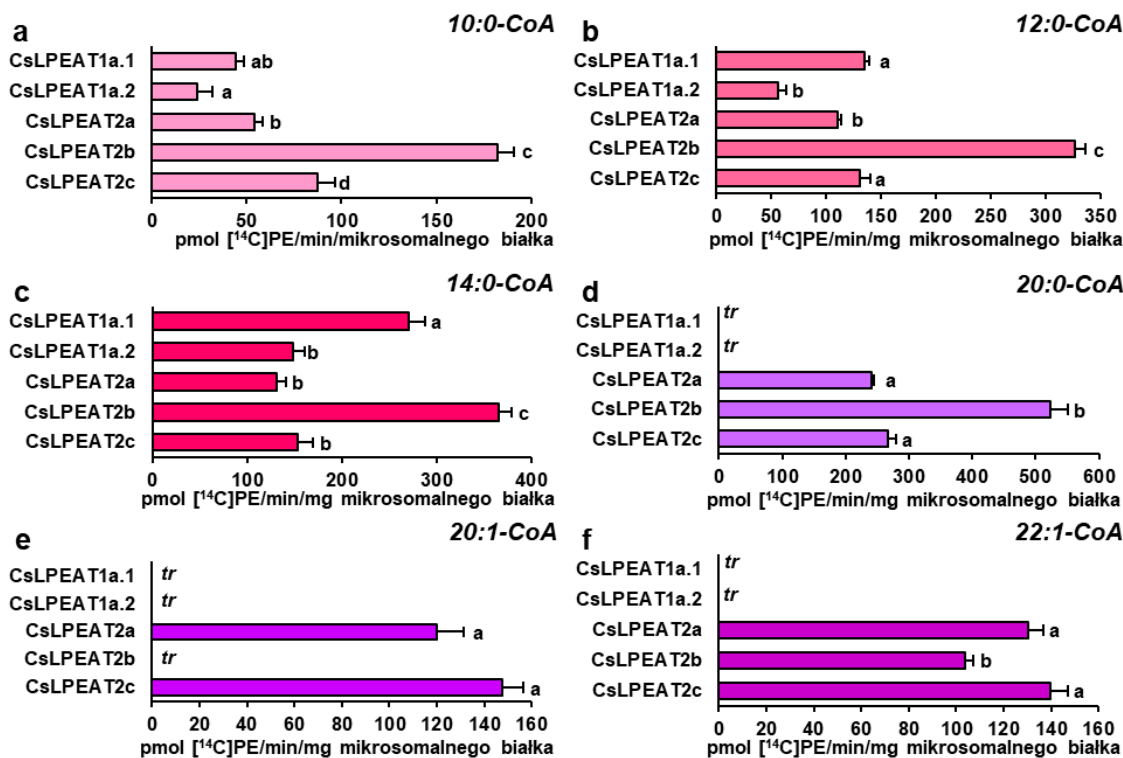
4.6.4. Aktywność oraz specyficzność poszczególnych izoenzymów CsLPEAT w stosunku do średnio- oraz bardzo długołańcuchowych donorów grup acylowych

Biorąc pod uwagę możliwość występowania w cytoplazmatycznej puli acylo-CoA średnio- oraz bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, względem których już uprzednio enzymy LPEAT obecne w tkankach roślinnych wykazały aktywność, zbadane zostały preferencje poszczególnych wariantów CsLPEAT w stosunku do tych grup acylowych. Wszystkie z eksperymentów przeprowadzono w 30 °C, przy zastosowaniu uprzednio wyznaczonych optymalnych parametrów reakcji enzymatycznych *in vitro*. Jako akceptor grup acylowych zastosowano *sn*-1-18:1-LPE.

Wszystkie z testowanych wariantów CsLPEAT efektywnie wykorzystywały acylo-CoA ze średniołańcuchowymi nasyconymi kwasami tłuszczowymi. Wyjątkowo wysoką preferencję odnotowano dla 14:0-CoA, szczególnie w reakcjach katalizowanych przez CsLPEAT1a.1 oraz CsLPEAT2b. Aktywność ta wynosiła odpowiednio 270 oraz 365 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Pozostałe z testowanych wariantów CsLPEAT nieco słabiej wykorzystywały ten donor. Wykazywały one podobną aktywność w testach z jego udziałem oscylująca w granicach 132-150 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka (Rys. 45c). Pozostałe średniołańcuchowe donory grup acylowych (10:0-CoA oraz 12:0-CoA) były również stosunkowo dobrze akceptowane przez badane izoenzymy. Najefektywniej oba substraty były wykorzystywane przez CsLPEAT2b; odpowiednio aktywność tego enzymu w stosunku do 10:0-CoA oraz 12:0-CoA wynosiła 186 oraz 328 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Najniższą preferencję względem tych substratów odnotowano dla CsLPEAT1a.2, którego aktywność stanowiła jedynie 13 oraz 17% maksymalnej aktywności odnotowanej dla CsLPEAT2b. Pozostałe testowane warianty CsLPEAT tj. CsLPEAT1a.1, CsLPEAT2a oraz CsLPEAT2c wykorzystywały 12:0-CoA z podobną preferencyjną plasującą się w granicach 110-135 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. W stosunku do 10:0-CoA, specyficzność tych enzymów była słabsza odpowiednio około 3-krotnie, 2-krotnie oraz 1,5-krotnie (Rys. 45.a, b).

Zdolność do wykorzystywania bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych odnotowano wyłącznie dla wariantów CsLPEAT2. Szczególnie wysoką preferencję zaobserwowano w stosunku do 20:0-CoA, przy czym był do drugi najlepiej wykorzystywany donor grup acylowych spośród wszystkich dotychczas testowanych w reakcjach z CsLPEAT2a oraz CsLPEAT2b. Ich aktywność względem tego substratu odpowiednio wynosiła 241 oraz 523 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka, co

stanowiło 65 oraz 35% aktywności w stosunku do 16:0-CoA (Rys. 43, 45d). Aktywność *CsLPEAT2c* w testach z 20:0-CoA wynosiła około 266 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka i była porównywalna z aktywnością wykazywaną przez ten enzym w stosunku do nienasyconych 18-węglowych acylo-CoA (Rys. 43, 45d). Dwa pozostałe bardzo długołańcuchowe donory grup acylowych – 20:1-CoA oraz 22:1-CoA były wykorzystywane z podobną efektywnością. Najlepszą preferencję w stosunku do tych donorów grup acylowych wykazywał *CsLPEAT2c*. Aktywność odnotowana w testach z ich udziałem wynosiła odpowiednio 148 oraz 140 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Aktywność *CsLPEAT2a* była około 20 oraz 8% niższa odpowiednio w stosunku do 20:1-CoA i 22:1-CoA. Dla trzeciego z wariantów *CsLPEAT2* tj. *CsLPEAT2b*, odnotowano znacznie niższą zdolność do syntezy PE w obecności 22:1-CoA, która wynosiła około 104 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka, natomiast w obecności 20:1-CoA aktywność tego enzymu była poniżej poziomu detekcji (Rys. 45.d, e, f).



Rys. 45. Specyficzność substratowa testowanych wariantów CsLPEAT względem acylo-CoA ze średniołańcuchowymi oraz bardzo długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi. Jako akceptor grup acylowych w testach wykorzystywany był *sn*-1-18:1-LPE. Aktywność względem acylo-CoA z średniołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi została przedstawiona kolejno dla: 10:0-CoA (a), 12:0-CoA (b) oraz 14:0-CoA (c), a względem acylo-CoA z bardzo długołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi dla: 20:0-CoA (d), 20:1-CoA (e) oraz 22:1-CoA (f). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Analizę statystyczną przeprowadzono, dla różnic w aktywności w stosunku do danego acylo-CoA, przy zastosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie wykonaniu testu post-hoc (test Tukeya). Różne litery wskazują na istotność statystyczną na poziomie $p \leq 0.05$.

4.6.5. Aktywność oraz specyficzność poszczególnych izoenzymów CsLPEAT w stosunku do różnych akceptorów grup acylowych

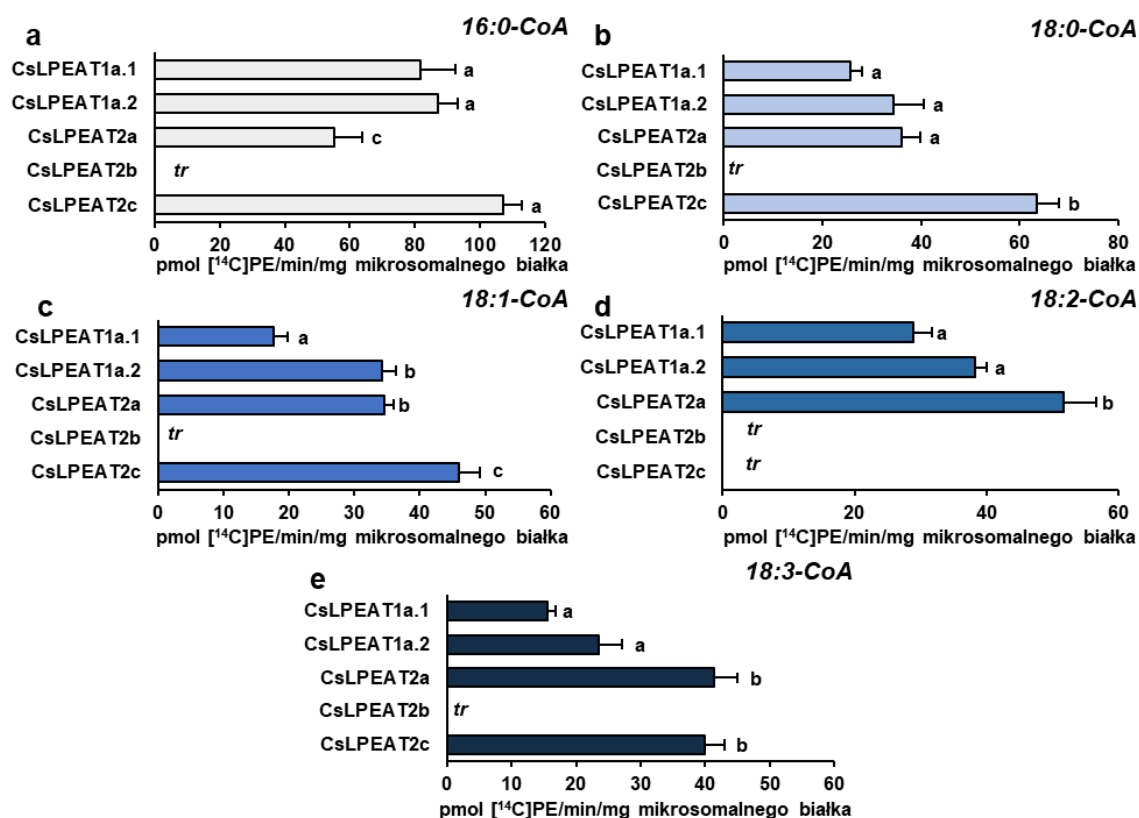
Wykorzystany w poprzedniej części badań akceptor grup acylowych *sn*-1-18:1-LPL jest najpowszechniej używanym substratem w testach enzymatycznych *in vitro* weryfikujących aktywność enzymów LPLAT. Ponadto badania przeprowadzone przez niezależne grupy naukowców zaobserwowały największą specyficzność enzymów typu LPEAT względem tego akceptora (Hishikawa i in., 2008; Stålberg i in., 2009). Ponadto badania przeprowadzone na nasionach *C. sativa* odmiany Suneson wykazały, że ta forma LPE jest dominująca w tych tkankach, natomiast również znaczącą zawartość stanowi 16:0-LPE (Abdullah i in., 2018). Z kolei badania przeprowadzone na odmianie *C. sativa* „CAM139” wykazały przeważającą zawartość 16:0-LPE, a drugie miejsce pod względem zawartości, w zależności od stadium rozwoju nasion, przypadało dla 18:2-LPE (we wczesnych stadiach rozwoju nasion) lub 18:1-LPE (w stadiach rozwoju nasion następujących po 18 DAF); (Marmon i in., 2017).

Dotychczas, jednakże nie zostały przeprowadzone żadne badania dotyczące profilu kwasów tłuszczowych obecnych w puli fosfatydyloetanolaminy obecnej w liściach *C. sativa*. W ramach niniejszej pracy przeprowadzono właśnie takie badania, które wykazały, że w pozycji *sn*-1 fosfatydyloetanolaminy dominuje kwas palmitynowy, który stanowi nawet do 60% wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w tej pozycji. Kolejno, w tej pozycji znajduje się kwas linolenowy, linolowy, stearynowy oraz oleinowy, które kolejno stanowią około 15, 13, 8 oraz 4%. Natomiast w przypadku pozycji *sn*-2 dominuje kolejno zawartość kwasu linolenowego (52%), linolowego (30%), palmitynowego (10%), oleinowego (5%) oraz stearynowego (3%); (Aneks, Rys. A5).

W związku z danymi literaturowymi oraz otrzymanymi wynikami celem kolejnych badań było zweryfikowanie aktywności enzymów LPEAT w stosunku do innych akceptorów grup acylowych, niż uprzednio testowany *sn*-1-18:1-LPE (Rys. 43). Do tych badań wykorzystano 16:0-LPE, który, jak się wydaje, może być dominującą formą LPE w liściach (badania dotyczące kwasów tłuszczowych obecnych w poszczególnych pozycjach *sn* PE) i nasionach *C. sativa* oraz 18:2-LPE, który był drugim pod względem zawartości wariantem LPE obecnym w nasionach (Marmon i in., 2017), a także może stanowić znaczną część puli LPE obecnej w liściach (badania wspomniane powyżej). Testy enzymatyczne *in vitro* ponownie przeprowadzone zostały w obecności pięciu wybranych donorów grup acylowych. Otrzymane wyniki dotyczące

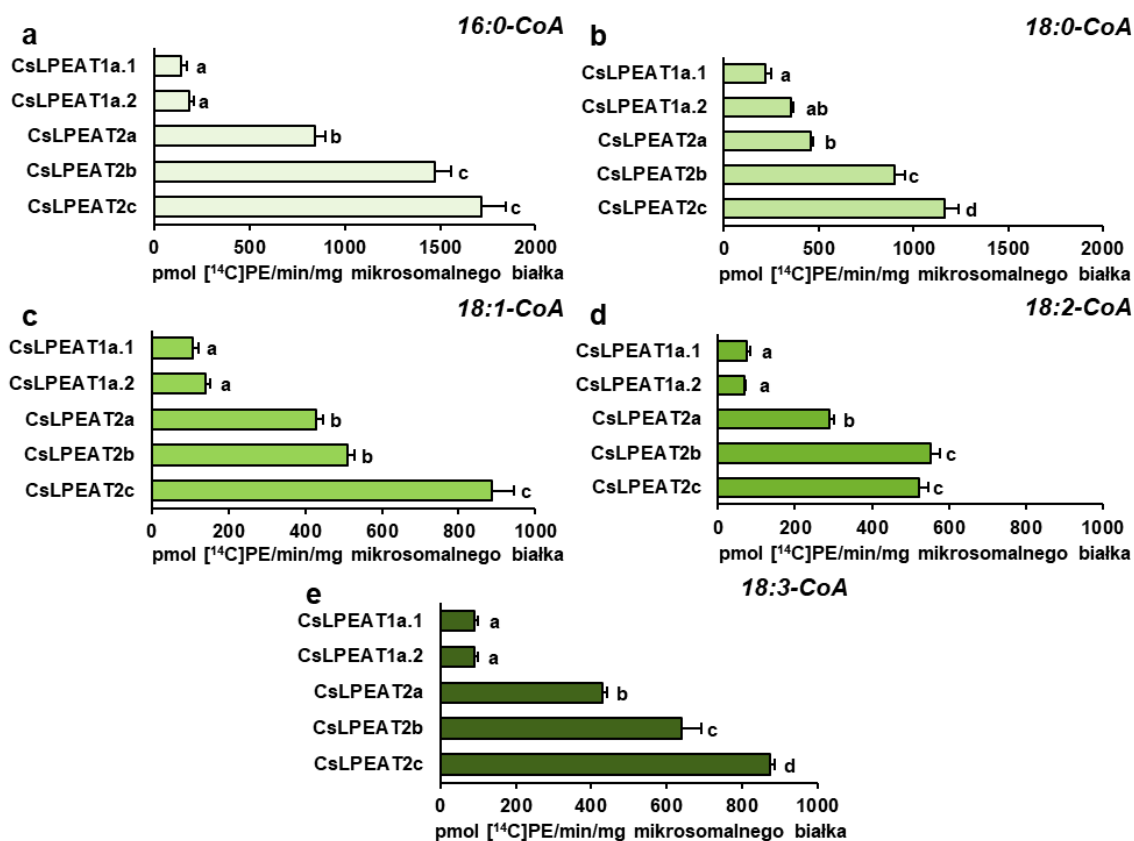
aktywności poszczególnych wariantów CsLPEAT w stosunku do *sn-1-16:0-LPE* przedstawiono na Rys. 46, natomiast w stosunku do *sn-1-18:2-LPE* na Rys. 47.

Pomimo dominującej obecności kwasu stearynowego w pozycji *sn-1* PE, aktywność badanych wariantów CsLPEAT względem 16:0-LPE była wyraźnie mniejsza w porównaniu do wyników reakcji przeprowadzonych w obecności innych testowanych LPE. W testach z 16:0-LPE dla CsLPEAT2b nie odnotowano żadnej aktywności, bądź była ona poniżej możliwego poziomu detekcji, niezależnie od zastosowanego donora grup acylowych. W tego typu testach pozostałe testowane warianty CsLPEAT najefektywniej wykorzystywały (jako donor grup acylowych) 16:0-CoA. Szczególnie wysoką aktywność (dla takiej kombinacji substratów) odnotowano w testach z CsLPEAT2c. Kolejno, pod względem wykazywanej aktywności plasowały się: CsLPEAT1a.2 i CsLPEAT1a.1 oraz CsLPEAT2a. Odnotowane w tych testach aktywności wynosiły odpowiednio: 107, 87, 82 oraz 55 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka (Rys. 46a). W testach wykorzystujących 18:0-CoA oraz 18:1-CoA jako donory kwasów tłuszczowych, najwyższą aktywnością charakteryzowała się również CsLPEAT2c. Odnotowane aktywności to odpowiednio około 65 oraz 45 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Nieco niższą aktywność w tego typu testach odnotowano dla CsLPEAT1a.2 oraz CsLPEAT2a. Aktywność ta oscylowała w granicach 34-36 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Jeszcze niższą aktywność wykazywał CsLPEAT1a.1; około 26 i 18 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka, odpowiednio w testach z 18:0-CoA oraz 18:1-CoA (Rys. 46b, c). Reakcja syntezy PE w obecności 16:0-LPE oraz 18:2-CoA była katalizowana tylko przez CsLPEAT2a, CsLPEAT1a.2 oraz CsLPEAT1a.1. Wydajność tej syntezy wynosiła odpowiednio około 51, 38 oraz 29 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka (Rys. 46d). W stosunku do 18:3-CoA najwyższą zdolność do wykorzystywania tego substratu wykazywała CsLPEAT2a (41 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka). Pozostałe warianty CsLPEAT, z wyjątkiem nieaktywnego CsLPEAT2b, osiągnęły około 97% (CsLPEAT2c), 57% (CsLPEAT1a.2) oraz 38% (CsLPEAT1a.1) aktywności wykazywanej przez CsLPEAT2a (Rys. 46e).



Rys. 46. Specyficzność substratowa badanych wariantów CsLPEAT względem wybranych donorów grup acylowych (acylo-CoA) w testach z *sn*-1-16:0-LPE. Jako donory grup acylowych zastosowano: 16:0-CoA (a), 18:0-CoA (b), 18:1-CoA (c), 18:2-CoA (d), 18:3-CoA (e). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Analizę statystyczną przeprowadzono, dla różnic w aktywności w stosunku do danego acylo-CoA, przy zastosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie wykonaniu testu post-hoc (test Tukeya). Różne litery wskazują na istotność statystyczną na poziomie $p \leq 0,05$.

Trzecim z testowanych akceptorów grup acylowych był 18:2-LPE, który okazał się być wykorzystywany na poziomie porównywalnym do 18:1-LPE. Najefektywniejszą syntezę *de novo* PE zachodzącą w obecności tego akceptora odnotowano dla reakcji z udziałem 16:0-CoA. Dominującą aktywność odnotowano dla wszystkich wariantów CsLPEAT2, które kolejno osiągnęły 1718 (CsLPEAT2c), 1475 (CsLPEAT2b), oraz 856 (CsLPEAT2a) pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Oba warianty CsLPEAT1 wykorzystywały ten donor z wydajnością sięgającą 8% (CsLPEAT1a.1) i 11% (CsLPEAT1a.2) maksymalnej aktywności odnotowanej w stosunku do tego donora; testy z CsLPEAT2c (Rys. 47a). Najwyższą preferencję testowanych wariantów CsLPEAT1, w omawianych testach, odnotowano w stosunku do 18:0-CoA; ich wydajność sięgała odpowiednio 19 oraz 30% wydajności wykazywanej przez CsLPEAT2c charakteryzującej się najwyższą aktywnością – 1162 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Aktywność wykazywana w tego typu testach przez CsLPEAT2b oraz CsLPEAT2a była niższa, od tej wykazywanej przez CsLPEAT2c, odpowiednio o około 23 oraz 60% (Rys. 47b). W testach wykorzystujących jako donory kwasów tłuszczowych 18:1-CoA, 18:2-CoA oraz 18:3-CoA, aktywność wykazywana przez oba warianty CsLPEAT1 była podobna i oscylowała odpowiednio w granicach: 106-142, 76-69 oraz 89-91 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Spośród testowanych acylo-CoA z nienasyconymi 18-węglowymi kwasami tłuszczowymi, badane warianty CsLPEAT2, najefektywniej wykorzystywały 18:1-CoA. Kolejno był on najlepiej wykorzystywany przez CsLPEAT2c, CsLPEAT2b oraz CsLPEAT2a, dla których efektywność syntetyzowania *de novo* PE wynosiła: 887, 511 oraz 430 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka (Rys. 47c). Podobną tendencję odnotowano dla reakcji z udziałem 18:3-CoA, gdzie odpowiednio odnotowano dla reakcji z udziałem tych wariantów CsLPEAT2 aktywność wynoszącą 847, 640 oraz 430 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka (Rys. 47e). W reakcjach enzymatycznych zachodzących w obecności 18:2-LPE oraz 18:2-CoA najwyższą aktywność odnotowano dla CsLPEAT2b, która wyniosła 553 pmol [¹⁴C]PE/min/mg mikrosomalnego białka. Wysoką wydajność syntezy PE w tego typu testach zaobserwowano również dla CsLPEAT2c oraz CsLPEAT2a; wynosiła ona odpowiednio około 94 oraz 54% aktywności odnotowanej dla CsLPEAT2b (Rys. 47d).



Rys. 47. Specyficzność substratowa badanych wariantów CsLPEAT względem wybranych donorów grup acylowych (acylo-CoA) w testach z *sn*-1-18:2-LPE. Jako donory grup acylowych zastosowano: 16:0-CoA (a), 18:0-CoA (b), 18:1-CoA (c), 18:2-CoA (d), 18:3-CoA (e). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). Analizę statystyczną przeprowadzono, dla różnic w aktywności w stosunku do danego acylo-CoA, przy zastosowaniu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie wykonaniu testu post-hoc (test Tukeya). Różne litery wskazują na istotność statystyczną na poziomie $p \leq 0,05$

5. DYSKUSJA

Fosfolipidy stanowią jeden z podstawowych składników budulcowych błony komórkowej. Związki te tworzą liczną grupę lipidów polarnych, które w zależności od swojej budowy, opartej na szkielecie glicerolowym, do którego dołączone mogą być różne grupy polarne oraz kwasy tłuszczowe wpływają na utrzymanie jej ciekło-kryształicznej struktury. Ponadto każdy z fosfolipidów może występować w charakterystycznym dla niego kompartmentcie komórkowym i pełnić unikatową rolę w poprawnym funkcjonowaniu komórki roślinnej. Synteza tych związków może odbywać się za pośrednictwem różnych reakcji, jedną z nich są reakcje katalizowane przez acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT).

Enzymy LPLAT wykazują dualną rolę, która polega na zdolności do przeprowadzania reakcji typu *forward* oraz *backward*. W reakcjach typu *forward* odpowiadają one za przenoszenie grup acylowych z cytoplazmatycznej puli acylo-CoA na lizofosfolipidy prowadząc do powstania odpowiednich fosfolipidów. Natomiast w reakcjach typu *backward* są odpowiedzialne za przenoszenie grup acylowych z fosfolipidów na wolny koenzym A (CoA), wpływając w ten sposób na modyfikację puli acylo-CoA. Dodatkowo podczas tej reakcji powstaje odpowiedni lizofosfolipid, który ponownie może zostać wykorzystany jako substrat w reakcji typu *forward*. W związku z ich powyżej opisaną zdolnością są one uważane za enzymy potencjalnie odpowiadające za mechanizm remodelowania, czyli edycji grup acylowych lipidów. Jednakże wciąż niewiele badań dotyczących ich roli w tym procesie zostało przeprowadzonych.

Wśród enzymów LPLAT wyróżnić można poszczególne typy tych enzymów, które charakteryzują się odmienną specyficznością do danego akceptora grup acylowych. Jedną z najlepiej poznanych grup tych enzymów są LPCATy, katalizujące reakcję przenoszenia grup acylowych pomiędzy pulą acylo-CoA, a fosfatydylocholiną. Ich zdolność do edycji grup acylowych postulowano już w latach 80., kiedy to Stymne i Stobart (1984) zaproponowali teorię, że enzymy te mogą katalizować reakcję zarówno do przodu, jak i do tyłu. Jednakże dopiero na przestrzeni ostatnich 10 lat ostatecznie teoria ta została potwierdzona (Lager i in., 2013; Pan i in., 2013; Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2016). Jednakże, jak dotychczas tylko nieliczne badania dotyczące przebudowy puli różnych fosfolipidów zostały wykonane. Ponadto skupiały się one na wykorzystaniu systemów drożdżowych, do których wprowadzane były geny kodujące poszczególne roślinne

LPLATy lub dodatkowe kopie genów kodujących te acylotransferazy występujące naturalnie w drożdżach (Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2016; Renne i in., 2016).

W związku z luką wiedzy dotyczącą roli enzymów LPLAT w procesie edycji grup acylowych bezpośrednio w tkankach roślinnych, jednym z głównych celów przeprowadzonych badań w ramach niniejszej pracy było wykazanie udziału poszczególnych enzymów LPLAT w tym procesie. Celem było określenie intensywności i zdolności do przeprowadzania procesu remodelowania w tkankach wegetatywnych oraz generatywnych *C. sativa*. Podczas poszczególnych etapów badań specjalną uwagę zwrócono na efektywność tego procesu w zależności od stadiów rozwojowych nasion, warunków hodowli oraz temperatury. Biorąc pod uwagę, że enzymy LPLAT pełnią znaczącą rolę w syntezie fosfolipidów oraz wpływają na ich profil kwasów tłuszczowych w pracy podjęto również próbę scharakteryzowania właściwości biochemicznych enzymów o aktywności LPCAT, LPAAT oraz LPEAT obecnych w różnych tkankach roślinnych. Ponadto wykonana została szczegółowa charakterystyka izoenzymów CsLPEAT, których sekwencje zostały sklonowane i wprowadzone do systemu drożdżowego.

5.1. Profil acylolipidów obecnych w nasionach *Camelina sativa*

Znacząca część badań dotyczących profilu lipidowego nasion *C. sativa* przeprowadzona została w ramach mojej pracy magisterskiej. Otrzymane wówczas wyniki (które przedstawiono również w niniejszej pracy) wykazały, że lipidy zapasowe w nasionach lnicznika są głównie magazynowe pomiędzy 17, a 31 dniem od zakwitnięcia (DAF). Wyniki te wyraźnie korelowały z wynikami otrzymanymi przez inny zespół naukowców, który wykazał, że między 14 – 17 DAF występuje „faza wzrostu” skupiająca się na powieleniu liczby komórek znajdujących się w nasionach, natomiast dopiero po tym stadium następuje „faza akumulacji” (Rodriguez-Rodriguez i in., 2013). Lipidy dojrzałych nasion *C. sativa* zawierały około 87% nienasyconych kwasów tłuszczowych, z czego zawartość kwasu linolenowego (18:3) stanowiła około 37%, kwasu linolowego (18:2) około 18%, kwasu gondolowego (20:1) około 13%, kwasu oleinowego (18:1) około 12%, a zawartość kwasu erukowego (22:1) około 3%. Pozostałe z tych kwasów należały do kategorii „inne”. Natomiast całkowita zawartość wszystkich nasyconych kwasów tłuszczowych wyniosła około 13%, z czego kwas palmitynowy (16:0) stanowił około 6,5%, a kwas stearynowy (18:0) około 2,5 % wszystkich kwasów tłuszczowych.

Pozostałe z tych kwasów tłuszczowych należały do kategorii „inne”. Podobne badania zostały już uprzednio przeprowadzone, a otrzymane wówczas wyniki korelują z danymi przedstawionymi w obecnej pracy (Zubr, 1997; Rodriguez-Rodriguez i in., 2013; Marmon i in., 2017). W nasionach *C. sativa*, po 31 DAF odnotowano jedynie niewielkie zmiany w całkowitej zawartości acylolipidów. Jednakże równocześnie zauważalny był wzrost zawartości puli TAG (o około 3%). Ponadto, pomiędzy 31 DAF, a osiągnięciem dojrzałości przez nasiona lnicznika, zawartość 18:3 w puli TAG wzrosła, podczas gdy w puli lipidów polarnych (gdzie dominują fosfolipidy) znacząco się zmniejszyła, co dowodzić może że na tym etapie rozwoju nasion synteza TAG odbywa się głównie poprzez przebudowę puli acylolipidów. Całkowita zawartość lipidów polarnych nie zmieniła się jednak pomiędzy 31 DAF, a osiągnięciem przez nasiona dojrzałości. W tym czasie znacząco obniżyła się jednak zawartość wolnych kwasów tłuszczowych; z 4,2 do 1,4%. Z ich składu zniknęły praktycznie nienasycone kwasy tłuszczowe, a pozostały jedynie nasycone – 16:0 i 18:0. W puli lipidów polarnych odnotowano zaś znaczący wzrost 18:1. Mogłoby to wskazywać, że proces remodelowania fosfolipidów jest w tym czasie aktywny, a acylo-CoA może pochodzić głównie z przekształcania wolnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, ponieważ całkowita zawartość kwasów tłuszczowych w nasionach nie uległa w tym czasie znaczącym modyfikacjom.

Na podstawie zaobserwowanych zmian w zawartości oraz składzie acylolipidów w rozwijających się nasionach, okres największej akumulacji tych związków, czyli między 17, a 31 DAF, został podzielony na trzy stadia rozwojowe. Pierwsze z nich (stadium I) dotyczyło nasion z okresu 17-19 DAF, drugie (stadium II) okresu 24-26 DAF, a trzecie (stadium III) okresu 31-34 DAF. Dla każdego z tak wyznaczonych stadiów rozwojowych nasion możliwe było wypreparowanie zarodków z łupin nasiennych i wykorzystanie ich do izolacji frakcji mikrosomalnych. Pozyskane frakcje mikrosomalne zawierały między innymi membrany retikulum endoplazmatycznego, czyli kompartment komórkowy, z którym związane są enzymy o aktywności LPLAT.

5.2. Acylotransferazy acylo-CoA:lizofosfolipid występujące w nasionach *Camelina sativa*

Fosfolipidy nie tylko są składnikami budulcowymi membran biologicznych, ale również pośrednio uczestniczą w syntezie lipidów zapasowych. Szczególną rolę w tym procesie odgrywa fosfatydylocholina. Jest ona substratem wykorzystywanym podczas

reakcji desaturacji, czyli wprowadzania wiązań podwójnych w celu utworzenia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. Dodatkowo, fosfatydylocholina może być przekształcana do puli diacyloglicerolu lub być wykorzystana jako bezpośredni donor grup acylowych podczas syntezy triacylogliceroli w reakcji katalizowanej przez acylotransferazę fosfolipid:diacyloglicerol (PDAT). Enzym ten może także wykorzystywać jak substrat kolejny z fosfolipidów - fosfatydyloetanolaminę. Również istotnym fosfolipidem w biosyntezie lipidów zapasowych, a także membranowych, jest kwas fosfatydowy będący bezpośrednim substratem do syntezy diacyloglicerolu, czyli głównego substratu obu szlaków biosyntezy TAG. Lipidy zapasowe są magazynowane głównie w nasionach roślin oleistych m.in. takich jak badany lnicznik pospolity. W związku z tym pierwsza część badań przeprowadzana w ramach niniejszej pracy doktorskiej skupiała się na analizie różnych enzymów LPLAT występujących w nasionach lnicznika.

Wstępne badania z wykorzystaniem uzyskanych frakcji mikrosomalnych potwierdziły występowanie w nasionach *C. sativa* enzymów LPLAT o aktywności: LPCAT, LPAAT oraz LPEAT, podanych w kolejności od najbardziej aktywnego. Również aktywność tego samego typu acylotransferaz odnotowano w tkankach wegetatywnych, które zostaną poddane rozważaniom w dalszej części dyskusji. Obecności enzymów o aktywności LPSAT, odpowiedzialnych za syntezę fosfatydyloseryny nie udało się potwierdzić. Zdolność do produkcji PS po dodaniu do reakcji substratu w postaci *sn*-1-18-LPS odnotowano wyłącznie dla frakcji mikrosomalnej pochodzącej z liści *in vitro* oraz II stadium rozwojowego nasion, jednakże, ilość syntetyzowanego *de novo* PS była zbyt mała, aby poddać ten enzym dalszym badaniom. Ponadto dotychczas nie udowodniono istnienia enzymu o aktywności LPSAT w komórkach roślinnych. Co więcej, pula syntetyzowanego *de novo* tego fosfolipidu mogła powstać również w wyniku aktywności innych enzymów LPLAT, ponieważ w pewnym stopniu mogą one syntetyzować inne fosfolipidy niż te, których synteza należy do ich dominujących właściwości i na podstawie, której nadana została im nazwa (Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2016).

Dalsza część badań skupiała się wyłącznie na trzech wybranych enzymach LPLAT. LPCATach odpowiedzialnych za syntezę [¹⁴C]PC przy wykorzystaniu LPC oraz [¹⁴C]acylo-CoA, LPAATach zaangażowanych w syntezę [¹⁴C]PA przy użyciu jako substratów LPA oraz [¹⁴C]acylo-CoA oraz LPEATach, które analogicznie katalizowały reakcję produkcji [¹⁴C]PE w obecności LPE oraz [¹⁴C]acylo-CoA. Jak już wspomniano wcześniej poszczególne lizofosfolipidy mogą być wykorzystywane przez różne enzymy

LPLAT z odmienną efektywnością (Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2016), szczególnie gdy do reakcji wykorzystywana jest mieszanina różnych enzymów, jaką jest frakcja mikrosomalna. W związku z tym niemożliwe jest dokładne oznaczenie w jakim stopniu za syntezę określonych fosfolipidów odpowiadają poszczególne acylotransferazy. Niemniej jednak na potrzeby pracy nazwy badanych enzymów LPLAT zostały przyjęte zgodnie z ustaloną nomenklaturą, a więc w zależności od największej preferencji w stosunku do odpowiedniego lizofosfolipidu jaką we wstępnych badaniach wykazał każdy z nich, czyli LPCAT, LPAAT oraz LPEAT. Warto jednak zaznaczyć, że przeprowadzone dalej badania wykazały odmienne właściwości biochemiczne, różnice w aktywności oraz specyficzności substratowej tych enzymów, co wskazuje na fakt, że badane LPLATy należą do różnych typów i najprawdopodobniej odpowiadają za dominującą rolę w syntezie odpowiednio PC, PA oraz PE. Co więcej, podczas analiz biochemicznych wykonanych dla frakcji mikrosomalnych uzyskanych z tkanek hodowany w warunkach *in vivo* nie odnotowano żadnych ubocznych produktów bądź ich ilość była na skraju poziomu detekcji.

5.3. Odmienne właściwości biochemiczne poszczególnych enzymów LPLAT obecnych w nasionach *Camelina sativa*

Wszystkie trzy typy enzymów LPLAT obecne w nasionach *C. sativa* poddane zostały analizie mającej na celu charakterystykę ich biochemicznych właściwości. Dla każdego z nich odnotowano najwyższą aktywność w temperaturze 30 °C. Jednakże każdy z enzymów reagował w inny sposób na zmiany wartości testowanych temperatur. Szczególnie odporne okazały się być enzymy LPEAT, których aktywność w zakresie 20-40 °C nie ulegała znaczącym różnicom. Z drugiej strony najbardziej wrażliwe na zmiany temperatury były enzymy LPAAT, których aktywność gwałtownie zmniejszała się już przy niewielkich zmianach oscylujących w granicach 5 °C. Podatność na zmiany temperatury enzymów LPCAT znajdowała się pomiędzy opisanymi powyżej przypadkami. Niewielkie odchylenia od temperatury optymalnej, prowadziły do znaczącego spadku aktywności enzymów LPCAT, jednakże jakiegokolwiek dalsze zmiany nie prowadziły już do drastycznej utraty aktywności. Wartości temperaturowe, które wybrano do charakterystyki enzymów LPLAT obejmowały przede wszystkim temperatury występujące w naturalnym środowisku tych roślin (10-40 °C), jak i temperatury z pogranicza ekstremum (50 oraz 60 °C). Otrzymane dane wskazują zatem,

że ze wszystkich badanych LPLATów, to enzymy LPAAT mogą wykazywać najsilniejszy efekt wpływający na przyrost netto zawartości acylolipidów w zależności od temperatury w jakiej hodowane są rośliny. Jednakże hipoteza ta wymaga dodatkowego poparcia eksperymentalnego.

Wyraźny wpływ na aktywność enzymów LPLAT znajdujących się w nasionach *C. sativa* miał również zastosowany bufor o określonym pH, który wykorzystany był do stworzenia środowiska reakcji enzymatycznej *in vitro*. Wszystkie z enzymów zachowywały się w dość podobny sposób, wykazując skrajnie niską aktywność w środowisku kwasowym o pH 6,0 i niższym. Zdecydowanie najefektywniej enzymy te operowały w pH obojętnym i zasadowym, oscylującym w granicach pH 7,0-11,0. W tym przedziale każdy z enzymów wykazywał swój indywidualny wzór aktywności zależny od konkretnych parametrów buforu. LPCATy były najaktywniejsze w pH o zakresie 7,0-11,0, gdzie ich zdolność do syntezy PC utrzymywała się na stosunkowo stabilnym poziomie. LPAATy preferowały pH o zakresie 7,5-9,0, natomiast LPEATy pH 9,0-10,0. Poprzednio, maksima aktywności tych enzymów obecnych w innych organizmach również wykryto w wysokim pH. Dla LPAATów obecnych w nasionach krokosza (*C. tinctorius*) odnotowano optimum aktywności w pH o zakresie 8,0-10,0, podczas gdy dla rzepaku (*B. napus*) były to wartości nawet powyżej pH 10,0 (Ichihara i in., 1987; Oo i Huang, 1989). W przypadku enzymów LPCAT, maksimum aktywności w wysokich pH odnotowano dla tych enzymów obecnych w komórkach płuc myszy (Nakanishi i in., 2006). Poprzednie badania przeprowadzone przez Stålberg i in. (2009) wykazały, że enzym LPEAT1 pochodzący z *A. thaliana* również charakteryzuje się wzrostem aktywności równoległe z rosnącą wartością pH buforu wykorzystanego do badań. Odnotowane wartości pH, w których enzymy LPLAT wykazują maksima swojej aktywności są znacznie szersze niż zakres pH, który jest charakterystyczny dla kompartmentów komórek roślinnych, w których enzymy te występują. Najprawdopodobniej w obrębie cytoplazmy oraz retikulum endoplazmatycznego pH oscyluje w granicach 7,1-7,3. W związku z tym w testach enzymatycznych *in vitro* badających aktywność oraz specyficzność substratową enzymów LPLAT, obecnych w nasionach *C. sativa*, zastosowany został bufor fosforanowy o pH 7,2. Niemniej jednak, w niektórych strukturach komórkowych pH odbiega od pH cytozolu i ER. Przede wszystkim celem przetestowania tak szerokiego zakresu pH środowiska reakcji miało istotnie znaczenie dla scharakteryzowania biochemicznych właściwości badanych

enzymów LPLAT, które okazały się być podobne do właściwości biochemicznych enzymów LPLAT obecnych w innych organizmach eukariotycznych.

Niektóre z roślinnych enzymów wykazujących właściwości acylotransferaz wymagają do swojej aktywności obecności jonów, głównie jonów dwuwartościowych magnezu. W związku z tym w ramach badań zweryfikowany został efekt obecności jonów magnezu, wapnia oraz potasu w różnych stężeniach na aktywność każdego z badanych enzymów LPLAT, obecnego w nasionach *C. sativa*. Zakres testowanych stężeń jonów obejmował dla magnezu oraz wapnia stężenie od 0,05 do 2 mM, natomiast dla potasu od 0,5 do 2 mM, co w większości przypadków odzwierciedlało zawartości występujące w naturalnym środowisku enzymów LPLAT, w związku z czym dane uzyskane na podstawie testów enzymatycznych *in vitro* mogą odzwierciedlać procesy zachodzące *in vivo*.

Otrzymane wyniki wykazały, że każdy z enzymów zachowuje się w odmienny sposób. Aktywność enzymów LPCAT była hamowana głównie przez jony Mg^{2+} oraz Ca^{2+} , jednakże ich inhibicja nie była skorelowana liniowo z badanym stężeniem. Odnotowany efekt sugeruje, że najprawdopodobniej odmiennie mechanizmy odpowiadają za hamowanie aktywności enzymów LPCAT w niskich oraz wysokich stężeniach tych jonów. Przy niskich stężeniach jonów magnezu i wapnia, można spekulować, że inhibicja jest efektem bezpośredniej modyfikacji konformacji enzymu lub stężeniem będącym punktem wysycenia enzymu. W tym przypadku dalszy wzrost stężenia jonów nie mógłby już wpływać na aktywność enzymatyczną, w związku z czym obserwowalny dalszy spadek aktywności LPCAT może być spowodowany wpływem tych jonów na inne etapy reakcji katalizowanej przez ten enzym. Dotychczas wykazano już, że jony Mg^{2+} w stężeniach około 5 mM prowadzą do zmniejszania rozpuszczalności acylo-CoA, który jest podstawowym substratem reakcji katalizowanych przez LPLATy (Constantinides and Steim, 1986). W komórkach całkowite stężenie jonów Mg^{2+} waha się w granicach 15-25 mM, jednak znacząca jego ilość jest związana z innymi substancjami lub wbudowana w składniki komórkowe. Ostatecznie jedynie 0,4-0,5 mM stężenie jonów Mg^{2+} występuje w formie wolnej w cytozolu (Moomaw i Maquire, 2008; Karley i White, 2009; Maathuis, 2009). Wskazuje to, że stężenia Mg^{2+} występujące w komórkach mogą wpływać hamująco na aktywność tych enzymów. W przypadku jonów wapnia wykazano, że jego stężenie w cytozolu jest mniejsze niż 1 μ M, jednakże w niektórych kompartmentach komórkowych może wynosić nawet powyżej kilku mM (Hepler 2005; Bagur i Hajnóczy 2017). Ponadto należy wspomnieć, że w komórkach roślinnych

cząsteczki acylo-CoA są dodatkowo związane z białkami przenoszącymi grupy acylowe (ACBP), które również mogą wpływać na rozpuszczalność i dostępność tego substratu dla LPLATów (Yurchenko i in., 2009). Jak dotychczas podobny wpływ jonów wapnia i magnezu na enzymy LPCAT, jak odnotowany w niniejszej pracy, zaobserwowano dla tego typu enzymów obecnych w komórkach eukariotycznych pochodzących z gruczołów podżuchwowych oraz z serca szczura (Soupene i in., 2008).

Jony magnezu oraz wapnia również działały hamująco na aktywność enzymów LPEAT, jednakże w tym przypadku wszystkie z testowanych stężeń wpływały niemalże jednakowo na ich aktywność, co wskazywać by mogło, że już przy małych stężeniach możliwe jest wystąpienie wspomnianego efektu wysycenia enzymu. Dla tych samych enzymów, pochodzących z *A. thaliana* nie odnotowano żadnego wpływu jonów wapnia na ich aktywność, pomimo obecności domen wiążących wapń (Stålberg i in. 2009). Również w ramach tej pracy, dla enzymów LPEAT obecnych w *C. sativa* wykryta została obecność tych domen. Jednakże ze względu na odnotowany efekt hamujący jony te nie były dodawane do środowiska reakcyjnego w dalszych eksperymentach.

Dla enzymów LPAAT, ponownie jak w przypadku poprzednio omawianych klas LPLATów, odnotowano hamujący wpływ jonów wapnia. Podobny wpływ jonów wapnia odnotowano poprzednio dla tego typu enzymów obecnych we frakcjach mikrosomalnych z kukurydzy, palmy kokosowej oraz rzepaku (Oo i Huang, 1989). Całkowicie odwrotny trend odnotowano dla jonów magnezu, które okazały się mieć stymulujący wpływ na wydajność reakcji katalizowanej przez LPAATy. Stymulujący wpływ jonów magnezu na aktywność LPAATów zaobserwowano poprzednio dla tego typu enzymów pochodzących z *Brassica napus*, *Cocos nucifera*, *Limnanthes alba*, *Syagrus cocoides* oraz *Zea mays* (Oo i Huang 1989; Cao i in., 1990; Davies i in., 1995).

Dodatek jonów potasu do mieszaniny reakcyjnej działał hamująco na każdy z badanych enzymów. Stężenie tych jonów w komórkach roślinny jest niezwykle wysokie i w cytozolu sięga nawet 200 mM (Blumwald i in., 2000), a zatem może mieć ono znaczący wpływ na aktywność tych acylotransferaz występujących w swoim naturalnym środowisku. Dotychczas wpływ tych jonów został przetestowany wyłącznie dla enzymów LPCAT pochodzących z *Phaeodactylum tricornutum*, na aktywność których działały one również w sposób hamujący (Połośńska i in., 2021).

Acyłacja, czyli proces dołączania grupy acylowej do lizofosfolipidów, w reakcji typu *forward* katalizowanej przez LPLATy może teoretycznie zachodzić w obu pozycjach szkieletu glicerolowego LPL: zarówno w pozycji *sn*-1, jak i *sn*-2. Niemniej jednak

badania przeprowadzone przez Lager i in. (2013) wykazały, że enzymy LPCAT (pochodzące z *A. thaliana*) przeprowadzają ten proces w pozycji *sn-2* ponad 9-razy efektywniej niż w pozycji *sn-1*. Taką preferencję potwierdzono również w niniejszej pracy dla enzymów LPCAT obecnych w nasionach *C. sativa*. Enzymy te ponad 8-krotnie efektywniej katalizowały reakcję acylacji pozycji *sn-2* w obecności 18-węglowych nienasyconych acylo-CoA oraz prawie 2-krotnie efektywniej w przypadku wykorzystania 16:0-CoA. Należy jednak mieć na uwadze, że grupy acylowe mogą być przyłączane przez enzymy LPLAT zarówno w pozycji *sn-2*, jak i *sn-1*, a w komórkach mogą znajdować się zarówno lizofosfolipidy z kwasami tłuszczowymi w pozycji *sn-1*, jak i *sn-2*. Obecność lipaz specyficznych zarówno dla pozycji *sn-1*, jak i *sn-2* fosfolipidów została w komórkach roślinnych wykryta (Chen i in., 2013). Proces remodelowania fosfolipidów może więc dotyczyć obu pozycji *sn*. Jak dotychczas nie wiadomo jednak, czy ten proces dotyczący pozycji *sn-1* fosfolipidów może być katalizowany przez enzymy typu LPLAT w wyniku reakcji typu *backward*.

5.4. Aktywność oraz specyficzność substratowa w reakcjach typu *forward* enzymów LPLAT obecnych w nasionach *Camelina sativa*

Kolejnym krokiem, który podjęto w ramach przeprowadzanych badań było zweryfikowanie specyficzności substratowej oraz aktywności wybranych enzymów LPLAT w reakcjach typu *forward*, przy zastosowaniu zoptymalizowanych parametrów dla reakcji enzymatycznych. Enzymy LPCAT obecne we frakcjach mikrosomalnych nasion *C. sativa* ze wszystkich trzech testowanych stadiów ich rozwoju, wykazywały w reakcjach typu *forward* najwyższą aktywność spośród badanych LPLATów. Ponadto wykazywały wyraźną preferencję w stosunku do acylo-CoA z 18-węglowymi nienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Podobną specyficzność substratową odnotowano również dla enzymów LPCAT z *A. thaliana*, *L. fendleri*, *C. tinctorius*, *R. communis*, *H. benghalensis* oraz *L. usitatissimum* (Lager i in., 2013; Pan i in., 2015). Wydaje się zatem, że enzymy LPCAT występujące w roślinach oleistych wykazują zbieżną preferencję substratową w stosunku do acylo-CoA, przy czym nie wykazują dyskryminacji między wielonienasyconymi, a mononienasyconymi 18-węglowymi acylo-CoA, które ulegają procesowi desaturacji znajdując się w strukturze PC.

Dotychczas enzymy LPAAT uczestniczące bezpośrednio w szlaku Kennedy'ego zostały najlepiej scharakteryzowane pod kątem ich biochemicznych właściwości.

Na podstawie tych badań wykazano, że cechują się one największą różnorodnością pod względem preferencji w stosunku do różnych acylo-CoA w zależności od gatunku rośliny, w której występują (Oo i Huang 1989; Laurent i Huang, 1992; Lassner i in. 1995; Arroyo-Caro i in. 2013; Fahs i in. 2019). W przeprowadzonych badaniach wykazane zostało, że enzymy te obecne w nasionach *C. sativa* są zdolne do wykorzystywania różnych acylo-CoA, jednak szczególnie wysoką wydajność reakcji wykazują w obecności nienasyconych 18-węglowych acylo-CoA (głównie 18:1-CoA) oraz 16:0-CoA.

Aż do tej pory, jedynymi scharakteryzowanymi enzymami o aktywności LPEAT były te pochodzące z *A. thaliana*. Wykazywały one wysoką preferencję w stosunku do 16:0-CoA oraz nienasyconych 18-węglowych acylo-CoA (Stålberg i in. 2009). Uzyskane wówczas wyniki w pewnym stopniu odzwierciedlają preferencję enzymów LPEAT obecnych w nasionach *C. sativa*, z tym wyjątkiem, że LPEATy obecne we frakcjach mikrosomalnych z nasion *C. sativa* wykazują niższe preferencje w stosunku do 16:0-CoA. Niemniej jednak w badaniach z wykorzystaniem systemu drożdżowego (szczegółowo opisanych w dalszej części dyskusji) LPEATy z *C. sativa* wykazywały stosunkowo wysoką preferencję w stosunku do 16:0-CoA tak jak to zostało zaobserwowane przez Stålberg i in. (2009).

Na podstawie zaobserwowanych preferencji substratowych wykonane zostały dodatkowe testy mające na celu weryfikację tych właściwości. W naturalnych warunkach cząsteczki acylo-CoA nim zostaną wykorzystane przez enzymy LPLAT są związane z białkami wiążącymi acylo-CoA. Jak już wspomniano poprzednio może to wpływać na efektywność ich wykorzystania w warunkach *in vivo*. W testach enzymatycznych *in vitro* białka ACBP mogą być zastąpione dodatkiem BSA, który oddziałuje z acylo-CoA w taki sam sposób jak ACBP (Stymne i Stobart, 1984; Engeseth i in. 1996). Drugi z wymienionych zespołów naukowców wykazał, że w komórkach *A. thaliana* stężenie tego białka oscyluje w granicach 3-143 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy. W ramach obecnej pracy przeprowadzone zostały dwa rodzaje eksperymentów, w których wykorzystano równomolowe ilości wybranych acylo-CoA. Pierwszy typ reakcji był prowadzony bez dodatku BSA, podczas gdy do drugiego typu reakcji dodawano BSA o stężeniu 2 mg/ml, które było stężeniem nawet wyższym niż stężenie ACBP w komórkach roślinnych.

W obu typach reakcji wszystkie z testowanych acylotransferaz wykazywały najwyższą aktywność w stosunku do acylo-CoA z 18-węglowymi, nienasyconymi kwasami tłuszczowymi; były jednak między nimi pewne różnice. LPAATy wykazywały

najwyższą aktywność w stosunku do 18:1-CoA, natomiast dwa pozostałe enzymy względem 18:2-CoA, co korelowało z ich preferencjami zaobserwowanymi w testach z wykorzystaniem pojedynczych acylo-CoA. Dla enzymów LPCAT zaobserwowano również porównywalne, do uzyskanych w testach z pojedynczymi acylo-CoA, preferencje w stosunku do 16:0-CoA. Natomiast dla LPAATów oraz LPEATów w testach selektywności, zarówno z dodatkiem, jak i bez BSA, odnotowano niższe preferencje tych enzymów w stosunku do 16:0-CoA niż w testach z pojedynczymi acylo-CoA. Niemniej jednak dla LPEATów nie odnotowano znaczących różnic w preferencji do tego donora pomiędzy testami z dodatkiem i bez dodatku BSA. Zatem preferencja LPEATów w stosunku do 16:0-CoA w testach selektywności jest najprawdopodobniej nie tylko efektem dostępności acylo-CoA (wówczas, gdy jest związany z BSA), ale również wynika z indywidualnych właściwości badanych enzymów.

Zbieżne wyniki dotyczące specyficzności substratowej, które odnotowano dla wszystkich enzymów LPLAT w testach *in vitro* wykorzystujących pojedyncze acylo-CoA, jak i testach wykorzystujących mieszaninę tych substratów bez lub z dodatkiem BSA wskazują, że najprawdopodobniej tożsame właściwości tych enzymów będą odzwierciedlane w warunkach *in vivo*.

Wyniki te również wskazują, że rodzaj kwasów tłuszczowych przyłączanych do lizofosfolipidów w reakcjach katalizowanych przez LPLATy będzie ściśle związany z dostępnością donorów grup acylowych. Badania dotyczące profilu puli acylo-CoA występujących w nasionach *C. sativa* wykazały, że spośród wykorzystanych w omawianych badaniach acylo-CoA, dominuje w tej puli 18:1-CoA, a następnie 16:0-CoA > 18:3-CoA > 18:0-CoA > 18:2-CoA (Ruiz-Lopez i in., 2016). Powyższe wyniki oraz dane dotyczące specyficzności substratowej LPLATów nasion *C. sativa*, sugerowałyby więc, że do puli PC (w wyniku remodelowania) głównie włączany będzie kwas oleinowy, który kolejno może być przekształcany do kwasów wielonienasyconych, które stanowią dominującą pulę kwasów tłuszczowych występujących w PC. Idąc tym tokiem rozumowania, w przypadku puli PA oraz PE, dla których dotychczas nie wykazano, aby były wykorzystywane w procesie desaturacji, powinna dominować zawartość kwasu oleinowego. Niemniej jednak kwas ten stanowi zaledwie około 10% kwasów tłuszczowych występujących w puli PA oraz średnio około 15% w puli PE, w związku z czym inne mechanizmy muszą być odpowiedzialne za skład kwasów tłuszczowych tych lipidów. Niska zawartość tego kwasu tłuszczowego w puli PA, mogłaby być spowodowana np. szybszym przekształcaniem PA zawierającym jedną lub

dwie cząsteczki kwasu oleinowego do diacyloglicerolu w porównaniu z PA zawierającym wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Tego typu cząsteczki DAG mogłyby być włączane do puli PC, gdzie kwasy te ulegałyby dalszemu procesowi desaturacji lub były wykorzystywane bezpośrednio do syntezy triacylogliceroli. Lager i in. (2020) wykazali np., że enzymy DGAT1 obecne w nasionach *C. sativa* wykazują wysoką specyficzność względem puli DAG posiadającej dwa kwasy oleinowe. Jak dotychczas brak jest jednak danych czy fosfataza kwasu fosfatydowego posiada takie właściwości. Niską zawartość 18:1 w PE można by zaś tłumaczyć stosunkowo niską intensywnością remodelowania tego fosfolipidu. Tak więc, o składzie kwasów tłuszczowych PE decydowałby głównie skład kwasów tłuszczowych cząsteczek DAG wykorzystywanych do syntezy tego lipidu w szlaku Kenedy'ego.

Oprócz wyższej preferencji enzymów LPAAT oraz LPEAT w stosunku do 16:0-CoA, w porównaniu do LPCATów oba te enzymy wykazywały również stosunkowo wysoką zdolność do wykorzystywania kwasu kaprynowego, laurynowego oraz mirystynowego związanego z koenzymem A. Obecność tych kwasów tłuszczowych nie została jednak wykazana ani w żadnej z tkanek *C. sativa*, ani w puli acylo-CoA jej nasion (Ruiz-Lopez i in., 2016). Jednak właściwość ta efektywnie mogłaby zostać wykorzystana przy próbie wytworzenia przy pomocy technik inżynierii genetycznej odmian *C. sativa* posiadających te kwasy tłuszczowe w puli lipidów zapasowych.

5.5. Efektywność remodelowania poszczególnych puli fosfolipidów obecnych w nasionach *Camelina sativa*, a udział enzymów LPLAT w tym procesie

Na szczególną uwagę zasługują badania skupiające się na reakcjach typu *backward* analizowanych enzymów oraz określeniu ich udziału w remodelowaniu poszczególnych fosfolipidów oraz puli acylo-CoA. Przeprowadzone badania oraz kalkulacje dotyczące efektywności remodelowania obu puli, a także czasu trwania tego procesu zostały wykonane po raz pierwszy. Poprzez oznaczenie aktywności poszczególnych enzymów w jednym nasieniu *C. sativa* na danym stadium rozwojowym oraz określenie zawartości danego fosfolipidu w całym nasieniu możliwe było obliczenie ilości kwasów tłuszczowych, które mogą być przenoszone z puli fosfolipidu do puli acylo-CoA w czasie pomiędzy danymi stadiami rozwojowymi.

Uzyskane na tej podstawie dane wykazały, że enzymy LPCAT obecne w rozwijających się nasionach *C. sativa* wykazują potencjał do przeniesienia prawie

wszystkich wieloniensyconych kwasów tłuszczowych, których synteza zachodzi w puli PC, a które stanowią około 55% wszystkich kwasów tłuszczowych dojrzałych nasion. Wyniki wyraźnie wykazały, że enzymy LPCAT mogą być jednymi z ważniejszych, bądź nawet głównymi enzymami odpowiedzialnymi za proces wzbogacania cytoplazmatycznej puli acylo-CoA, która może być kolejno wykorzystywana przez innego typu acylotransferazy uczestniczące w biosyntezie TAG lub procesie remodelowania lipidów. Dla LPAATów odnotowana zdolność do transferu kwasów tłuszczowych pomiędzy tymi pulami była wyraźnie słabsza. Jednakże, mimo że pula PA stanowi niewielką frakcję wszystkich lipidów polarnych to jej udział w suplementację cytozolowej puli acylo-CoA za pośrednictwem reakcji *backward* LPAATów okazał się być stosunkowo wysoki, a proces remodelowania tej puli zachodził najszybciej. Obliczenia wykazały, że nawet około 5% kwasów tłuszczowych, które znajdują się w dojrzałych nasionach *C. sativa* wprawdzie było włączane do puli PA, a następnie przenoszone do puli acylo-CoA. Najwolniej zaś przebiegała edycja grup acylowych znajdujących się w puli PE, a jej udział w suplementacji puli acylo-CoA w wyniku działania enzymów LPEAT również okazał się być najmniej efektywny. Zaledwie 2% kwasów tłuszczowych obecnych w acylolipidach dojrzałych nasion *C. sativa* mogło pochodzić z puli PE, która *de facto* stanowiła ponad 25% wszystkich lipidów polarnych.

Należy mieć jednak na uwadze, że określony potencjał każdego z enzymów LPLAT w remodelowaniu poszczególnych fosfolipidów nie wyklucza udziału w tym procesie innych enzymów takich jak PDAT, czy fosfolipaza A₂.

Reakcje typu *backward* przeprowadzane przez enzymy LPCAT oraz LPAAT *in vitro* przebiegały z najmniejszą intensywnością, gdy w środowisku reakcji znajdował się 18:3-CoA w porównaniu do tych reakcji przebiegających w obecności 18:1-CoA i w niektórych stadiach rozwojowych nasion również 18:2-CoA. Różnice te były często większe niż w wykorzystywaniu tych acylo-CoA w reakcjach typu *forward* przeprowadzanych przez omawiane enzymy. Można więc przypuszczać, że acylo-CoA obecne w środowisku reakcji mogą w różny sposób wpływać na aktywność typu *backward* tych enzymów. Jak dotychczas brak jest jednak danych literaturowych na ten temat, jednakże badania wstępne (jeszcze nie opublikowane) prowadzone w Zakładzie Biochemii Roślin MWB UG i GUMed (w którym praca ta powstała) sugerują istnienie takiej możliwości. W przypadku LPCATów miałyby to głęboki sens fizjologiczny. W puli acylo-CoA nasion *C. sativa* dominuje 18:1-CoA (Ruiz-Lopez i in., 2016). Aby uległ on procesowi desaturacji musi najpierw być włączony do puli PC. Stymulacja przez

ten acylo-CoA reakcji typu *backward* prowadziłyby więc do powstania zwiększonej puli LPC, do której w reakcji typu *forward* mogłyby być dołączane kwasy tłuszczowe z acylo-CoA występujących w największej ilości, czyli głównie z 18:1-CoA. W przypadku puli PA oraz LPAATów znaczenie fizjologiczne takiego wpływu 18:1-CoA nie jest już tak oczywiste zakładając, że pula PA nie jest miejscem desaturacji kwasów tłuszczowych, a zarazem PA stanowi zbyt małą frakcję lipidową, aby kwas ten miał znaczący wpływ na płynność błony. Mimo to kwas fosfatydowy stanowi główny substrat dla fosfatazy kwasu fosfatydowego katalizującej reakcję syntezy puli DAG. Pula ta jest między innymi wykorzystywana do syntezy PC, przez enzym PDCT, który nie wykazuje dyskryminacji w stosunku do składu DAG (Demski i in., 2021). Kolejno po powstaniu PC może następować desaturacja tych kwasów tłuszczowych. Tak więc byłby to mechanizm dostarczania 18:1 z puli PA do puli PC.

5.6. Wpływ warunków hodowli *in vivo* oraz *in vitro* na metabolizm lipidów oraz profil acylolipidów obecnych w liściach *Camelina sativa*

Do tej pory przeważająca część badań opisanych w literaturze, skupiała się na charakterystyce acylolipidów występujących w tkankach *A. thaliana*. W związku z wybranym modelem roślinnym do badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy jakim była *C. sativa*, poza określeniem jej profilu lipidowego w nasionach, który został omówiony na początku tego rozdziału, w ramach obecnej pracy wykonane zostały również analizy charakteryzujące acylolipidy obecne w liściach tej rośliny. W tym celu rośliny były hodowane zarówno w warunkach *in vivo* – odzwierciedlających warunki naturalne, jak i *in vitro*. Obecnie metody hodowli roślin *in vitro* są powszechnie wykorzystywane zarówno w przemyśle/rolnictwie, jak i w badaniach naukowych. Część z wyników tych badań bezpośrednio jest odnoszona do sytuacji z warunków *in vivo*, mimo, że jak dotychczas brak jest danych porównawczych na temat metabolizmu lipidów w obu warunkach hodowli. Na podstawie przeprowadzonych w ramach tej pracy badań okazuje się, że procesy metaboliczne, a co za tym idzie i profil lipidowy roślin hodowanych w obu tych warunkach są rozbieżne. Dowodzi to, że wyniki otrzymane dla tkanek roślinnych z jednego typu hodowli nie mogą być w sposób bezkrytyczny implementowane do drugiego/innego systemu hodowli.

Skład acylolipidów liści *C. sativa* był dość zbliżony do profilu lipidowego liści *A. thaliana*, gdy porównywano rośliny obu gatunków z hodowli w warunkach *in vivo* (Miquel i Browse, 1992; Falcone i in., 2004; Li-Beisson i in., 2013 oraz dane uzyskane

w ramach niniejszej pracy) oraz gdy te porównania dla obu gatunków dotyczyły warunków *in vitro* (Demski i in., 2020 oraz niniejsza praca). W przypadku zawartości i kompozycji poszczególnych klas lipidowych, dla większości z nich odnotowane różnice były niewielkie i najprawdopodobniej wynikały po części z różnic gatunkowych i drobnych różnic w warunkach hodowli. Różnice te zaobserwowano szczególnie, w składzie kwasów tłuszczowych puli PC oraz PE, które charakteryzowały się dominującą zawartością 18:3 w liściach *C. sativa*, podczas gdy w *A. thaliana* dominował 18:2 (Miquel i Browse, 1992). Istotne różnice odnotowano także w składzie kwasów tłuszczowych DGDG. W liściach *C. sativa* znaczący udział w składzie tych kwasów tłuszczowych stanowił kwas palmitynowy (16:0) oraz oleinowy (18:1), podczas gdy w liściach *A. thaliana* zdecydowanie dominował kwas linolenowy (18:3); (Miquel i Browse, 1992).

Dostępne dane literaturowe nie pozwalają jednak na porównanie z innymi badaniami otrzymanych wyników dotyczących profili lipidowych liści z warunków *in vitro* i *in vivo*. Niewątpliwie najbardziej znaczącą rozbieżnością, którą odnotowano dla profilu lipidowego liści roślin hodowanych w tych dwóch różnych warunkach była zawartość kwasów trójnienasyconych (trienowych). Względna zawartość tych kwasów tłuszczowych w całkowitej puli acylolipidów liści hodowanych *in vivo* stanowiła około 72%, podczas gdy w liściach hodowanych *in vitro* było ich ponad 20% mniej. Różnice te, przechodząc na poziom poszczególnych klas lipidów, były szczególnie widoczne w PC oraz PA oraz w nieco mniejszym stopniu w składzie kwasów tłuszczowych obu galaktolipidów. Również istotnym jest fakt, że względna zawartości puli MGDG oraz DGDG była wyraźnie mniejsza w liściach hodowanych *in vitro*. Kwasy trienowe odgrywają niezwykle ważną rolę w zachowaniu płynności membran błon biologicznych oraz w adaptacji roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych, głównie wywołanych zmianami temperatury. Są ponadto cząsteczkami sygnałowymi podczas stresu oraz stanowią znaczącą część puli TAG, będącej głównym źródłem węgla, czyli energii zapasowej (Murakami i in., 2000; Yaeno i in., 2004; Wang i in., 2018). Obniżona zawartość tego typu kwasów tłuszczowych w lipidach liści z warunkach *in vitro* mogłaby sugerować, że w tych warunkach następuje pewne „uszczywnienie” błon komórkowych w porównaniu do warunków *in vivo*, jednak jak dotychczas trudno jest określić jakie to mogłoby mieć znaczenie fizjologiczne dla roślin hodowanych w tego typu warunkach. Również sam mechanizm prowadzący do zmniejszenia zawartości kwasów trienowych w warunkach *in vitro* nie jest jak dotychczas poznany. Ostatnio, grupa naukowców

z Japonii, wykazała, że kwas 18:3 jest odłączany z plastydowej puli MGDG za pośrednictwem lipazy HIL1 w warunkach stresowych (wywołanych wyższą temperaturą), a następnie jest on efektywnie włączany do puli TAG (Higashi i in., 2018). Można przypuszczać, że podobny efekt mogą wywoływać również warunki *in vitro*. Pula MGDG liści *C. sativa* z tych warunków hodowli charakteryzowała się bowiem spadkiem zawartości 18:3 w porównaniu do warunków *in vivo*, podczas gdy zawartość tego kwasu tłuszczowego znacząco wzrastała w puli lipidów obojętnych, których zawartość również istotnie zwiększyła się w warunkach *in vitro* (wzrost względnej zawartości o około 15% tj. do ponad 20% wszystkich klas lipidów). Idąc dalej tym tropem myślenia należałoby założyć, że warunki *in vitro* stanowią dla roślin warunki stresowe a uruchamiające się w odpowiedzi na ten stres mechanizmy obronne są podobne do tych które uruchamiają się w odpowiedzi na stres temperaturowy. Z drugiej strony, zwiększona zdolność do syntezy lipidów obojętnych (w skład których wchodzi triacyloglicerole) może być skutkiem przestawienia metabolizmu odżywiania z fotoautotroficznego w kierunku chemoheterotroficznego, ponieważ wszystkie substancje mineralne oraz źródło węgla w postaci sacharozy znajdują się bezpośrednio w pożywce. Takie warunki mogą wpływać na częściową zmianę funkcji tkanek liściowych z tkanek odpowiedzialnych za przeprowadzanie procesu fotosyntezy na tkanki zdolne do akumulacji lipidów. Dane literaturowe wskazują, że w przypadku roślin o zredukowanej zawartości puli MGDG dochodzi do zmniejszenia zawartości chloroplastów, upośledzenia procesu fotosyntezy oraz efektywności fotoautotroficznego wzrostu roślin (Kobayashi i in., 2007; Hölzl i in., 2009; Basnet i in., 2019). Dane te nie odpowiadają jednak na pytanie dotyczące mechanizmu prowadzącego do zmniejszenia puli MGDG w liściach *in vitro* oraz zawartości 18:3 w składzie jego kwasów tłuszczowych.

Biorąc pod uwagę wyraźny spadek względnej i bezwzględnej zawartości galaktolipidów, wzrost względnej zawartości fosfolipidów, szczególnie takich, jak PC oraz PE oraz redukcję zawartości kwasów trienowych zarówno kwasu heksadekatrienowego, jak i linolenowego można przypuszczać, że warunki hodowli *in vitro* dyskrzynują szlak prokariotyczny syntezy lipidów membranowych. Zmieniona proporcja udziału szlaku prokariotycznego oraz eukariotycznego biosyntezy glicerolipidów jest uznawana za jeden ze sposobów adaptacji do zmian temperaturowych (Yu i in., 2021). Tożsame zmiany dotyczące faworyzowania szlaku zachodzącego w ER (eukariotycznego) zostały już scharakteryzowane dla roślin poddanych stresowi wysokiej temperatury (Li in., 2015). Dane te ponownie wskazują, że hodowla w warunkach *in vitro*

może mieć podobny wpływ, jak i wysoka temperatura na profil oraz metabolizm lipidowy roślin. Niemniej jednak wszystkie wskazane powyżej procesy nie wykluczają się i mogą zachodzić równolegle, co wymaga dalszego potwierdzenia eksperymentalnego.

Ze względu na fakt, że znaczna część różnic dostrzeżonych w profilu acylolipidów liści pochodzących z warunków *in vivo* oraz *in vitro* dotyczyła fosfolipidów, kolejnym krokiem badań było scharakteryzowanie LPLATów – enzymów związanych z procesem ich biosyntezy oraz remodelowania. Biorąc pod uwagę wartości bezwzględnej aktywności enzymów LPLAT, to enzymy te obecne w liściach hodowanych *in vitro* wykazywały, co najmniej 2-krotnie wyższą aktywność niż te z liści hodowanych *in vivo*. Zaobserwowany efekt może być wynikiem kilku możliwości: (1) zwiększonej ekspresji genów kodujących badane enzymy w liściach hodowanych *in vitro*, (2) aktywność enzymów LPLAT może być wzmacniana poprzez modyfikacje potranslacyjne lub (3) większa aktywność może być spowodowana niższym katabolizmem i wolniejszą utratą przez nie aktywności. W przypadku enzymów LPEAT hipoteza dotycząca zwiększonej ekspresji genów kodujących te enzymy została wykluczona w ramach niniejszej pracy, ponieważ ekspresja genów w materiale pochodzącym z obu wariantów hodowli była porównywalna. Fizjologiczne znaczenie wzmożonej aktywności enzymów LPLAT może wiązać się ze zwiększoną intensywnością procesu remodelowania puli fosfolipidów w warunkach hodowli *in vitro*. Poprzednie argumenty wskazują, że rośliny hodowane w warunkach *in vitro* zachowują się pod względem modyfikacji profilu lipidowego jak rośliny stresowane, w związku z czym możliwym jest, że zwiększona aktywność enzymów LPCAT oraz LPEAT w tych warunkach jest niezbędna do efektywnego dostosowania składu kwasów tłuszczowych błon lipidowych do otaczających warunków, bądź w przypadku enzymów LPCAT oraz LPAAT dostarczenia substratów do produkcji lipidów zapasowych (składających się na rosnącą pulę lipidów obojętnych). Odnotowane specyficzności substratowe w reakcjach typu *forward* są rozbieżne dla enzymów pochodzących z testowanych warunków hodowli. Efekt ten najprawdopodobniej jej wywołany, wykazaną oraz opisaną dalej możliwością występowania różnych wariantów izoenzymów LPLAT. W reakcjach typu *backward* żaden z zastosowanych donorów grup acylowych nie był dyskryminowany, niemniej jednak najefektywniej reakcje tego typu przebiegały w obecności 18:1-CoA, a słabiej w obecności 18:2-CoA oraz 18:3-CoA. Podobny wpływ testowanych acylo-CoA na reakcje typu *backward* wykazano poprzednio w testach badających intensywność tego typu reakcji przeprowadzanych przez LPLATy obecne w nasionach lnicznika. Aktywność i specyficzność

poszczególnych enzymów LPLAT nie korelowała pomiędzy aktywnością typu *forward* i *backward*, jednakże badania przeprowadzone przez Jasieniecka-Gazarkiewicz i in. (2015) dowiodły już wówczas, że właściwości tych enzymów w obu typach reakcji mogą być zupełnie rozbieżne. W warunkach naturalnych najprawdopodobniej nie tylko specyficzność substratowa tych enzymów będzie decydowała o tym jakie kwasy tłuszczowe będą przyłączane przez nie do lizofosfolipidów, ale również, a może w głównej mierze, będzie na ten proces wpływała dostępna pula acylo-CoA. W odróżnieniu jednak od nasion *C. sativa* (wcześniejsza część dyskusji), profil puli acylo-CoA w liściach lnicznika nie zostały dotychczas przebadany przez żaden zespół naukowców. Proces edycji grup acylowych w liściach może również zachodzić przy udziale enzymów PDAT czy fosfolipaz (głównie fosfolipazy A₂). Rozważając udział wszystkich możliwych enzymów zaangażowanych w proces remodelowania, intensywność oraz czas przebiegu tych procesów są niezwykle wydajne. Efektywność remodelowania puli PC obecnej w liściach *C. sativa* hodowanej w warunkach *in vitro* jest porównywalna do edycji tej puli zachodzącej w okresie pierwszego stadium rozwojowego nasion. Edycja puli PA w tych liściach zachodzi nawet intensywnie niż odnotowano to dla PA nasion. Tak wydajne remodelowanie PC i PA w liściach *in vitro* może wiązać się z potrzebą adaptacji do warunków stresowych lub zwiększoną akumulacją lipidów zapasowych. Natomiast dla puli PE obecnej w zarówno w liściach *in vivo*, jak i *in vitro* odnotowano, że proces ten może zachodzić szybciej niż w nasionach, co wskazuje, że ten fosfolipid może pełnić szczególnie ważną rolę w tkankach nadziemnych i w dostosowaniu się do panujących warunków zewnętrznych.

5.7. Wpływ temperatury na preferencje enzymów LPLAT, a ich rola w utrzymaniu ciekło-krystalicznej struktury membran komórkowych liści *Camelina sativa*

Fosfatydylocholina, jak i fosfatydyloetanolamina są dominującymi fosfolipidami w błonach komórkowych w związku z czym to one w głównej mierze odpowiadać będą za zachowanie płynności tych struktur. Ta właściwość jest niezwykle ważna do utrzymania prawidłowej fizjologii komórki i stabilizacji struktury komórki w różnych warunkach temperaturowych. Główną rolę w tym procesie odgrywać będzie profil kwasów tłuszczowych w tych fosfolipidach. W niskich temperaturach dominować będą nienasycone, a w wysokich nasycone kwasy tłuszczowe. Rośliny lądowe nieustannie narażone są na różne bodźce środowiskowe, przy czym jednym z najważniejszych

wyzwań przed jakim stoją jest właśnie szeroki zakres temperatur. Ten stresor może prowadzić do szeregu różnych niekorzystnych efektów takich jak: hamowanie aktywności metabolicznej enzymów, niepoprawne fałdowanie białek, wywoływanie stresu oksydacyjnego, czy hamowanie procesu fotosyntezy. Ostatecznie zmiany te mogą prowadzić do obniżenia plonów roślin lub nawet śmierci komórek roślinnych (Ruelland i in., 2009). Dlatego też tak ważne jest zachowanie płynnej struktury membran komórkowych w odpowiedzi na stres temperaturowy. Zarówno wysoka, jak i niska temperatura wywołując zmiany w płynności błony, uruchamiają sygnalizację komórkową. Za pośrednictwem jonów Ca^{2+} , aktywują szlaki kinaz MAP (MAPK) oraz prowadzą do zmiany ekspresji różnych genów, mając ostatecznie na celu adaptację komórek do panujących warunków. Niemniej jednak bezpośredni mechanizm zmiany płynności membran komórkowych w odpowiedzi na zmianę warunków temperaturowych nie do końca jest jasny. Najprawdopodobniej to zmiany w płynności membran inicjują całą kaskadę reakcji wewnątrz komórki, które w pierwszej kolejności dotyczą białek błonowych takich jak kanały jonowe mogące regulować transfer jonów wapnia i aktywację kinaz białkowych reagujących na wapń (Zhu, 2016). Dotychczas nie wszystkie „elementy” procesu odpowiadającego za zmiany zachodzące w membranach pod wpływem tego stresora zostały poznane. Do dziś głównie udział desaturaz w tym procesie został scharakteryzowany, gdyż odgrywają one szczególną rolę w warunkach niskich temperaturach poprzez wprowadzanie wiązań podwójnych, które umożliwiają zachowanie ciekło-krystalicznej struktury membrany.

W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wykazano, że znajdujące się w tkankach wegetatywnych enzymy LPEAT, odpowiadające za syntezę/remodelowanie fosfatydyloetanolaminy mogą reagować na zmiany temperatury poprzez modyfikację swojej aktywności oraz specyficzności substratowej. Co ważne, dla enzymów LPCAT takich właściwości nie odnotowano. Eksperymenty wykazały, że niska temperatura promuje preferencje enzymów LPEAT w stosunku do 18:3-CoA, podczas gdy w wyższych temperaturach (powyżej 30 °C) preferencja ta maleje, a wzrasta w stosunku do 18:1-CoA. Zaobserwowane zmiany specyficzności korelują z danymi literaturowymi opisującymi skład acylipidów obecnych w roślinach poddanych zmianom temperaturowym. Badania przeprowadzone na liściach *A. thaliana*, oraz co ważne przy uwzględnieniu zmian w profilu kwasów tłuszczowych puli PE wykazały, że wysoka temperatura prowadzi do spadku zawartości kwasów trienowych (18:3 oraz 16:3), a wzrostu zawartości kwasu 16:0 oraz 18:1. Ponadto, w tych tkankach wzrasta pod

wpływem wysokiej temperatury ilość 18:2, w przeciwieństwie do nasion (Welti i in., 2002; Falcone i in., 2004; Saidi i in., 2010; Qin i in., 2020). Badania przeprowadzone na roślinach oleistych uprawianych w wysokich temperaturach wykazały, że nasiona takich roślin zawierały obniżony poziom 18:2 oraz 18:3, a zwiększony 18:1 (Canvin, 1965; Wolf i in., 1982; Schulte i in., 2013). Tendencje dotyczące wzrostu akumulacji 18:2 w liściach *A. thaliana* pod wpływem podwyższonej temperatury korelowały z zaobserwowanymi preferencjami enzymów *CsLPCAT* i *CsLPEAT* obecnych w tkankach wegetatywnych w stosunku do 18:2-CoA, jednakże zmiany składu kwasów tłuszczowych lipidów liści *C. sativa* pod wpływem temperatury nie zostały przeprowadzone jak również wpływ temperatury na preferencje *AtLPCAT* i *AtLPEAT* nie był testowany. Odnotowane zmiany w składzie kwasów tłuszczowych puli PE liści *A. thaliana* pod wpływem podwyższonej temperatury (Qin i in., 2020) są tożsame ze zmianami, pod wpływem temperatury, preferencji substratowych (w stosunku do acylo-CoA) odnotowanych dla enzymów *CsLPEAT*, co pośrednio wskazuje, że *LPEATy* mogą odgrywać znaczącą rolę w regulacji składu kwasów tłuszczowych tego fosfolipidu. Zawartość kwasów trienowych, w tym kwasu linolenowego, już uprzednio została scharakteryzowana jako dominująca w procesie aklimatyzacji, podczas której w niskich temperaturach pożądana jest wysoka zawartość tych kwasów tłuszczowych, a w wysokich wręcz odwrotnie (Murakami i in., 2000). Niemniej jednak dla enzymów *LPEAT* pochodzących z liści *C. sativa* hodowanych w warunkach *in vivo* odnotowano dość silną preferencję w stosunku do 16:0-CoA, szczególnie widoczną w podwyższonych temperaturach. Tą cechą odnotowano wyłącznie dla tkanek wegetatywnych i może to być cecha ułatwiająca im adaptację do stresu cieplnego, w czasie kiedy ten kwas tłuszczowy jest pożądanym, aby zapewnić stabilizację błon komórkowych.

Odnnotowane preferencje w pewnym stopniu zostały potwierdzone na podstawie przeprowadzonych testów selektywności, w których uwzględniono rolę białka *ACBP* zastąpionego w reakcjach enzymatycznych dodatkiem *BSA*. Dla obu testowanych temperatur wykryto wysoką preferencję względem 18:1-CoA, dominującą nad wykorzystaniem 18:3-CoA. Niemniej jednak w wyższych temperaturach wykorzystanie 18:3-CoA istotnie zmniejszało się, co koreluje ze zmianami zachodzącymi w puli PE pod wpływem tego stresora. Z drugiej strony warunki te prowadziły do wzrostu specyficzności *LPEATów* obecnych w liściach hodowanych w warunkach *in vitro* względem 16:0-CoA, co poprzednio w testach z użyciem pojedynczych acylo-CoA nie zostało zaobserwowane.

Jak się okazuje temperatura nie tylko wpływała na zmianę specyficzności enzymów LPEAT obecnych w tkankach *C. sativa*, ale również determinuje intensywność reakcji *backward* tych enzymów oraz efektywność remodelowania puli PE. Badania przeprowadzone dla frakcji mikrosomalnych otrzymanych z liści hodowanych *in vivo* przy zastosowaniu dwóch skrajnych temperatur 10 oraz 40 °C wykazały, że w wyższej temperaturze przebudowa puli PE zachodzi nawet do 5 razy szybciej, w zależności od zastosowanego acylo-CoA, niż w temperaturze 10 °C. Uwzględniając również intensywność remodelowania puli PE w 30 °C można jednoznacznie wykazać, że wraz ze wzrostem temperatury efektywność edycji grup acylowych wzrasta, co może być ściśle związane z faktem, że to wyższe temperatury prowadzą do zajścia zmian w komórce roślinnej, które mogą być nieodwracalne, a zatem stres ten jest bardziej niebezpieczny dla roślin. Otrzymane wyniki wskazują na wzmożone remodelowanie puli PE obecnej w tkankach wegetatywnych pod wpływem podwyższonej temperatury. W temperaturze 40 °C zachodzi ono nawet efektywniej niż remodelowanie puli PE nasion *C. sativa*. Niemniej jednak udział enzymów LPEAT w remodelowaniu puli PE obecnej w liściach był niewielki, co wskazuje, że inne reakcje takie jak aktywność fosfolipaz, czy wykorzystanie tej puli przez enzymy PDAT i produkcja puli LPE również będą odgrywać istotną rolę w remodelowaniu. W reakcjach typu *backward* przeprowadzanych z udziałem frakcji mikrosomalnych z nasion *C. sativa*, spośród testowanych donorów grup acylowych enzymy LPLAT szczególnie preferowały 18:1-CoA, a następnie 18:2-CoA. Dość podobne preferencje wykazano w tego typu testach przeprowadzonych z udziałem LPLATów obecnych w liściach *C. sativa*. Tak jak to dyskutowano to już w stosunku do tego typu reakcji przeprowadzanych przez LPLATy nasion *C. sativa*, wydaje się, że acylo-CoA obecne w mieszaninie reakcyjnej (*in vitro* - w środowisku reakcji) mogą wpływać w różny sposób na aktywność typu *backward* LPLATów oraz na aktywność innych enzymów uczestniczących w produkcji LPL. Sugestie te muszą być jednak udowodnione w przyszłych badaniach. Z fizjologicznego punktu widzenia, preferencyjne włączanie 18:1 do puli remodelowanego PC jest jak najbardziej uzasadnione, jako że to właśnie w PC następuje proces syntezy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania błon biologicznych.

Należy jednak nadmienić, że istotną kwestią, od której w warunkach *in vivo* będzie zależeć aktywność enzymów LPEAT w reakcjach *forward* oraz *backward*, oraz wykorzystywanie przez nie odpowiednich acylo-CoA do procesu remodelowania tego

fosfolipidu, będzie skład puli acylo-CoA (dotychczas wciąż nie opisany dla liści *C. sativa*) oraz puli lizofosfatydyloetanoloaminy. Skład tej ostatniej jest zaś zależny od warunków temperaturowych (Welti i in., 2002; Qui i in., 2020).

5.8. Wzory ekspresji genów kodujących poszczególne izoenzymy LPLAT oraz powiązanie tej ekspresji z aktywnością LPLATów.

Badania dotyczące specyficzności substratowej oraz aktywności wybranych enzymów LPLAT wykazały, że mogą one zależeć od takich parametrów jak stadia rozwoju nasion, warunki hodowli – *in vivo* oraz *in vitro*, czy temperatura. Uznano więc, że zaobserwowane efekty mogą być spowodowane między innymi, obecnością różnych wariantów genów kodujących te enzymy i ich różną ekspresją zależną od wspomnianych czynników.

Na podstawie baz danych genomowych utworzonych przez Kagale i in. (2014; <http://www.camelinadb.ca>) na bazie genomu *C. sativa* odmiany DH55 wykazano obecność sześciu wariantów genów kodujących LPCATy, piętnastu kodujących LPAATy oraz sześciu kodujących LPEATy. Należy jednak pamiętać, że *C. sativa* jest rośliną heksaploidalną w związku z czym trzy warianty danego genu odpowiadają za kodowanie trzech wariantów jednej izoformy. W przypadku LPCATów oraz LPEATów występują po dwie izoformy (LPCAT1 i LPCAT2 oraz LPEAT1 i LPEAT2), w przypadku LPAATów aż pięć (LPAAT1, LPAAT2, LPAAT3, LPAAT4 oraz LPAAT5) stąd po 6 wariantów tych dwóch pierwszych i 15 wariantów tych ostatnich. Do tej pory jednak nie ma danych eksperymentalnych, które potwierdzałyby, że geny te (kodujące wspomniane warianty poszczególnych izoform) na pewno kodują enzymy o aktywności LPCAT oraz LPAAT. Dla enzymów LPEAT takie dane zostały uzyskane w ramach niniejszej pracy, jednak sekwencje nukleotydowe kodujące je zostały bezpośrednio powielone na matrycy cDNA uzyskanej z odmiany Suneson (odmiany *C. sativa* wykorzystywanej do badań przeprowadzanych w ramach niniejszej pracy). Wcześniejsze dane uzyskane na podstawie analizy transkryptomicznej genów związanych z metabolizmem lipidów w nasionach *C. sativa* wykazały, że ekspresja genów kodujących LPCAT1 oraz LPCAT2 wzrasta pomiędzy (wyznaczonym przez autorów tych badań) pierwszym, a drugim etapem ich rozwoju które przypadały na okresy rozwoju nasion pomiędzy 10-15 DAF i 16-21 DAF (Abdullah i in., 2016). Odnotowany wzrost ekspresji korelował z danymi uzyskanymi w niniejszej pracy, gdyż

dla enzymów LPCAT odnotowano znaczącą ich aktywność w nasionach z 17-19 DAF. Aktywność LPCATów w nasionach z wcześniejszych okresów ich rozwoju nie była w niniejszej pracy określana (były one zbyt małe by nadawały się do wypreparowania zarodków wykorzystywanych do przygotowania frakcji mikrosomalnych używanych w późniejszych testach). W przypadku enzymów LPAAT, Abdullah i in. (2016) odnotowali wzrost ekspresji genów kodujących LPAAT1-4 oraz spadek ekspresji genów kodujących LPAAT5 w tym okresie rozwoju nasion. Dane dotyczące ogólnej aktywności tych enzymów w nasionach badanej odmiany *C. sativa* wykazały ich wysoką aktywność już w pierwszym z badanych okresów rozwojowych nasion tj. pomiędzy 17-19 DAF. Jednocześnie wraz z rozwojem nasion zmieniała się nie tyle ich ogólna aktywność co preferencje w stosunku do różnych acylo-CoA. Mogło to być jak najbardziej związane z różną ekspresją poszczególnych wariantów genów kodujących LPAATy, jednakże ani w ramach obecnej pracy ani w badaniach wcześniejszych ekspresja tych genów nie była w późniejszych stadiach rozwojowych nasion badana. Ekspresja genów kodujących LPCATy w liściach *C. sativa* (Abdullah i in., 2016) wydaje się korelować z ich aktywnością, ponieważ wspomniane badania transkryptomyczne wykazały, że geny kodujące te enzymy są około 2-3 razy słabiej ekspresjonowane w liściach hodowanych w warunkach *in vivo* niż w nasionach, co odpowiada również około 2-3-krotnej różnicy aktywności tych enzymów w obu tkankach odnotowanych w ramach niniejszych badań. W przypadku enzymów LPAAT nie odnotowano jednak korelacji pomiędzy ekspresją genów kodujących te enzymy w liściach i nasionach, a aktywnością tych enzymów we wspomnianych organach, ponieważ dane transkryptomiczne wykazały, że ekspresja tych genów w liściach hodowanych w warunkach *in vivo* jest taka sama, jak w nasionach lub nawet 4-5-krotnie wyższa (Abdullah i in., 2016), a odnotowane (w niniejszej pracy) aktywności tych enzymów były niższe w liściach.

Badania dotyczące poziomu ekspresji różnych wariantów genów kodujących LPEATy w *C. sativa* zostały po raz pierwszy wykonane w ramach niniejszej pracy. Ekspresja tych genów została scharakteryzowana nie tylko dla tkanek generatywnych (nasion pochodzących z drugiego stadium rozwoju), ale również tkanek wegetatywnych (liści oraz korzeni). Do analizy porównawczej, filogenetycznej oraz badania ekspresji genów, jak wspomniano powyżej, wykorzystane zostały sekwencje sklonowane na bazie cDNA pochodzącego z *C. sativa* odmiany Suneson wykorzystywanej w obecnych badaniach. Z sukcesem udało się sklonować 5 różnych wariantów *CsLPEAT*. Trzy z nich kodowały sekwencje izoenzymów należących do *CsLPEAT2* i były wysoce podobne do sekwencji

znajdujących się w bazach danych opracowanych dla odmiany DH55. Kolejno, izoenzymy przez nie kodowane zostały nazwane: *CsLPEAT2a*, *CsLPEAT2b* oraz *CsLPEAT2c*. W przypadku dwóch pozostałych sekwencji okazało się, że są one wariantami splicingowymi *CsLPEAT1a*, tak więc kodowane przez nie białka zostały nazwane *CsLPEAT1a.1* oraz *CsLPEAT1a.2*. W przeprowadzonych analizach ekspresji genów uwzględnione zostały również dwa pozostałe warianty *CsLPEAT1*: kodujące odpowiednio *CsLPEAT1b* oraz *CsLPEAT1c*, których sekwencje zostały pobrane z baz danych i pochodziły z odmiany *C. sativa* odmiany DH55 (Abdullah i in., 2016). Nazwy literowe poszczególnych izoenzymów obu izoform *CsLPEAT* zostały nadane po przeprowadzeniu analizy filogenetycznej, która wykazała, że sekwencje kodujące izoenzymy *CsLPEAT1c* oraz *CsLPEAT2c* z wysokim prawdopodobieństwem pochodzą z genomu *C. hispida*, podczas gdy sekwencje kodujące pozostałe izoenzymy *CsLPEAT1* oraz *CsLPEAT2* pochodzą z auto-allotetraploidalnej *C. neglecta*. Otrzymane wzorce ekspresji wykazały, że w nasionach względna ekspresja badanych wariantów *CsLPEAT1* jest wyższa niż względna ekspresja badanych wariantów *CsLPEAT2*, podczas gdy w tkankach wegetatywnych różnice te były już mniej widoczne. Bezwzględna ekspresja badanych genów była (spośród badanych tkanek) najwyższa w korzeniach roślin hodowanych w warunkach *in vitro*. Korelowało to z wysoką aktywnością LPEATów obecnych w ich tkankach. Korelacji pomiędzy ekspresją genów kodujących LPEATy, a aktywnością tych enzymów nie odnotowano jednak dla badanych liści *C. sativa* pochodzących z roślin z różnych warunków hodowli tj. *in vivo* oraz *in vitro*. Ekspresja badanych genów w liściach z obu warunków hodowli była zbieżna, podczas gdy aktywność enzymów LPEAT w liściach pochodzących z roślin hodowanych *in vitro* była znacząco wyższa niż ich aktywność w liściach z warunków *in vivo*. Najprawdopodobniej obserwowane efekty są wynikiem innych możliwych modyfikacji badanych enzymów, które zostały omówione w poprzedniej części dyskusji i dotyczą ewentualnych modyfikacji potranslacyjnych czy zmniejszenia katabolizmu tych białek.

Różnice wzorów ekspresji genów kodujących *CsLPEATy*, występujące pomiędzy badanymi tkankami, są prawdopodobnie spowodowane innymi wymaganiami i funkcjami jakie odgrywać ma pula PE w danej tkance. Spośród wariantów *CsLPEAT1*, najwyższą ekspresję odnotowano dla *CsLPEAT1a*, (suma ekspresji obu wariantów splicingowych: *CsLPEAT1a.1* oraz *CsLPEAT1a.2*) natomiast spośród wariantów *CsLPEAT2*, dla *CsLPEAT2b*. Z drugiej strony najniższą ekspresję wykryto dla *CsLPEAT2c*. Izoenzym kodowany przez ten wariant *CsLPEAT2* w testach

enzymatycznych (system drożdżowy) charakteryzował się aktywnością i specyficnością substratową zbliżoną do tej wykazywanej przez *CsLPEAT2b*. Możliwe więc, że ze względu na tak wysokie podobieństwo w pełnionej przez oba izoenzymy funkcji, ekspresja genu kodującego jeden z nich (tj. *CsLPEAT2c*) uległa drastycznemu obniżeniu. W przypadku obu homologów *CsLPEAT1a* ich sekwencja aminokwasowa jest do siebie niezwykle podobna i różni się wyłącznie pojedynczym aminokwasem. Niemniej jednak, ta zmiana znajduje się w pobliżu domeny odpowiedzialnej za miejsce wiązania LPL i dotyczy wymiany fenyloalaniny na cysteinę. Dostępne dane literaturowe wykazują, że zamiana tych aminokwasów może mieć znaczący wpływ na elektrostatykę oraz interakcję zachodzącą pomiędzy miejscem wiązania, a substratem (Roberts i in., 2008). W testach specyficności substratowej (system drożdżowy) odnotowano pewne różnice w tej specyficznosci wykazywanej przez oba homologi *CsLPEAT1a*. Ze względu na zbyt duże podobieństwo genów kodujących oba wspomniane homologi nie udało się ustalić wzorca ekspresji genów kodujących każdy z nich, a tylko sumę ekspresji obu genów. W przypadku izoenzymów *CsLPEAT2* w ich sekwencjach aminokwasowych odnotowano obecność domen nie tylko związanych z wiązaniem LPL, ale również domen wiążących wapń. Podobną strukturę odnotowano dla sekwencji aminokwasowych enzymów *LPEAT2* występujących w tkankach *A. thaliana*. Jednakże, zarówno badania przeprowadzone w ramach tej pracy, jak i dane literaturowe (Stålberg i in., 2009) nie wskazują, aby jony wapnia stymulowały aktywności *LPEAT*ów.

Przedstawione powyżej dane zgodne są więc z założeniem zaprezentowanym na początku tego podrozdziału, że to obecność w tkankach *C. sativa* wielu wariantów genów kodujących poszczególne *LPLATy* oraz różnice w ich ekspresji zależne od stadium rozwojowego czy warunków hodowli są ważnym czynnikiem determinującym zmiany w aktywności i specyficznosci substratowej *LPLAT*ów podczas rozwoju tej rośliny i pod wpływem czynników zewnętrznych.

5.9. Odmienna specyficznosc substratowa izoenzymów *CsLPEAT*, a ich potencjalna rola w tkankach *Camelina sativa*

Rodzaj występujących cząsteczek LPE w nasionach lnicznika jest bardzo zróżnicowany, jednak przeważa 16:0-LPE, a następnie pod względem ilości plasuje się 18:1-LPE, który według niektórych danych może nawet dominować nad pulą 16:0-LPE (Marmon i in., 2017; Abdullah i in., 2018). Badania dotyczące profilu kwasów

tłuszczowych obecnych w pozycji *sn-1* oraz *sn-2* fosfatydyloetanolaminy występującej w liściach lnicznika hodowanego w warunkach *in vivo* po raz pierwszy zostały opisane w ramach powyższej pracy. Analiza ta wykazała, że w pozycji *sn-1* dominuje kwas palmitynowy, a 18-węglowe nienasycone kwasy tłuszczowe występują w mniejszych ilościach. W pozycji *sn-2* odnotowano zaś odwrotną tendencję. Można więc przypuszczać, że w puli LPE liści również będzie dominował 16:0-LPE. Podobny skład puli LPE odnotowano również dla *A. thaliana* (Qin i in., 2020). Kompozycja puli LPE zależy jednak od warunków temperaturowych w jakich znajdują się rośliny. W chłodzie dominuje zawartość kwasów nienasyconych, podczas gdy w stresie cieplnym profil kwasów tłuszczowych w puli LPE jest dość porównywalny do warunków standardowych, w których dominuje 16:0 z tym, że wysoką zawartość odnotowano również dla 18:2 (Welti i in., 2002; Qin i in., 2020). Powyższe dane, pomimo iż wskazują na przewagę 16:0-LPE w puli LPE roślin z warunków standardowych to jednocześnie wskazują na znaczną różnorodność występujących w tkankach roślinnych „gatunków” LPE. W związku z powyższym do dalszej charakterystyki biochemicznej poszczególnych izoenzymów CsLPEAT wykorzystano 16:0-LPE, 18:1-LPE oraz 18:2-LPE.

Pięć z sekwencji nukleotydowych (genów), opisanych powyżej, kodujących poszczególne izoenzymy CsLPEAT, zostało uprzednio sklonowane, a następnie scharakteryzowane pod względem podobieństwa oraz pokrewieństwa ewolucyjnego. Kolejno każdy z tych genów wprowadzony został do systemu drożdżowego, w którym następowała jego ekspresja i produkcja kodowanego przez niego białka. Komórki, użytego do przeprowadzanych transformacji, szczepu drożdży nie zawierały endogennej acylotransferazy odpowiadającej między innymi za syntezę fosfatydyloetanolaminy (drożdże delecyjne $\Delta ALE1$). Następnie przeprowadzona została izolacja frakcji mikrosomalnych z tego typu mutantów drożdży, które to frakcje wykorzystywane były później do wykonania testów enzymatycznych *in vitro*. Testy te pozwoliły jednoznacznie wykazać, że wprowadzone sekwencje kodują białka o aktywności LPEAT. Ponadto wykorzystanie tych mutantów drożdży umożliwiło dalszą analizę opierającą się na charakterystyce tylko konkretnych izoenzymów CsLPEAT (kodowanych przez poszczególne warianty *CsLPEAT1* i *CsLPEAT2*). Otrzymane wyniki wykazały, że wszystkie z nich charakteryzują się szczególnie wysoką preferencją w stosunku do 16:0-CoA oraz (w nieco mniejszym stopniu) 18:0-CoA, niezależnie od zastosowanego akceptora grup acylowych. Jest to zaskakujący wynik zważając na fakt, że w tkankach roślinnych w pozycji *sn-2* fosfolipidów nasycone kwasy tłuszczowe występują

w niewielkich ilościach. Mimo to już poprzednie badania wykazały, że enzymy LPEAT pochodzące z *A. thaliana* wykazują wysoką preferencję w stosunku do 16:0-CoA (Stålberg i in., 2009; Jasieniecka-Gazarkiewicz i in., 2015). Również w badaniach zaprezentowanych w niniejszej pracy odnotowano wysoką preferencję enzymów LPEAT, obecnych we frakcjach mikrosomalnych wyizolowanych z nasion oraz liści roślin hodowanych *in vivo* w stosunku do tego acylo-CoA. Preferencja ta była jednak podobna lub niższa niż np. w stosunku do 18:1-CoA. W systemie drożdżowym odnotowana aktywność w stosunku do 16:0-CoA była zaś nawet kilkakrotnie wyższa niż w stosunku np. do 18:1-CoA. Możliwe jest więc, że potranslacyjna obróbka tych enzymów w systemie drożdżowym jest nieco inna niż w komórkach roślinnych i powstające białka w tym systemie mogą charakteryzować się w pewnym stopniu zmienioną specyficznością. Niemniej jednak, w niniejszych badaniach wykazano, że pozycja *sn-2* puli PE składa się w 10% z kwasu palmitynowego. Możliwe więc, że kwas ten do pozycji *sn-2* został włączony w wyniku procesu remodelowania PE (zważywszy na wysoką preferencję LPEATów w stosunku do 16:0-CoA) jako że, podczas syntezy fosfolipidów za pośrednictwem szlaku eukariotycznego do pozycji *sn-2* fosfolipidów nasycone kwasy tłuszczowe dołączane są w znikomych ilościach (Maatta i in., 2012). Fizjologicznym znaczeniem takiej właściwości enzymów LPEAT, prowadzącej do syntezy puli PE zawierającej kwas palmitynowy w pozycji *sn-2* być może związana jest z utrzymaniem prawidłowej struktury membran komórkowych w wyniku działania stresu cieplnego. Jak już wiadomo kwas palmitynowy jest jednym z ważniejszych związków uczestniczących w stabilizacji płynności błony, a jego zawartość znacznie wzrasta w tych warunkach temperaturowych (Falcone i in., 2004; Qin i in., 2020). Preferencja izoenzymów CsLPEAT w stosunku do 16:0-CoA również zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury, co potwierdzałoby sugerowaną hipotezę. Ponadto znaczący wzrost specyficzności enzymów LPEAT, w stosunku do tego substratu, odnotowano w liściach hodowanych w warunkach *in vitro* w porównaniu do tych z warunków *in vivo*. W tych pierwszych, tak jak to dyskutowano wcześniej, metabolizm lipidów przebiega zaś podobnie jak w roślinach poddanych działaniu wysokiej temperatury.

Pomimo odnotowanej wysokiej zawartości 16:0-LPE zarówno w liściach, jak i nasionach *C. sativa*, ten akceptor grup acylowych okazał się być najmniej efektywnie wykorzystywanym substratem przez wszystkie badane izoenzymy CsLPEAT, przy czym CsLPEAT2c w testach z 18:2-CoA (jako donorem kwasów tłuszczowych) oraz CsLPEAT2b w testach z każdym z badanych acylo-CoA nie wykazywały żadnej

aktywności, bądź była ona poniżej poziomu detekcji. Pomimo dominującej ilości tego „gatunku” LPE również w tkankach *A. thaliana* obecne w tej roślinie enzymy LPEAT także wykazywały osłabioną preferencję względem tego akceptora grup acylowych (Hishikwa i in., 2008; Ståhlberg i in., 2009). Cytowane badania wskazywały na znacznie lepsze wykorzystywanie 18:1-LPE, tak jak to odnotowano w niniejszej pracy także dla CsLPEAT. Osłabione wykorzystywanie 16:0-LPE przez LPEATy, być może (z fizjologicznego punktu widzenia) związane jest z zapobieganiem tworzenia się cząsteczek PE z dwoma cząsteczkami kwasu palmitynowego, które to w normalnych warunkach wzrostu mogłyby wpływać negatywnie na płynność membran. Brak akceptacji również innych acylo-CoA niż 16:0-CoA możliwe, że jest skutkiem ubocznym tego przystosowania, jako że w naturalnych warunkach występuje znaczna pula PE z 16:0 w pozycji *sn*-1 i nienasyconymi kwasami tłuszczowymi w pozycji *sn*-2 (wynik syntezy w szlaku Kenedy’ego). Niemniej jednak wytwarzanie PE z dwoma cząsteczkami kwasu palmitynowego czy palmitynowego i stearynowego w wysokich temperaturach mogłoby wpływać korzystnie na płynność membran. Stosunkowo wysoka zawartość 16:0-LPE mogłaby ułatwiać syntezę tego typu „gatunków” PE, mimo odnotowanego lepszego wykorzystywania innych „gatunków” LPE przez LPEATy w 30 °C (temperatura przeprowadzanych testów). Brak jest jednak danych dotyczących wykorzystywania 16:0-LPE w innych temperaturach, jak i również brak jest danych dotyczących wykorzystywania różnych „gatunków” LPE, gdy znajdą się one w mieszaninie reakcyjnej w równo-molowych ilościach czy w ilościach imitujących te z warunków naturalnych. Tak więc badania dotyczące specyficzności LPEATów w stosunku do różnych akceptorów grup acylowych wymagają kontynuacji.

Ciekawym wynikiem, który zaobserwowano dla izoenzymów CsLPEAT była odmienna preferencja w stosunku do dwóch pozostałych testowanych akceptorów kwasów tłuszczowych. Izoenzymy CsLPEAT1a faworyzowały wykorzystanie 18:1-LPE, podczas gdy izoenzymy CsLPEAT2 zdecydowanie bardziej preferowały 18:2-LPE. W testach z dodatkiem 18:1-LPE izoenzymy CsLPEAT1a wykorzystywały najlepiej jako donory grup acylowych kwasy nasycone oraz mononienasycone. Warto również przypomnieć, że ekspresja genów kodujących ten enzym była dominująca w nasionach *C. sativa*. Wysoki poziom ekspresji genów kodujących CsLPEAT1 może być skorelowany z preferencją tych enzymów w stosunku do 18:1-LPE w tej tkance, ponieważ pula tego „gatunku” LPE jest jedną z najliczniejszych (zaraz po 16:0-LPE) szczególnie w okresie między 18, a 24 DAF, czyli czasie, gdzie akumulacja lipidów zachodzi najintensywniej

(Marmon i in., 2017). Jak już wspomniano pula PE może być bezpośrednio wykorzystywana przez enzymy PDAT w syntezie TAG, aczkolwiek specyficzność enzymów PDAT jest stosunkowo niska w stosunku do nasyconych oraz mononienasyconych kwasów tłuszczowych z pozycji *sn*-2 PE (Ståhl i in. 2004). Możliwe, że powstająca w wyniku takiej aktywności LPEATów pula PE zawierająca kwasy nasycone oraz mononienasycone jest przekształcana do puli PC za pośrednictwem kolejno następujących po sobie metylacji zachodzących w wyniku szlaku PEAMT (phosphatidylethanolamine N-methyltransferase), gdzie może ulegać procesowi desaturacji. Jednakże, jak dotąd obecność jednego z enzymów uczestniczących w szlaku PEAMT wciąż nie została zidentyfikowana w tkankach roślinnych. Należy zaznaczyć, że lizofosfatydyloetanolamina z dołączonym w pozycji *sn*-1 kwasem linolenowym jest również efektywnie wykorzystywana przez LPEATy nasion – głównie przez izoenzymy LPEAT2. Spośród tych izoenzymów najefektywniej operowały (sądząc po odnotowanej ekspresji kodujących ich genów) CsLEPAT2b oraz CsLPEAT2a. W tkankach wegetatywnych, geny kodujące izoenzymy CsLPEAT2 wykazywały podobną ekspresję, jak geny kodujące izoenzymy CsLPEAT1. Stosunkowo wysoka ekspresja genów kodujących izoenzymy obu izoform CsLPEAT, a zatem istnienie izoenzymów wykazujących tak różnorodne właściwości biochemiczne może być związana ze szczególną sytuacją w jakiej znajdują się tkanki wegetatywne w porównaniu do nasion. Tkanki wegetatywne są bardziej narażone na działanie czynników zewnętrznych, w związku z czym różnorodność tych enzymów będzie preferowana, aby rośliny mogły dostosować się do wszelakich czynników zewnętrznych. Z drugiej strony nasiona posiadają w swojej budowie dodatkową osłonę zarodków w postaci łupiny nasienia oraz łuszczyzny w przypadku nasion *C. sativa*. Ponadto tkanki te są nastawione na produkcję i akumulację acylolipidów.

Interesującą właściwością zaobserwowaną dla izoenzymów CsLPEAT2 była wysoka efektywność w wykorzystywaniu bardzo długołańcuchowych acylo-CoA, co może być cechą charakterystyczną enzymów LPEAT2, ponieważ poprzednio taką preferencję odnotowano dla tych enzymów obecnych w liściach *A. thaliana* (Jasieniecka-Gazarkiewicz i in. 2017). Z drugiej strony testowane średniołańcuchowe donory grup acylowych były wykorzystywane przez wszystkie badane izoenzymy LPEAT, gdy testowano je w systemie drożdżowym. Wykorzystywane były również przez LPEATy obecne w frakcjach mikrosomalnych z testowanych organów *C. sativa*. Podczas przeprowadzonych badań dotyczących profilu lipidowego nasion oraz liści *C. sativa* nie

wykryto jednak tych kwasów tłuszczowych; zatem nie występują one w tej odmianie lub ich ilość była poniżej poziomu detekcji. Na chwilę obecną, preferencje enzymów LPLAT w tkankach *C. sativa* w stosunku do tych acylo-CoA nie mają przypisanej żadnej funkcji fizjologicznej jaką mogą pełnić. Potencjalnie właściwość ta mogłaby zostać jednak wykorzystana do wytworzenia odmian *C. sativa* o zwiększonej zawartości tych kwasów tłuszczowych. W przypadku bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych ich obecność została potwierdzona w puli fosfatydyloetanolaminy występującej w nasionach oraz liściach (badania przedstawione w pracy; Marmon i in., 2017). Co więcej, te kwasy tłuszczowe stanowią dominującą pulę acylo-CoA nasion *C. sativa* (Ruiz-Lopez i in., 2016; Marmon i in., 2017). Odnotowana w systemie drożdżowym stosunkowo wysoka specyficzność izoenzymów CsLPEAT2 w stosunku do tego typu acylo-CoA wskazywałaby, że mogą one być głównymi enzymami odpowiedzialnymi za przenoszenie tych kwasów do puli PE. Kwasy te, obecne już w puli PE, mogłyby kolejno zostać bezpośrednio włączone do puli TAG (za pośrednictwem enzymów PDAT), gdzie stanowią około 23% wszystkich kwasów tłuszczowych lub być najpierw przekształcane do puli PC za pośrednictwem szlaku PEAMT, a dopiero później wykorzystywane do syntezy puli TAG (jak wspomniano poprzednio nie wszystkie z enzymów uczestniczących w szlaku PEAMT zostały zidentyfikowane u roślin, więc jest to wyłącznie hipoteza) zarówno w reakcji katalizowanej przez PDAT, jak i DGAT (po przeniesieniu tych kwasów tłuszczowych do puli acylo-CoA). Niemniej jednak VLCFA stanowią jedynie niewielką pulę kwasów tłuszczowych fosfatydylocholiny, jak i fosfatydyloetanolaminy, a zatem aby zostały one wprowadzone do puli lipidów zapasowych za pośrednictwem enzymu PDAT, enzym ten musiałby wykazywać wyjątkowo wysoką specyficzność względem tych donorów grup acylowych. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań eksperymentalnych, ponieważ dotychczas aktywność enzymu PDAT względem tych substratów (tj. PC czy PE z VLCFA) nie została scharakteryzowana. Tak więc, jak dotychczas udział enzymów PDAT we wprowadzaniu VLCFA do puli TAG oraz rola LPEATów w tym procesie pozostają jedynie rozważaniami teoretycznymi. Jak dotychczas wykazano, że tego typu kwasy tłuszczowe mogą być wprowadzane do puli TAG w wyniku reakcji katalizowanej przez enzymy typu DGAT; mają one zdolność do wykorzystywania kwasu gondolowego oraz erukowego związanego z koenzymem A (Lager i in., 2020; Gao i in., 2021). Względny udział enzymów typu PDAT i typu DGAT w tym procesie wymaga jednak dodatkowych badań.

Istotną częścią badań przeprowadzonych na frakcjach mikrosomalnych badanych mutantów drożdży była weryfikacja wpływu temperatury na aktywność enzymów CsLPEAT. Jak opisano poprzednio enzymy te obecne w roślinnych frakcjach mikrosomalnych wykazywały zmienne preferencje zależne od temperatury reakcji enzymatycznej. W tych testach jako akceptor grup acylowych wykorzystano 18:1-LPE, ponieważ zarówno izoenzymy CsLPEAT1, jak i CsLPEAT2 efektywnie wykorzystywały ten substrat. Ponadto akceptor ten został wykorzystany w testach enzymatycznych *in vitro* przeprowadzonych dla frakcji mikrosomalnych z różnych tkanek *C. sativa*. Wszystkie z badanych izoenzymów bez względu na testowaną temperaturę okazały się być szczególnie aktywne w stosunku do 16:0-CoA. Również drugi z nasyconych donorów grup acylowych był efektywnie wykorzystywany. Największą aktywność w stosunku do obu substratów odnotowano dla CsLPEAT2c oraz CsLPEAT2b. Szczególnie interesujące zmiany, co do preferencji substratowych w zależności od temperatury odnotowano w stosunku do 18:1-CoA oraz 18:2-CoA. Kolejno, w reakcjach enzymatycznych prowadzonych w najniższej z temperatur (tj. 10 °C) oba z donorów grup acylowych najefektywniej były wykorzystywane przez CsLPEAT2a oraz z równie wysoką wydajnością przez CsLPEAT2c. Wraz ze wzrostem temperatury reakcji do 20 °C dominująca aktywność przesunęła się ku reakcją katalizowanym przez CsLPEAT2c. Dalszy wzrost temperatury prowadził do wzrostu aktywności izoenzymu CsLPEAT2b. W przypadku trzeciego z testowanych nienasyconych donorów grup acylowych w niskich temperaturach był on wykorzystywany z podobną efektywnością przez każdy z izoenzymów CsLPEAT2, jednak wzrost temperatury prowadził również do przeważającej aktywności CsLPEAT2b.

Istotnym punktem badań, na który należy zwrócić uwagę jest mimo wszystko odmienna preferencja odnotowana dla enzymów LPEAT obecnych bezpośrednio we frakcjach mikrosomalnych tkanek *C. sativa* oraz dla tych enzymów znajdujących się we frakcjach mikrosomalnych mutantów drożdży. Szczególnie znaczące różnice odnotowano w wysokiej preferencji w stosunku do 16:0-CoA, a obniżonej w stosunku do nienasyconych 18-węglowych acylo-CoA. Taka preferencja już poprzednio została odnotowana dla tych enzymów pochodzących z *A. thaliana* wprowadzonych do systemu drożdżowego (Stålberg i in., 2009). Obserwowane rozbieżności dotyczące specyficzności substratowych tych enzymów najprawdopodobniej wynikają ze składu lipidowego środowiska, w którym się znajdują, a być może (jak sugerowano to już wcześniej) z różnic w potranslacyjnej obróbce białek w obu systemach. W tkankach roślinnych

obecne są różnorodne kwasy tłuszczowe, wśród których znaczącą pozycję zajmują kwasy wielonienasycone, a także bardzo długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, które nie występują w komórkach drożdży. W związku z tym obecność określonych kwasów tłuszczowych w membranach komórkowych otaczających białka o aktywności LPEAT może istotnie wpływać na ich właściwości biochemiczne. Biorąc pod uwagę uzyskane rozbieżne wyniki dla enzymów CsLPEAT obecnych w tkankach roślinnych oraz po wprowadzeniu ich do systemu drożdżowego, których membrany różnią się profilami lipidowymi, badania mające na celu określenie funkcji fizjologicznej tych enzymów powinny skupiać się na wynikach uzyskanych dla frakcji mikrosomalnych będących naturalnym źródłem ich występowania.

Niemniej jednak, należy zaznaczyć, że preferencje substratowe poszczególnych izoenzymów CsLPEAT w zależności od temperatury reakcji uzyskane w systemie drożdżowym, potwierdzają poprzednio postawioną hipotezę (opartą na badaniach z frakcjami mikrosomalnymi z roślin) zakładającą, że enzymy LPEAT pełnią znaczącą rolę w adaptacji do warunków temperaturowych poprzez zmianę ich specyficzności substratowej, a co za tym idzie remodelowanie w odpowiednim kierunku puli PE. Uwzględniając powyższe wnioski nie można wykluczyć, że ekspresja genów kodujących poszczególne izoenzymy będzie niższa lub wyższa w zależności od warunków temperaturowych, w których rośliny są hodowane. Nie można więc wykluczyć, że izoenzym CsLPEAT2c, dla którego w standardowych warunkach hodowli *in vivo*, odnotowano bardzo niską ekspresję kodującego go genu, nie będzie pełnił istotnej roli w innych temperaturach, w tym przypadku w warunkach stresu chłodu, gdzie jego ekspresja może być zwiększona. Jednakże w celu dalszego potwierdzenia tej hipotezy niezbędne jest przeprowadzenie badań dotyczących zmian ekspresji tych genów w roślinach hodowanych w poszczególnych, testowanych temperaturach.

6. PODSUMOWANIE

1. W nasionach oraz tkankach wegetatywnych takich jak liście oraz korzenie *Camelina sativa* wykryto obecność enzymów o aktywności LPCAT, LPAAT oraz LPEAT (w kolejności od najaktywniejszego), które odpowiednio odpowiadają za syntezę/remodelowanie fosfatydylocholiny, kwasu fosfatydowego oraz fosfatydyloetanolaminy.
2. Charakterystyka biochemiczna enzymów LPLAT zidentyfikowanych w nasionach *Camelina sativa* wykazała, że każdy z nich wykazuje najwyższą aktywność w 30 °C oraz osiąga swoje optimum aktywności w pH zasadowym. Kolejno enzymy LPCAT preferują pH o zakresie 7,0-11,0; LPAAT – 7,5-9,0; natomiast LPEAT 9,0-10,0. Dodatek jonów magnezu oraz wapnia o stężeniu 0,05-2 mM prowadzi do inhibicji aktywności tych enzymów; wyjątkiem była stymulacja aktywność LPAAT przez jony magnezu. Dodatek jonów potasu do reakcji enzymatycznych prowadzi do inhibicji aktywności wszystkich z badanych enzymów LPLAT.
3. Wszystkie z badanych enzymów LPLAT nasion *C. sativa*, w reakcjach typu *forward* charakteryzują się dominującą preferencją w stosunku do 18-węglowych nienasyconych acylo-CoA. Dodatkowo enzymy LPEAT oraz LPAAT wykazują wysoką zdolność do wykorzystywania 16:0-CoA. W przypadku reakcji typu *backward* enzymy te przeprowadzają ją najintensywniej w obecności 18:1-CoA, nieco mniej intensywnie w obecności 18:2-CoA i najmniej intensywnie w obecności 18:3-CoA. Aktywność enzymów LPLAT w stosunku do poszczególnych donorów grup acylowych zmienia się w zależności od stadium rozwoju nasion. Niemniej jednak preferencje odnotowane dla reakcji *forward* oraz *backward*, w których zastosowano jeden rodzaj cząsteczek acylo-CoA, jak i w testach z zastosowaniem mieszaniny tych substratów oraz w obecności BSA (imitującego w testach *in vitro* białka ACBP obecne w warunkach naturalnych) są zbieżne. Otrzymane wyniki wskazują, że wykrytą preferencję z wysokim prawdopodobieństwem również będą wykazywane przez te enzymy w warunkach naturalnych. Należy jednak zaznaczyć, że rodzaj kwasów tłuszczowych użytych do acylacji lizofosfolipidów bądź do

remodelowania fosfolipidów przez enzymy LPLAT *in vivo*, w dużej mierze zależć będzie od dostępnej endogennej puli acylo-CoA.

4. Enzymy LPLAT pełnią istotną rolę w remodelowaniu puli fosfolipidów oraz cytoplazmatycznej puli acylo-CoA występującej w nasionach *Camelina sativa*. Przeprowadzone analizy wykazały, że enzymy LPCAT mogą pełnić kluczową rolę w transferze nienasyconych kwasów tłuszczowych z miejsca ich syntezy, czyli fosfatydylocholiny, do puli acylo-CoA, z której kolejno mogą być wykorzystane przez pozostałe acylotransferazy uczestniczące w biosyntezie lipidów zapasowych oraz remodelowaniu lipidów membranowych. Z kolei udział enzymów LPAAT oraz LPEAT w suplementacji puli acylo-CoA jest stosunkowo niski i wynosi odpowiednio około 5% oraz 2% kwasów tłuszczowych, które ostatecznie znajdują się w dojrzałych nasionach lnicznika pospolitego. Należy jednak pamiętać, że proces remodelowania jest regulowany również przez fosfolipazy A₂ oraz enzymy PDAT. Jak wykazują otrzymane wyniki, reakcje te będą pełniły szczególnie istotną rolę w edycji grup acyloowych puli fosfatydyloetanolaminy.
5. Analiza porównawcza dotycząca profilu acylolipidów obecnych w liściach *Camelina sativa* hodowanej w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* wykazała, że warunki hodowli roślin mają wyraźny wpływ na skład kwasów tłuszczowych oraz zawartość i kompozycję poszczególnych klas lipidów. Liście roślin z warunków *in vitro* charakteryzują się znacznym spadkiem zawartości kwasów trienowych (16:3 oraz 18:3) oraz zmniejszoną zawartością galaktolipidów. Z drugiej strony względna zawartość fosfolipidów (fosfatydylocholiny oraz fosfatydyloetanolaminy), a także lipidów obojętnych istotnie wzrasta, co dowodzi, że najprawdopodobniej szlak prokariotyczny syntezy glicerolipidów w tych warunkach jest mniej wydajny. Zaobserwowane efekty są podobne do tych wywoływanych przez stres cieplny.
6. Aktywność enzymów LPEAT w liściach roślin hodowanych w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* nie koreluje z ekspresją genów kodujących te enzymy. Ekspresja w obu rodzajach tkanek jest porównywalna. Niemniej jednak zarówno enzymy LPEAT, jak i LPCAT oraz LPAAT wykazują, co najmniej dwukrotnie wyższą aktywność w liściach z hodowli *in vitro*. Mechanizm tego zjawiska jest nieznan. Z fizjologicznego punktu widzenia odpowiada jednak na prawdopodobnie

zwiększoną konieczność dostosowania się membran roślinnych do warunków stresowych wywołanych warunkami *in vitro*.

7. Oba z powyższych wniosków jasno wskazują, że wyniki badań dotyczące profilu lipidowego oraz metabolizmu lipidów otrzymane na podstawie eksperymentów przeprowadzonych dla roślin hodowanych w warunkach *in vitro* nie mogą mieć bezpośredniego przełożenia na rośliny hodowane w warunkach fitotronowych *in vivo*, czy też w warunkach naturalnych.
8. Intensywność remodelowania fosfolipidów oraz udział w tym procesie enzymów LPLAT oraz innych enzymów takich jak fosfolipazy oraz PDAT zależą między innymi, od klasy fosfolipidów podlegających remodelowaniu. Niezwykle istotny wpływ na ten proces ma miejsce jego zachodzenia, a zatem funkcja jaką pełnią dane tkanki roślinne. Ponadto wyraźny wpływ na efektywność edycji grup acylowych mają warunki w jakich hodowane są rośliny uwzględniając w to hodowle *in vivo* oraz *in vitro* (w której remodelowanie zachodzi efektywniej) oraz temperatura, której wzrost stymuluje aktywność tego proces.
9. Zmieniające się tendencje dotyczące aktywności oraz specyficzności substratowej enzymów CsLPCAT, CsLPAAT oraz CsLPEAT obecnych we frakcjach mikrosomalnych otrzymanych z różnych stadiów rozwojowych nasion, z liści hodowanych w warunkach *in vivo* oraz *in vitro* oraz w zależności od temperatury, mogą wynikać z różnych proporcji poszczególnych izoenzymów danej grupy enzymów CsLPLAT obecnych w tych frakcjach mikrosomalnych. Każda z izoform wymienionych wyżej grup enzymów CsLPLAT jest kodowana przez trzy warianty genów.
10. Analiza filogenetyczna przeprowadzona dla sekwencji białkowych poszczególnych izoenzymów CsLPEAT wykazuje, że izoenzymy opisane jako CsLPEAT1c oraz CsLPEAT2c są kodowane przez geny pochodzące z genomu *Camelina hispida*, podczas gdy pozostałe izoformy kodowane są przez geny pochodzące z genomu auto-allotetraploidalnej *Camelina neglecta*.

11. System drożdżowy (*Saccharomyces cerevisiae*) wykorzystany do badań nad charakterystyką biochemiczną oraz specyficzną substratową izoenzymów CsLPEAT wydaje się, że nie do końca odzwierciedla specyficzną substratową tych enzymów jaką wykazują w tkankach z których pochodzą. Profil acylolipidów występujący w membranach komórek drożdży oraz roślin jest rozbieżny, co być może skutkuje nieco innymi preferencjami badanych enzymów w stosunku do testowanych substratów. Wyniki uzyskane w tym systemie muszą więc być traktowane z ostrożnością przy określaniu funkcji fizjologicznej badanych enzymów.

12. Enzymy LPEAT obecne we frakcjach mikrosomalnych otrzymanych z nasion oraz tkanek wegetatywnych wykazywały wrażliwość na temperaturę objawiającą się zmianami ich specyficznosci substratowej. Wszystkie z nich wykazywały dominującą aktywność w stosunku do 18:2-CoA. Niemniej jednak niskie temperatury faworyzowały wykorzystanie 18:3-CoA, podczas gdy wysokie temperatury 18:1-CoA oraz 16:0-CoA. Zaobserwowany wpływ temperatury na specyficzną substratową badanych enzymów koreluje z danymi literaturowymi odnoszącymi się do składu kwasów tłuszczowych lipidów membranowych, w tym puli fosfatydyloetanolaminy, roślin hodowanych w niskich i wysokich temperaturach.

13. Mimo rozbieżności odnotowanych dla specyficznosci substratowej enzymów CsLPEAT pomiędzy systemem drożdżowym do którego wprowadzone zostały geny kodujące te enzymy, a naturalnym miejscem ich występowania w tkankach roślinnych, w obu przypadkach odnotowany został znaczący wpływ temperatury na preferencję substratową tych enzymów. Otrzymane dane wskazują zatem, że enzymy LPEAT mogą pełnić rolę pewnego rodzaju czujników reagujących na zmiany temperatury, a tym samym mogą prowadzić do modyfikacji profilu kwasów tłuszczowych obecnych w puli fosfatydyloetanolaminy w odpowiedzi na ten stres abiotyczny.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abdullah H. M., Akbari P., Paulose B., Schnell D. i in. (2016). Transcriptome profiling of *Camelina sativa* to identify genes involved in triacylglycerol biosynthesis and accumulation in the developing seeds. *Biotechnol. Biofuels*. 9: 136.
2. Abdullah H. M., Chhikara S., Akbari P., Schnell D. J. i in. (2018). Comparative transcriptome and metabolome analysis suggests bottlenecks that limit seed and oil yields in transgenic *Camelina sativa* expressing diacylglycerol acyltransferase 1 and glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Biotechnol. Biofuels*. 11: 335.
3. Abramovič H., Butinar B., Nikolič V. (2007). Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage. *Food Chem*. 104(3): 903–909.
4. Arisz S. A., Testerink C., Munnik T. (2009). Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 1791: 869–875.
5. Arroyo-Caro J. M., Chileh T., Kazachkov M., Zou J. i in. (2013). The multigene family of lysophosphatidate acyltransferase (LPAT)-related enzymes in *Ricinus communis*: cloning and molecular characterization of two LPAT genes that are expressed in castor seeds. *Plant Sci. J*. 199–200: 29–40.
6. Bae S., Park J., Kim J.-S. (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA guided endonucleases. *Bioinform*. 30: 1473–1475.
7. Bagur R., Hajnóczky G. (2017). Intracellular Ca²⁺ sensing: role in calcium homeostasis and signalling. *Mol. Cell*. 66(6): 780–788.
8. Baker R.R., Thompson W. (1973). Selective acylation of 1-acylglycerophosphorylinositol by rat brain microsomes. Comparison with 1-acylglycerophosphorylcholine. *J. Biol. Chem*. 248: 7060-7065.
9. Banaś A., Dahlqvist A., Ståhl U., Lenman M. i in. (2000). The involvement of phospholipid: diacylglycerol acyltransferases in triacylglycerol production. *Biochem. Soc. Trans*. 28: 703-705.
10. Banaś W., Sanchez Garcia A., Banaś A., Stymne S. (2013). Activities of acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT) and phospholipid:diacylglycerol acyltransferase (PDAT) in microsomal preparations of developing sunflower and safflower seeds. *Planta*. 237(6): 1627-1636.

11. Bansal S., Durrett T. P. (2016). *Camelina sativa*: An ideal platform for the metabolic engineering and field production of industrial lipids. *Biochimie*. 120: 9–16.
12. Bao X., Pollard M., Ohlrogge J. (1998). The biosynthesis of erucic acid in developing embryos of *Brassica rapa*. *Plant Physiol*. 118(1): 183–190.
13. Basnet R, Zhang J, Hussain N, Shu Q. (2019). Characterization and Mutational Analysis of a Monogalactosyldiacylglycerol Synthase Gene *OsMGD2* in Rice. *Front Plant Sci*. 10: 992.
14. Bates P. D., Stymne S., Ohlrogge J.B. (2013). Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Curr. Opin. Plant Biol*. 16(3): 358-354.
15. Beaudoin F., Napier J.A. (2004). Biosynthesis and compartmentation of triacylglycerol in higher plants. Lipid metabolism and membrane biogenesis. *Top Curr Genet*. 6: 267-287.
16. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2011). *Biochemia*. s. 715-741. PWN. Warszawa, Polska.
17. Bernardo A., Howard-Hildige R., O'Connell A., Nichol R. i in. (2003). Camelina oil as a fuel for diesel transport engines. *Ind Crops Prod*. 17(3): 191–197.
18. Berti M., Gesch R., Eynck C., Anderson J. i in. (2016). Camelina uses, genetics, genomics, production, and management. *Ind Crops Prod*. 94: 690–710.
19. Birner R., Bürgermeister M., Schneiter R., Daum G. (2001). Roles of phosphatidylethanolamine and of its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*. 12: 997–1007.
20. Blackshaw R., Johnson E, Gan Y., May W. i in. (2011). Alternative oilseed crops for biodiesel feedstock on the Canadian prairies. *Can. J. Plant Sci*. 91: 889-896.
21. Bligh E. G., Dyer W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*. 37: 911–917.
22. Blumwald E., Aharon G., Apse M. (2000) Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 1465(1–2): 140–151.
23. Bourgis F., Kader J. C., Barret P., Renard M. i in. (1999). A plastidal lysophosphatidic acid acyltransferase from oilseed rape. *Plant Physiol*. 120: 913-921.
24. Brigelius-Flohé R., Traber M. G. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*. 13: 1145 – 1155.

25. Brown A. P., Affleck V., Fawcett T., Slabas A. R. (2006). Tandem affinity purification tagging of fatty acid biosynthetic enzymes in *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 57: 1563–1571.
26. Brown A. P., Brough C. L., Kroon J. T. M., Slabas A. R. (1995). Identification of a cDNA that encodes a 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase from *Limnanthes douglasii*. *Plant Mol. Biol.* 29: 267-278.
27. Browse J., Somerville C.R. (1994). Glycerolipids. s. 881-936. W: Meyerowitz E. M., Somerville C. R. (red.) *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Plainview, Nowy Jork, Stany Zjednoczone.
28. Burgal J., Shockey J., Lu C., Dyer J., i in. (2008). Metabolic engineering of hydroxy fatty acid production in plants: RcDGAT2 drives dramatic increases in ricinoleate levels in seed oil. *Plant Biotechnol. J.* 6: 819-831.
29. Cahoon E. B., Li-Beisson Y. (2020). Plant unusual fatty acids: learning from the less common. *Curr. Opin. Plant Biol.* 55: 66-73.
30. Calder P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 39(1): 18S–32S.
31. Campbell M. (2018). Camelina – An Alternative Oil Crop. s. 259-275. W: Kaltschmitt M., Neuling U. (red.) *Biokerosene*. Springer. Berlin/Heidelberg, Niemcy.
32. Canvin D. T. (1965). The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of oils from several oil seed crops. *Canad. J. Bot.* 43: 63–69.
33. Cao Y. Z., Oo K. C., Huang A. H. C. (1990). Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam (*Limnanthes alba*). *Plant Physiol.* 94: 1199–1206.
34. Chen G., Greer M.S., Weselake R.J. (2013). Plant phospholipase A: advances in molecular biology, biochemistry, and cellular function. *Biomol. Concepts.* 4: 527–532.
35. Conn K. L., Tewari J. P., Dahiya J. S. (1988). Resistance to *Alternaria brassicae* and phytoalexin-elicitation in rapeseed and other crucifers. *Plant Sci.* 56: 21-25.
36. Coulon D., Faure L., Grison M., Pascal S. i in. (2020). LPIAT, a lysophosphatidylinositol Acyltransferase, Modulates Seed Germination in *Arabidopsis thaliana* through PIP Signalling Pathways and is Involved in Hyperosmotic Response. *Int J Mol Sci.* 21(5):1654.

37. Chao W.S., Wang H., Horvath D.P., Anderson J.V. (2019). Selection of endogenous reference genes for qRT-PCR analysis in *Camelina sativa* and identification of FLOWERING LOCUS C allele-specific markers to differentiate summer- and winter biotypes. *Ind Crops Prod.* 129: 495–502.
38. Clough R.C., Matthis A.L., Barnum S.R., Jaworski J.G. (1992) Purification and characterization of 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III from spinach. A condensing enzyme utilizing acetyl-coenzyme A to initiate fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* 267: 20992-20998.
39. Colin L. A., Jaillais Y. (2020). Phospholipids across scales: lipid patterns and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 53: 1–9.
40. Constantinides P. P., Steim J. M. (1986). Solubility of palmitoyl-coenzyme A in acyltransferase assay buffers containing magnesium ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 250: 267–270.
41. Dahlqvist A., Ståhl U., Lenman M., Banaś A. i in. (2000). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 6487-6492.
42. Davies H. M., Hawkins D. J., Nelsen J. S. (1995). Lysophosphatidic acid acyltransferase from immature coconut endosperm having medium chain length substrate specificity. *Phytochemistry.* 39: 989–996.
43. de Kroon A. I. P. M. (2007). Metabolism of phosphatidylcholine and its implications for lipid acyl chain composition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1771: 343-352.
44. de Kruijff B. (1997). Lipid polymorphism and biomembrane function. *Curr Opin Chem Biol.* 1: 564–569.
45. Delhaize E., Hebb D.M., Richards K.D., Lin M. i in. (1999). Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA: overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *J. Biol. Chem.* 274: 7082–7088.
46. Demski K., Jeppson S., Stymne S., Lager I. (2021). *Camelina sativa* phosphatidylcholine: diacylglycerol cholinephosphotransferase-catalyzed interconversion does not discriminate between substrates. *Lipids.* 56: 591– 602.

47. Demski K., Łosiewska A., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Klińska S. i in. (2020). Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase1 overexpression delays senescence and enhances post-heat and cold exposure fitness. *Front. Plant Sci.* 11: 611897.
48. D'Herde K., Krysko D.V. (2017). Ferroptosis: Oxidized PEs trigger death. *Nat. Chem. Biol.* 13: 4–5.
49. Dixit S., Jangid V. K., Grover A. (2019). Evaluation of suitable reference genes in *Brassica juncea* and its wild relative *Camelina sativa* for qRT-PCR analysis under various stress conditions. *PLoS One.* 14(9): e0222530.
50. Douce R., Joyard J. (1980). Plant galactolipids. s. 321–362. W: Stumpf P.K. (red.) The biochemistry of plants. Lipids: structure and function. Academic. Nowy Jork, Nowy Jork, Stany Zjednoczone.
51. Doudna J. A., Charpentier E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 346(6213): 1258096.
52. Dörmann P. (2005). Membrane lipids. s. 123–161. W: Murphy D. J. (red.) Plant Lipids. Biology, Utilisation and Manipulation. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, Wielka Brytania.
53. Duarte B., Matos A. R., Marques J. C., Caçador I. (2018). Leaf fatty acid remodeling in the salt-excreting halophytic grass *Spartina patens* along a salinity gradient. *Plant Physiol. Biochem.* 124: 112–116.
54. Durrett T.P., Benning C., Ohlrogge, J. (2008). Plant triacylglycerols as feed stocks for the production of biofuels. *Plant J.* 54: 593–607.
55. Ehrensing D. T., Guy S. O. (2008). Oilseed Crops--Camelina. Oregon State Univ. Ext. Serv. EM8953-E.
56. Engeseth N. J., Pacovskya R. S., Newman T., Ohlrogge J. B. (1996). Characterization of an acyl-CoA-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *Arch. Biochem. Biophys.* 331(1): 55–62.
57. Enjalbert J.N., Zheng S., Johnson J.J., Mullen J.L. i in. (2013). Brassicaceae germplasm diversity for agronomic and seed quality traits under drought stress. *Ind. Crops Prod.* 47: 176-185.
58. Eto M., Shindou H., Yamamoto S., Tamura-Nakano M. i in. (2020). Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase 2 (LPEAT2) incorporates DHA into phospholipids and has possible functions for fatty acid-induced cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 526: 246–252.

59. Essigmann B., Güler S., Narang R. A., Linke D., i in. (1998). Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(4): 1950-5.
60. Fahs Z., Rossez Y., Guénin S., Gutierrez L. i in. (2019). Cloning and molecular characterization of three lysophosphatidic acid acyltransferases expressed in fax seeds. *Plant Sci.* 280: 41–50.
61. Falcone D. L., Ogas J. P., Somerville C. R. (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol.* 4: 17.
62. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol.* 39: 783–791.
63. Frentzen M. (1998). Acyltransferases from basic science to modified seed oils. *Fett-Lipid.* 100(4-5): 161–166.
64. Gao J., Ajjawi I., Manoli A., Sawin A. i in. (2009). FATTY ACID DESATURASE4 of *Arabidopsis* encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases. *Plant J.* 60: 832–839.
65. Gao H., Gao Y., Zhang F., Liu B. i in. (2021). Functional characterization of an novel acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 3-3 (CsDGAT3-3) gene from *Camelina sativa*. *Plant Sci.* 303: 110752.
66. Gibellini F., Smith T. K. (2010) The Kennedy pathway-De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life.* 62: 414-428.
67. Gietz R. D., Woods R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Meth. Enzymol.* 350: 87–96.
68. Głąb B., Beganovic M., Anaokar S., Hao M.S. i in. (2016). Cloning of glycerophosphocholine acyltransferase (GPCAT) from fungi and plants: a novel enzyme in phosphatidylcholine synthesis. *J. Biol. Chem.* 291: 25066–25076.
69. Gombos Z., Várkonyi Z., Hagi M., Iwako M. i in. (2002). Phosphatidylglycerol requirement for the function of electron acceptor plastoquinone Q B in the photosystem II reaction center. *Biochemistry.* 41: 3796–3802.
70. Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A., Saenger W. (2009). Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16: 334–342.

71. Haeussler M., Schönig K., Eckert H., Eschstruth A. i in. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* 17: 148.
72. Han L., Usher S., Sandgrind S., Hassall K. i in. (2020). High level accumulation of EPA and DHA in field-grown transgenic Camelina – a multi-territory evaluation of TAG accumulation and heterogeneity. *Plant Biotechnol. J.* 18(11): 2280–2291.
73. Harayama T., Riezman H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19: 281–296.
74. Härtel H., Dormann P., Benning C. (2000). DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(19): 10649-54.
75. Heldt H.-W., Piechulla B. (2011). Lipids are membrane constituents and function as carbon stores. *J. Plant Biochem.* 359–398.
76. Hepler P. K. (2005). Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell.* 17(8): 2142–2155.
77. Higashi Y., Okazaki Y., Takano K., Myouga F. i in. (2018). Remodels chloroplastic monogalactosyldiacylglycerol by liberating α -linolenic acid in Arabidopsis leaves under heat stress. *Plant Cell.* 30: 1887–1905.
78. Hishikawa D., Shindou H., Kobayashi S., Nakanishi H. i in. (2008). Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 2830–2835.
79. Holub J. (1980) The biosynthesis of phosphatidylserines by acylation of 1-acyl-sn-glycero-3-phosphoserine in rat liver. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 618: 255-62.
80. Hong Y., Zhao J., Guo L., Kim S.C. i in. (2016). Plant phospholipases D and C and their diverse functions in stress responses. *Prog. Lipid Res.* 62: 55–74.
81. Hope M. J., Cullis P. R. (1980). Effects of divalent cations and pH on phosphatidylserine model membranes: a ³¹P NMR study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92(3): 846-852.
82. Hölzl G., Witt S., Gaude N., Melzer M. i in. (2009). The Role of Diglycosyl Lipids in Photosynthesis and Membrane Lipid Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 150(3): 1147–1159.

83. 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. *J. Biochem.* 167(2): 339–347.
84. Ichimura Y., Kirisako T., Takao T., Satomi Y. i in. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature.* 408: 488–492.
85. Janik E., Bednarska J., Zubik M., Puzio M., i in. (2013). Molecular architecture of plant thylakoids under physiological and light stress conditions: A study of lipid-light-harvesting complex II model membranes. *Plant Cell.* 25(6): 2155–2170.
86. Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Demski K., Gidda S. K., Klińska S. i in. (2021). Subcellular localization of acyl-CoA: Lysophosphatidylethanolamine acyltransferases (LPEATs) and the effects of knocking-out and overexpression of their genes on autophagy markers level and life span of *A. thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 3006.
87. Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Demski K., Lager I., Szymne S. i in. (2016). Possible role of different yeast and plant lysophospholipid:acyl-CoA acyltransferases (LPLATs) in acyl remodelling of phospholipids. *Lipids.* 51: 15–23.
88. Jolivet P., Roux E., d'Andrea S., Davanture M. i in. (2004). Protein composition of oil bodies in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol. Biochem.* 42:501–509.
89. Jones, M.R. (2007). Lipids in photosynthetic reaction centres: structural roles and functional holes. *Prog. Lipid Res.* 46: 56–87.
90. Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., Yamamoto A. i in. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19: 5720–5728.
91. Kagale S., Koh C., Nixon J., Bollina V., i in. (2014). The emerging biofuel crop *Camelina sativa* retains a highly undifferentiated hexaploid genome structure. *Nat. Commun.* 5: 3706.
92. Kang J., Snapp A. R., Lu C. (2011). Identification of three genes encoding microsomal oleate desaturases (FAD2) from the oilseed crop *Camelina sativa*. *Plant Physiol. Biochem.* 49: 223–229.
93. Karley A. J., White P. J. (2009). Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 291–298.
94. Kates M., Pugh E.L., Ferrante G. (1984). Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. *Biomembranes.* 12: 379–395.

95. Kaup M. T., Froese C. D., Thompson J. E. (2002). A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol.* 129: 1616-1626.
96. Kennedy E. P. (1961). Biosynthesis of complex lipids. *Fed. Proc.* 20: 934– 940.
97. Kim H. U., Huang A. H. C. (2004). Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134: 1206–1216.
98. Kim H. U., Li Y., Huang A. H. C. (2005). Ubiquitous and endoplasmic reticulum–located lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT2, is essential for female but not male gametophyte development in Arabidopsis. *Plant Cell.* 17: 1073–1089.
99. Klińska S., Demski K., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Banaś A. (2021a). LPEATs Tailor Plant Phospholipid Composition through Adjusting Substrate Preferences to Temperature. *Int. J. Mol. Sci.* 22: 8137.
100. 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.
101. Klińska S., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Demski K., Banaś A. (2020). Editing of phosphatidic acid and phosphatidylethanolamine by acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases in developing *Camelina sativa* seeds. *Planta.* 10: 4.
102. Klińska S., Kędzierska S., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., Banaś A. (2021b). In Vitro Growth Conditions Boost Plant Lipid Remodelling and Influence Their Composition. *Cells.* 10: 2326.
103. Knutzon D. S., Lardizabal K. D., Nelsen J. S., Bleibaum J. L. i in. (1995). Cloning of a coconut endosperm cDNA encoding a 1-acyl-snglycerol-3-phosphate acyltransferase that accepts medium-chain-length substrates. *Plant Physiol.* 109: 999-1006.
104. Kobayashi K., Kondo M., Fukuda H., Nishimura M. i in. (2007). Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 17216–17221.
105. Kobayashi K., Wada H. (2016). Role of Lipids in Chloroplast Biogenesis. *Subcell Biochem.* 86: 103-25.
106. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. i in. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547–1549.

107. Lager I., Jeppson S., Gippert A.-L., Feussner I. i in. (2020). Acyltransferases Regulate Oil Quality in *Camelina sativa* Through Both Acyl Donor and Acyl Acceptor Specificities. *Front. Plant Sci.* 11: 1144.
108. Lager I., Yilmaz J. L., Zhou X. R., Jasieniecka K. i in. (2013). Plant acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferases (LPCATs) have different specificities in their forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 288(52): 36902–36914.
109. Lands W.E. (1958) Metabolism of glycerolipids: A comparison of lecithin and triglyceride synthesis. *J. Biol. Chem.* 231: 883-888.
110. Laurent P., Huang A. H. C. (1992). Organ- and development-specific acyl coenzyme A lysophosphatidate acyltransferases in palm and meadowfoam. *Plant Physiol.* 99(4): 1711–1715.
111. Lassner M. W., Levering C. K., Davies H. M., Knutzon D. S. (1995). Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the sn-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil. *Plant Physiol.* 109(4): 1389–1394.
112. Lebedevas S., Pukalskas S., Žaglinskis J., Matijošius J. (2012). Comparative investigations into energetic and ecological parameters of camelina based biofuel used in the 1Z diesel engine. *Transport.* 27(2): 171– 177.
113. Lee H. C., Inoue T., Imae R., Kono N. i in. (2008). *Caenorhabditis elegans* mboa-7, a member of the MBOAT family, is required for selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol. *Mol. Biol. Cell.* 19(3): 1174-84.
114. Li-Beisson Y., Shorrosh B., Beisson F., Andersson M. X. i in. (2013). *Arabidopsis* Book. s. 1–70. Robt L., (red.) American Society of Plant Biologist. Rockville, Maryland, Stany Zjednoczone.
115. Li H., Barbetti M. J., Sivasithamparam K. (2005). Hazard from reliance on cruciferous hosts as sources of major gene-based resistance for managing blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease. *Field Crop Res.* 91: 185-198.
116. Li J., Wang X., Zhang T., Wang C. i in. (2015). A Review on Phospholipids and Their Main Applications in Drug Delivery Systems. *Asian J. Pharm. Sci.* 10(2): 81–98.

117. Li Q., Shen, W., Zheng, Q., Fowler, D.B. Zou, J. (2016) Adjustments of lipid pathways in plant adaptation to temperature stress. *Plant Signal. Behav.* 11: e1058461.
118. Li Q., Zheng Q., Shen W., Cram D., i in. (2015). Understanding the biochemical basis of temperature-induced lipid pathway adjustments in plants. *Plant Cell.* 27(1): 86–103.
119. Liu Y., Wang G., Wang X. (2015). Role of Aminoalcoholphosphotransferases 1 and 2 in Phospholipid Homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell.* 27(5): 1512–1528.
120. Los D.A., Murata N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 1666: 142–157.
121. Lovett J. V. and Jackson, H. F. (1980). Allelopathic activity of *Camelina sativa* (L.) Crantz in relation to its phyllosphere bacteria. *New Phytol.* 86: 273–277.
122. Löffke C., Ischebeck T., König S., Freitag S. i in. (2008). Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by phosphatidylinositol synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 413: 115–124.
123. Lu B., Xu C., Awai K., Jones A. D. i in. (2007). A small ATPase protein of Arabidopsis, TGD3, involved in chloroplast lipid import. *J. Biol. Chem.* 282: 35945–35953.
124. Lu C., Kang J. (2008). Generation of transgenic plants of a potential oilseed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 27: 273–278.
125. Lu C., Xin Z., Ren Z., Miquel M. i in. (2009). An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the *RODI* gene of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 18837–18842.
126. Maathuis F. J. M. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 250–25.
127. Maatta S., Scheu B., Roth M. R. Tamura P. in. (2012). Levels of *Arabidopsis thaliana* Leaf Phosphatidic Acids, Phosphatidylserines, and Most Trienoate-Containing Polar Lipid Molecular Species Increase during the Dark Period of the Diurnal Cycle. *Front. Plant Sci.* 3: 49.
128. Malik M. R., Tang J., Sharma N., Burkitt C. i in. (2018). *Camelina sativa*, an oilseed at the nexus between model system and commercial crop. *Plant Cell Rep.* 37(10): 1367-1381.

129. Mandáková T., Pouch M., Brock J. R., Al-Shehbaz I. A. i in. (2019). Origin and Evolution of Diploid and Allopolyploid *Camelina* Genomes Were Accompanied by Chromosome Shattering. *Plant Cell*. 31(11): 2596-2612.
130. Mapelli-Brahm A., Sánchez R., Pan X., Moreno-Pérez A. J. (2020). Functional Characterization of Lysophosphatidylcholine: Acyl-CoA Acyltransferase Genes From Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Front. Plant Sci*. 11: 403.
131. Marchler-Bauer A., Derbyshire M. K., Gonzales N. R., Lu S. i in. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res*. 43: D222-6.
132. Marmon S., Sturtevant D., Herrfurth C., Chapman K. i in. (2017). Two acyltransferases contribute differently to linolenic acid levels in seed oil. *Plant Physiol*. 173: 2081– 2095.
133. Marshall M. O., Kates M. (1974). Biosynthesis of Nitrogenous Phospholipids in Spinach Leaves. *Can. J. Biochem*. 52(6): 469-482.
134. Martinelli T., Galasso I. (2011). Phenological growth stages of *Camelina sativa* according to the extended BBCH scale. *Ann Appl Biol*. 158(1): 87–94.
135. Meijer H. J. G., Munnik T. (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol*. 54: 265–306.
136. Miquel M., Browse J. (1992). Arabidopsis mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *J. Biol. Chem*. 267: 1502–1509.
137. Moellering E. R., Muthan B., Benning C. (2010). Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science*. 330: 226–228.
138. Moomaw A. S., Maguire M. E. (2008). The unique nature of Mg²⁺ channels. *Physiol*. 23: 275–285.
139. Moore T. S. (1975). Phosphatidylserine Synthesis in Castor Bean Endosperm. *Plant Physiol*. 56(2): 177–180.
140. Murakami Y., Tsuyama M., Kobayashi Y., Kodama, H. i in. (2000). Trienoic Fatty Acids and Plant Tolerance of High Temperature. *Science*. 287: 476–479.
141. Müller F., Frentzen M. (2001). Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett*. 5098(1): 298–302.
142. Nakanishi H., Shindou H., Hishikawa D., Harayama T. i in. (2006). Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production. *J. Biol. Chem*. 281: 20140–20147.

143. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*. 130(1): 165-78.
144. Nerlich A., von Orlow M., Rontein D., Hanson A.D. i in. (2007). Deficiency in phosphatidylserine decarboxylase activity in the *psd1 psd2 psd3* triple mutant of *Arabidopsis* affects phosphatidylethanolamine accumulation in mitochondria. *Plant Physiol*. 144: 904–914.
145. Nguyen H. T., Park H., Koster K. L., Cahoon R. E. i in. (2015). Redirection of metabolic flux for high levels of omega-7 monounsaturated fatty acid accumulation in *Camelina* seeds. *Plant Biotechnol. J.* 13: 38–50.
146. Nguyen H. T., Silva J. E., Podicheti R., Macrander J. i in. (2013). *Camelina* seed transcriptome: a tool for meal and oil improvement and translational research. *Plant Biotechnol. J.* 11(6): 759-69.
147. Nilsson A.K., Johansson O.N., Fahlberg P., Kommuri, M. i in. (2015). Acylated monogalactosyl diacylglycerol: prevalence in the plant kingdom and identification of an enzyme catalyzing galactolipid head group acylation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 84: 1152–1166.
148. Ohlrogge J., Browse J. (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell*. (7): 957-70.
149. Ohlrogge J., Jaworski J.G. (1997). Regulation of Fatty Acid Synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 109-136.
150. Okuley J., Lightner J., Feldmann K., Yadav N. i in. (1994). *Arabidopsis* FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell*. 6(1):147-58.
151. Oo K. C., Huang A. H. (1989). Lysophosphatidate acyltransferase activities in the microsomes from palm endosperm, maize scutellum, and rapeseed cotyledon of maturing seeds. *Plant Physiol*. 91: 1288–1295.
152. Ozseyhan M.E., Kang J., Mu X., Lu C. (2018). Mutagenesis of the *FAEI* genes significantly changes fatty acid composition in seeds of *Camelina sativa*. *Plant Physiol. Biochem.* 123: 1-7.
153. Qin F., Lin L., Jia Y., Li W. i in. (2020). Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids under two types of heat stress. *Plants*. 9: 693.
154. Pan X., Chen G., Kazachkov M., Greer M. S. i in. (2015). *In vivo* and *in vitro* evidence for biochemical coupling of reactions catalyzed by

- lysophosphatidylcholine acyltransferase and diacylglycerol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 290: 18068–18078.
155. Pappan K., Austin-Brown S., Chapman K. D., Wang X. (1998). Substrate selectivities and lipid modulation of plant phospholipase D alpha, -beta, and -gamma. *Arch. Biochem. Biophys.* 353: 131–140.
 156. Platre M. P., Noack L. C., Doumane M., Bayle V. i in. (2018). A combinatorial lipid code shapes the electrostatic landscape of plant endomembranes. *Dev. Cell.* 45: 465–480.
 157. Połośńska A., Jasieniecka-Gazarkiewicz K., You L., Hao X. i in. (2021). Diatoms and Plants Acyl-CoA:lysophosphatidylcholine Acyltransferases (LPCATs) Exhibit Diverse Substrate Specificity and Biochemical Properties. *Int. J. Mol. Sci.* 22(16): 9056.
 158. Post-Beittenmiller D., Roughan G., Ohlrogge J. B. (1992). Regulation of plant fatty acid biosynthesis: Analysis of acyl-coenzyme A and acyl-acyl carrier protein substrate pools in spinach and pea chloroplasts. *Plant Physiol.* 100: 923–930.
 159. Putnam D. H., Budin J. T., Field L. A., Breene, W. M. (1993). *Camelina: A promising low-input oilseed.* s. 314–322. W: Janick J., Simon J. E. (red.). *New Crops.* Wiley. New York, Stany Zjednoczone.
 160. Renne M. F., Bao X., De Smet C. H., de Kroon A. I. P. M. (2016). Lipid acyl chain remodeling in yeast. *Lipid Insights.* 8(S1): 33–40.
 161. Reszczyńska E., Hanaka A. (2020). Lipids Composition in Plant Membranes. *Cell Biochem. Biophys.* 78(4): 401–414.
 162. Roberts J. A., Digby H. R., Kara M., El Ajouz S. i in. (2008). Cysteine substitution mutagenesis and the effects of methanethiosulfonate reagents at P2X2 and P2X4 receptors support a core common mode of ATP action at P2X receptors. *J. Biol. Chem.* 283: 20126–20136.
 163. Rock C. O. (1984). Turnover of fatty acids in the 1-position of phosphatidylethanolamine in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 259: 6188–6194.
 164. Rockenfeller P., Koska M., Pietrocola F., Minois N. i in. (2015). Phosphatidylethanolamine positively regulates autophagy and longevity. *Cell Death Differ.* 22: 499–508.
 165. Rodríguez-Rodríguez M. F., Moreno-Pérez A. J., Makni S., Troncoso-Ponce M. A. i in. (2021). Lipid profiling and oil properties of *Camelina sativa* seeds engineered

- to enhance the production of saturated and omega-7 fatty acids. *Ind Crops Prod.* 170: 113765.
166. Rodríguez-Rodríguez M. F., Sanchez-Garcia A., Salas J. J., Garces R. i in. (2013). Characterization of the morphological changes and fatty acid profile of developing *Camelina sativa* seeds. *Ind Crops Prod.* 50: 673–679.
 167. Ruelland E., Vaultier M. N., Zachowski A., Hurry V. (2009). Cold signalling and cold acclimation in plants. *Adv. Bot. Res.* 49: 35–150.
 168. Ruiz-Lopez B. R., Usher S., Salas J. J., Haslam R. P. i in. (2016). Tailoring the composition of novel wax esters in the seeds of transgenic *Camelina sativa* through systematic metabolic engineering. *Plant Biotechnol. J.* 15: 837–849.
 169. Ruiz-Lopez N., Haslam R.P., Napier J. A., Sayanova, O. (2014). Successful high-level accumulation of fish oil omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in a transgenic oilseed crop. *Plant J.* 77(2): 198–208.
 170. Saidi Y., Peter M., Finka A., Cicekli C. i in. (2010). Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca²⁺-dependent heat shock response. *Plant Signal. Behav.* 5: 1530–1533.
 171. Sato N., Suda K., Tsuzuki, M. (2004). Responsibility of phosphatidylglycerol for biogenesis of the PSI complex. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1658: 235–243.
 172. Saucke H., Ackermann, K. (2006). Weed suppression in mixed cropped grain peas and false flax (*Camelina sativa*). *Weed Res.* 46: 453–461.
 173. Schulte L. R., Ballard T., Samarakoon T., Yao L. (2013). Increased growing temperature reduces content of polyunsaturated fatty acids in four oilseed crops. *Ind Crops Prod.* 51: 212–219.
 174. Séguin-Swartz G., Eynck C., Gugel R. K., Strelkov S. E. i in. (2009). Diseases of *Camelina sativa* (false flax). *Can. J. Plant Pathol.* 31: 375-386.
 175. Shanklin J., Cahoon E.B. (1998). Desaturation and related modifications of fatty acids 1. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 611–641.
 176. Sharma G., Dinesh Kumar V., Haque A., Bhat S. R. i in. (2002). *Brassica coenospecies*: a rich reservoir for genetic resistance to leaf spot caused by *Alternaria brassicae*. *Euphytica.* 125: 411-417.
 177. Shindou H., Shimizu, T. (2009). Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *J. Biol. Chem.* 284: 1–5.
 178. Shockey J. M., Gidda S. K., Chapital D. C., Kuan J. C. i in. (2006). Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis

- and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell*. 18: 2294–2313.
179. Singer S.J., Nicolson G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175: 720–731.
 180. Slack C.R., Campbell L.C., Browse J.A., Roughan P.G. (1983). Some evidence for the reversibility of the cholinephosphotransferase-catalysed reaction in developing linseed cotyledons in vivo. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 754: 10–20.
 181. Snapp A. R., Kang J., Qi X., Lu, C. (2014). A fatty acid condensing enzyme from *Physaria fendleri* increases hydroxy fatty acid accumulation in transgenic oilseeds of *Camelina sativa*. *Planta*. 240: 599–610.
 182. Somerville C., Browse J., Jaworski J.G., Ohlrogge J. (2000). Lipids. s. 456-527. W: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (red.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist. Rockville, Maryland, Stany Zjednoczone.
 183. Soupene E., Fyrst H., Kuypers F. A. (2008). Mammalian acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 105(1): 88–93.
 184. Ståhl U., Ståhlberg K., Stymne S., Ronne H. (2008). A family of eukaryotic lysophospholipid acyltransferases with broad specificity. *FEBS Lett*. 582: 305–309.
 185. Stobart K., Mancha M., Lenman M., Dahlqvist A. i in. (1997). Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L) seeds. *Planta*. 203: 58–66.
 186. Ståhlberg K. Ståhl U. Stymne S. Ohlrogge, J. (2009). Characterization of two *Arabidopsis thaliana* acyltransferases with preference for lysophosphatidylethanolamine. *BMC Plant Biol*. 9: 60.
 187. Stroebel D., Choquet Y., Popot J.L., Picot D. (2003). An atypical haem in the cytochrome b6f complex. *Nature*. 426: 413–418.
 188. Stymne S., Glad G. (1981). Acyl exchange between oleoyl-CoA and phosphatidylcholine in microsomes of developing soya bean cotyledons and its role in fatty acid desaturation. *Lipids*. 16: 298–305.
 189. Stymne S., Stobart A. K. (1984). The biosynthesis of triacylglycerols in microsomal preparations of developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem J*. 220: 481–488.

190. Stymne S., Stobart, A. K. (1985). Oil synthesis *in vitro* in microsomal membranes from developing cotyledons of *Linum usitatissimum* L. *Planta*. 164: 101–104.
191. Sui N., Wang Y., Liu S., Yang Z. i in. (2018). Transcriptomic and physiological evidence for the relationship between unsaturated fatty acid and salt stress in peanut. *Front. Plant Sci.* 9: 7.
192. Testerink C., Munnik T. (2011). Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J. Exp. Bot.* 62(7):2349-61.
193. van de Loo F. J., Fox B. G., Somerville C. (1993). Unusual fatty acids. s. 91–126. W: Moore T. S. *Lipid Metabolism in Plants*. CRC Press. Boca Raton, Floryda, Stany Zjednoczone.
194. van Meer G., Voelker D. R., Feigenson G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 112–124.
195. Vance D. E., Vance J. E. (2008). *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 5th edition. Elsevier. Nowy Jork, Nowy Jork, Stany Zjednoczone.
196. Vick B., Beevers H. (1977). Phosphatidic acid synthesis in castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 59: 459-463.
197. Wang K., Guo Q., Froehlich J. E., Hersh H. L. i in. (2018). Two abscisic acid-responsive plastid lipase genes involved in jasmonic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 30: 1006–1022.
198. Wang L., Shen W., Kazachkov M., Chen G. i in. (2012). metabolic interactions between the Lands cycle and the Kennedy pathway of glycerolipid synthesis in *Arabidopsis* developing seeds. *Plant Cell*. 24: 4652–4669.
199. Welti R., Li W., Li M., Sang Y. i in. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D alpha in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277: 31994–32002.
200. Weselake R. J. (2005). Storage lipids. s. 162-225. W: Murphy D. J. (red.). *Plant Lipids. Biology, Utilisation and Manipulation*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, Wielka Brytania.
201. Wolf R. B., Cavins J. F., Kleiman R., Black L.T. (1982). Effect of temperature on soybean seed constituents: Oil, protein, moisture, fatty acids, amino acids and sugars. *J Am Oil Chem Soc.* 59: 230–232.
202. Wysocki D. J., Chastain T. G., Schillinger W. F., Guy S. O. i in. (2013). Camelina: Seed yield response to applied nitrogen and sulfur. *Field Crops Res.* 145: 60-66.

203. Xu C., Fan J., Riekhof W., Froehlich J.E., Benning C. (2003). A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in Arabidopsis. *EMBO J.* 22: 2370–2379.
204. Xue H.W., Hosaka K., Plesch G., Mueller-Roeber B. (2000). Cloning of *Arabidopsis thaliana* phosphatidylinositol synthase and functional expression in the yeast *pis* mutant. *Plant Mol. Biol.* 42: 757–764.
205. Yaeno T., Matsuda O., Iba K. (2004). Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant J.* 40: 931–941.
206. Yang Y., Cao J., Shi Y. (2004). Identification and characterization of a gene encoding human LPGAT1, an endoplasmic reticulum-associated lysophosphatidylglycerol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 279(53): 55866-74.
207. Yao H. Y., Xue H. W. (2018). Phosphatidic acid plays key roles regulating plant development and stress responses. *J. Integr. Plant Biol.* 60(9): 851-863.
208. Yu L., Zhou C., Fan J., Shanklin J. i in. (2021). Mechanisms and functions of membrane lipid remodeling in plants. *Plant J.* 107(1): 37-53.
209. Yuan L., Mao X., Zhao K., Ji X. i in. (2017a). Characterisation of phospholipid: Diacylglycerol acyltransferases (PDATs) from *Camelina sativa* and their roles in stress responses. *Biol. Open.* 6: 1024–1034.
210. Yuan L., Mao X., Zhao K., Sun Y. i in. (2017b). Spatio-temporal expression and stress responses of DGAT1, DGAT2 and PDAT responsible for TAG biosynthesis in *Camelina sativa*. *Emir. J. Food Agric.* 29(4): 274-284.
211. Yurchenko O. P., Nykiforuk C. L., Moloney M. M., Ståhl U. i in. (2009). A 10-kDa acyl-CoA-binding protein (ACBP) from *Brassica napus* enhances acyl exchange between acyl-CoA and phosphatidylcholine. *Plant Biotechnol. J.* 7: 602–610.
212. Zanetti F., Alberghini B., Marjanović Jeromela A., Grahovac N. i in. (2021). Camelina, an ancient oilseed crop actively contributing to the rural renaissance in Europe. A review. *Agron Sustain Dev.* 41: 2.
213. Zárata R., El Jaber-Vazdekis N., Tejera N., Pérez J. A. i in. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin Translat Med.* 6: 25.
214. Zhang J., Kenworthy K., Unruh J. B., Erickson J. i in. (2017). Changes of leaf membrane fatty acid composition and saturation level of warm season turfgrass during drought stress. *Crop Sci.* 57(5): 2843–2851.
215. Zhu J.-K. (2016). Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell.* 167(2): 313–324.

216. Zubr J. (2010). Carbohydrates, vitamins and minerals of *Camelina sativa* seed. *Food Sci. Nutr.* 40(5): 523–531.
217. Zubr J. (1997). Oil-seed crop: *Camelina sativa*. *Ind Crops Prod.* 6: 113–119.

Strongy internetowe:

1. <http://www.camelinadb.ca>
2. <https://inspection.canada.ca/plant-varieties/plants-with-noveltraits/applicants/directive-94-08/biology-documents/camelina-sativa-l-/eng/1330971423348/1330971509470> (Canadian Food Inspection Agency, Government of Canada, 2017)
3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>
4. <https://www.scopus.com/home.uri> (SCOPUS)

Tabela A1. Zawartość i skład kwasów tłuszczowych obecnych w nasionach *C. sativa* we wszystkich analizowanych etapach ich rozwoju. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi ($n \geq 3$). DAF – days after flowering (ang.) – dni po kwitnieniu.

DAF	Średnia nmol/nasiono	Kwasy tłuszczowe [%]							
		16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	22:1	Inne
6	8,42	38,23	22,07	-	29,52	10,40	-	-	-
	±1,96	±5,73	±3,23	-	±4,45	±1,7	-	-	-
10	34,24	22,43	6,39	15,52	43,80	11,87	-	-	-
	±5,13	±4,2	±1,32	±2,68	±2,71	±0,97	-	-	-
14	153,75	15,03	5,92	24,76	40,65	11,48	1,32	-	0,84
	±12,18	±0,25	±0,35	±0,44	±1,49	±0,86	±0,67	-	±0,18
17	216,09	10,89	6,92	22,03	34,32	15,61	6,54	0,80	2,88
	±8,97	±1,2	±0,23	±2,15	±2,35	±2,1	±2,4	±0,51	±0,77
21	698,00	8,87	5,12	14,44	27,62	24,26	12,25	2,26	5,18
	±29,57	±0,8	±0,25	±0,89	±1,09	±1,49	±0,8	±0,24	±0,42
24	892,80	8,61	4,32	14,03	25,38	26,81	13,34	2,31	5,21
	±68,84	±0,15	±0,19	±1,21	±0,64	±0,78	±0,25	±0,34	±0,53
26	1139,36	8,69	3,78	11,69	23,67	28,63	14,45	3,00	6,11
	±52,21	±0,4	±0,05	±0,8	±2,21	±2,47	±0,35	±0,14	±0,31
31	1315,65	8,68	3,40	10,16	19,61	33,45	14,93	3,11	6,66
	±32,83	±0,17	±0,14	±0,38	±1,23	±1,45	±0,22	±0,12	±0,18
35	1241,66	7,78	3,07	10,02	19,70	34,81	14,47	3,16	6,99
	±78,42	±0,25	±0,03	±0,29	±0,78	±1,13	±0,3	±0,13	±0,18
38	1237,85	7,02	3,41	11,09	21,66	30,76	15,76	3,33	6,98
	±91,58	±1,41	±0,1	±0,24	±0,46	±1,06	±1,66	±0,43	±0,52
41	1300,24	5,33	3,27	10,53	19,80	32,39	16,53	3,59	7,82
	±55,29	±2,79	±0,25	±0,3	±0,15	±3,13	±3,21	±1,18	±1,74
Dojrzałe	1412,07	7,47	2,65	11,96	18,35	37,33	12,69	2,95	6,56
	±72,11	±0,13	±0,19	±0,2	±0,54	±0,82	±0,29	±0,12	±0,11

Tabela A2. Zawartość i skład kwasów tłuszczowych przypisanych do grupy „Inne” w nasionach *C. sativa* w analizowanych etapach ich rozwoju. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi ($n \geq 3$). „-”, – poniżej poziomu detekcji. DAF – days after flowering (ang.) – dni po kwitnieniu.

DAF	Średnia nmol/nasiono	Inne: kwasy tłuszczowe [%]					
		20:0	20:2	20:3	22:0	24:0	24:1
6	8,42	-	-	-	-	-	-
	±1,96	-	-	-	-	-	-
10	34,24	-	-	-	-	-	-
	±5,13	-	-	-	-	-	-
14	153,75	0,84	-	-	-	-	-
	±12,18	±0,18	-	-	-	-	-
17	216,09	1,94	0,55	0,39	-	-	-
	±8,97	±0,45	±0,27	±0,05	-	-	-
21	698,00	2,40	1,36	0,56	0,41	0,07	0,38
	±29,57	±0,12	±0,15	±0,1	±0,01	±0,12	±0,01
24	892,80	2,16	1,48	0,69	0,37	0,15	0,37
	±68,84	±0,19	±0,09	±0,09	±0,03	±0,13	±0,06
26	1139,36	2,30	1,71	0,82	0,41	0,35	0,52
	±52,21	±0,07	±0,07	±0,14	±0,02	±0,03	±0,06
31	1315,65	2,18	1,97	1,25	0,13	0,49	0,62
	±32,83	±0,11	±0,13	±0,06	±0,23	±0,03	±0,07
35	1241,66	2,04	1,98	1,38	0,38	0,54	0,66
	±78,42	±0,03	±0,04	±0,08	±0,02	±0,05	±0,02
38	1237,85	2,21	2,10	1,16	0,26	0,52	0,73
	±91,58	±0,22	±0,25	±0,1	±0,22	±0,07	±0,11
41	1300,24	2,37	2,19	1,38	0,45	0,63	0,81
	±55,29	±0,65	±0,39	±0,11	±0,17	±0,14	±0,28
Dojrzałe	1412,07	1,75	1,55	1,33	0,32	0,75	0,86
	±72,11	±0,08	±0,05	±0,03	±0,02	±0,08	±0,19

Tabela A3. Skład kwasów tłuszczowych przypisanych do grupy „Inne” obecnej w puli triacylogliceroli nasionach *C. sativa* w analizowanych etapach ich rozwoju. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi ($n \geq 3$). ”-”, – poniżej poziomu detekcji. DAF – days after flowering (ang.) – dni po kwitnieniu.

DAF	Inne: kwasy tłuszczowe [%]					
	20:0	20:2	20:3	22:0	24:0	24:1
10	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
17	3,15	0,47	0,55	-	-	-
	±0,48	±0,18	±0,07	-	-	-
24	3,16	1,19	0,39	0,54	0,19	0,52
	±0,19	±0,09	±0,05	±0,03	±0,02	±0,06
31	3,31	1,64	0,80	0,61	0,23	0,83
	±0,50	±0,10	±0,15	±0,08	±0,03	±0,07
Dojrzałe	3,28	1,78	0,87	0,62	0,24	0,94
	±0,31	±0,24	±0,25	±0,04	±0,02	±0,08

Tabela A4. Zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w wybranych klasach lipidów obojętnych nasion *Camelina sativa* na różnych etapach ich rozwoju. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). DAF – days after flowering (ang.) – dni po kwitnieniu.

DIACYLOGLICEROLE						
Etap rozwoju nasion	% mol					
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1
10 DAF	54,6 ± 3,0	45,4 ± 3,0	-	-	-	-
17 DAF	25,0 ± 3,1	17,5 ± 1,0	20,6 ± 5,0	22,0 ± 2,3	7,4 ± 1,3	7,6 ± 3,4
24 DAF	30,8 ± 3,0	21,0 ± 3,1	12,6 ± 1,8	13,2 ± 1,2	10,4 ± 3,6	11,9 ± 3,7
31 DAF	41,8 ± 2,2	26,2 ± 1,1	-	-	32,1 ± 3,3	-
Dojrzałe	54,0 ± 2,8	46,0 ± 2,8	-	-	-	-

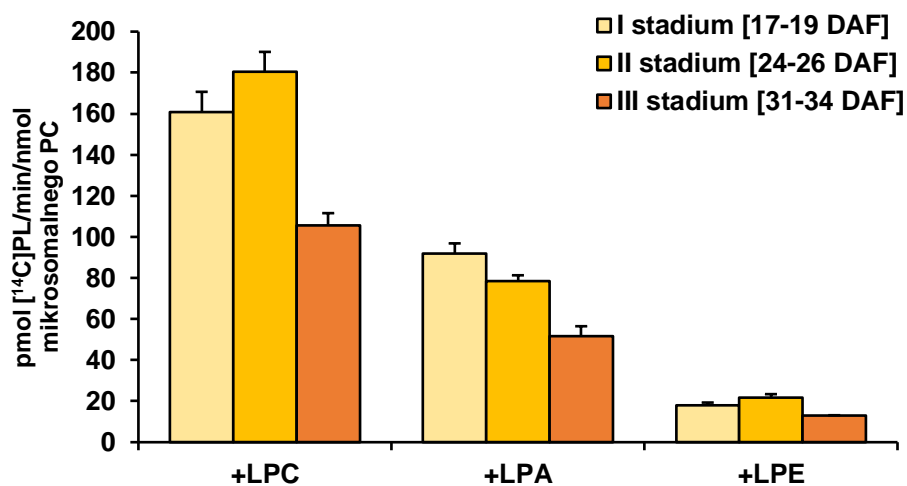
WOLNE KWASY TŁUSZCZOWE							
Etap rozwoju nasion	% mol						
	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	Inne
10 DAF	50,0 ± 11,0	36,0 ± 13,0	8,3 ± 3,0	-	-	-	-
17 DAF	22,1 ± 0,6	15,7 ± 1,2	24,8 ± 2,6	19,1 ± 3,3	4,8 ± 0,3	9,9 ± 4,0	3,6 ± 0,9
24 DAF	23,0 ± 4,2	15,6 ± 3,0	14,6 ± 1,2	14,6 ± 1,2	10,3 ± 2,7	16,3 ± 2,5	4,3 ± 0,5
31 DAF	27,3 ± 6,3	18,6 ± 6,0	8,5 ± 1,6	9,4 ± 2,4	12,5 ± 5,3	15,9 ± 3,6	7,8 ± 0,8
Dojrzałe	56,0 ± 4,8	44,0 ± 4,8	-	-	-	-	-

MONOACYLOGLICEROLE			
Etap rozwoju nasion	% mol		
	14:0	16:0	18:0
10 DAF	29 ± 0,9	34,5 ± 0,9	36,5 ± 0,01
17 DAF	-	56,8 ± 1,3	43,2 ± 1,3
24 DAF	-	51,4 ± 0,9	48,6 ± 0,9
31 DAF	-	63,2 ± 2,1	36,8 ± 2,1
Dojrzałe	38,6 ± 3,3	30,9 ± 2,9	30,5 ± 1,7

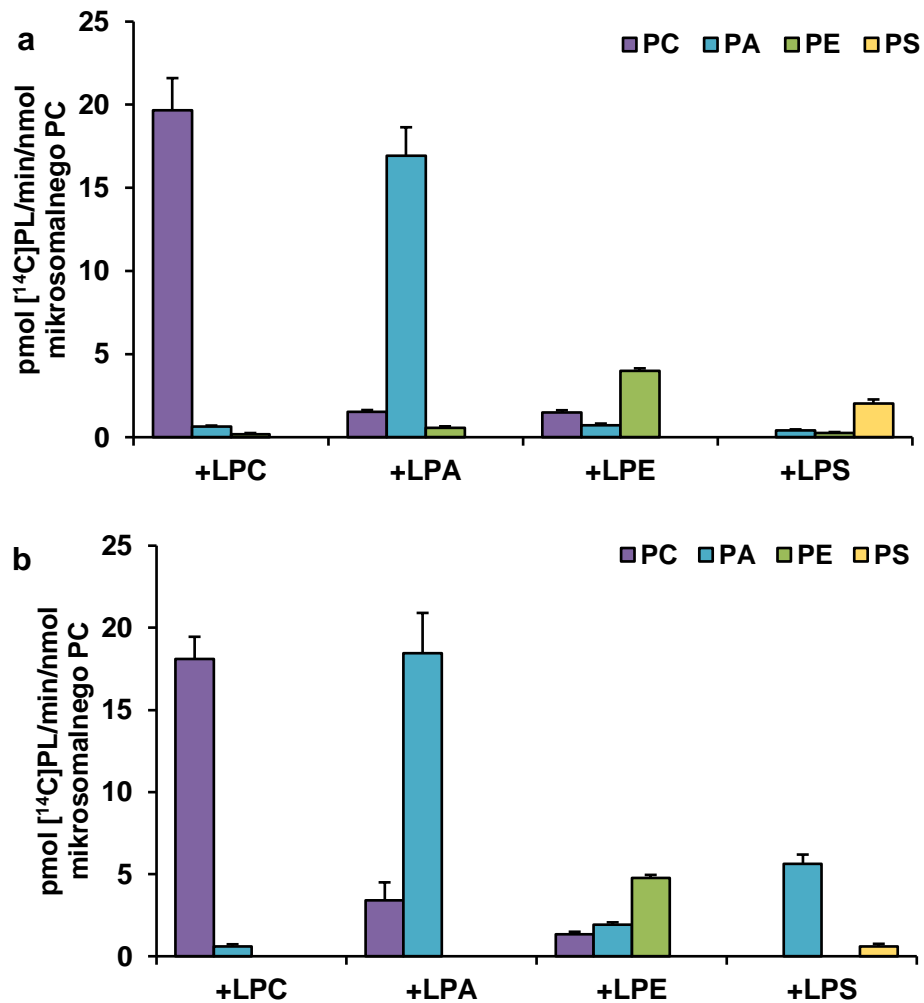
ESTRY STEROLI				
Etap rozwoju nasion	% mol			
	14:0	16:0	18:0	18:2
10 DAF	100 ± 0	-	-	-
17 DAF	71,5 ± 1,8	14,4 ± 0,6	14,1 ± 1,8	-
24 DAF	76,5 ± 0,9	9,6 ± 0,8	7,4 ± 1,5	6,6 ± 1,4
31 DAF	83,5 ± 0,1	9,0 ± 0,5	7,6 ± 0,5	-
Dojrzałe	78,6 ± 3,3	13,7 ± 1,6	7,7 ± 1,7	-

Tabela A5. Zawartość poszczególnych bardzo długołańcuchowych kwasów tłuszczowych zaliczonych do puli „inne” w wybranych fosfolipidach oraz galaktolipidach znajdujących się w liściach *Camelina sativa* hodowanej w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).

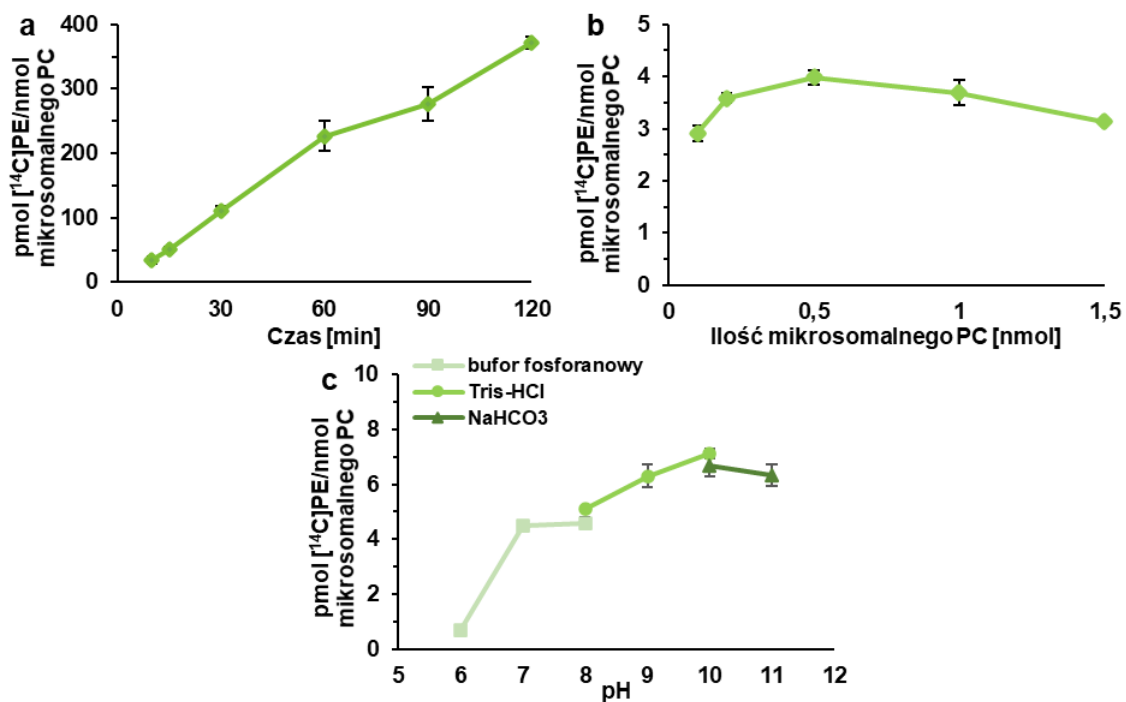
Klasa lipidów	Rodzaj hodowli	% mol					
		20:1	20:2	20:3	22:0	24:0	24:1
PS	<i>in vivo</i>	-	-	11,9 ± 0,1	-	14,4 ± 0,9	4,6 ± 0,3
	<i>in vitro</i>	-	-	9,7 ± 0,9	-	11,3 ± 0,1	4,1 ± 0,4
SQDG	<i>in vivo</i>	-	-	-	-	3,2 ± 0,6	-
	<i>in vitro</i>	-	-	2,9 ± 0,1	-	2,3 ± 0,2	-
PC	<i>in vivo</i>	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,01
	<i>in vitro</i>	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,16 ± 0,01
DGDG	<i>in vivo</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>in vitro</i>	0,5 ± 0,01	-	-	-	-	-
PE	<i>in vivo</i>	-	-	0,9 ± 0,04	-	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01
	<i>in vitro</i>	0,6 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,01	2,3 ± 0,02	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1
PA	<i>in vivo</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>in vitro</i>	-	-	0,93 ± 0,32	-	-	1,61 ± 0,1
MGDG	<i>in vivo</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>in vitro</i>	0,2 ± 0,001	0,1 ± 0,001	0,1 ± 0,001	-	0,1 ± 0,001	0,1 ± 0,001
Neutralne	<i>in vivo</i>	5,9 ± 0,4	0,3 ± 0,02	6,6 ± 0,3	-	2,5 ± 0,1	0,3 ± 0,01
	<i>in vitro</i>	0,6 ± 0,01	0,5 ± 0,02	5,0 ± 0,2	-	2,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1



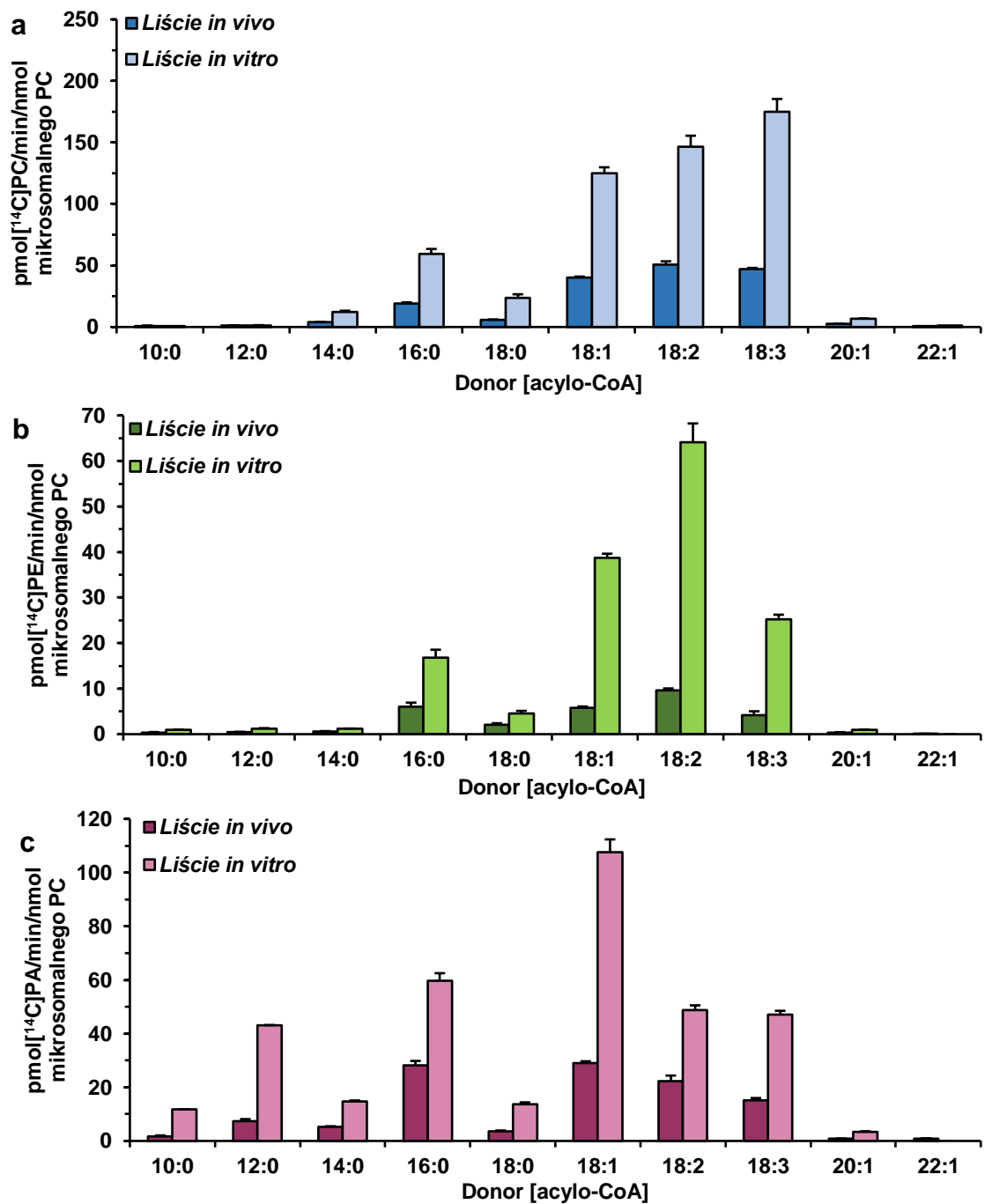
Rys. A1. Aktywność wybranych acylotransferaz typu acylo-CoA:lizofosfolipid obecnych w nasionach *C. sativa*. Reakcje z udziałem LPC uznawano za przeprowadzane przez LPCATy, z udziałem LPA za przeprowadzane przez LPAATy a z udziałem LPE za przeprowadzane przez LPEATy. Warunki reakcji: 5 nmol egzogenego *sn*-1-18:1-LPL, 5 nmol [¹⁴C]18:1-CoA, alikwoty frakcji mikrosomalnych zawierające 0,2 nmol (dla LPCATów oraz LPEATów) lub 0,5 nmol (dla LPAATów) mikrosomalnego PC, 30 minut (dla LPCATów) lub 60 minut (dla LPEATów oraz LPAATów), reakcji z inkubacją w 30 °C w 0,1 M buforze Tris-HCl o pH 9,0 (dla LPCATów oraz LPAATów) lub pH 10,0 (dla LPEATów). LPA – kwas lizofosfatydowy, LPC – lizofosfatydylocholina, LPE – lizofosfatydyloetanolamina.



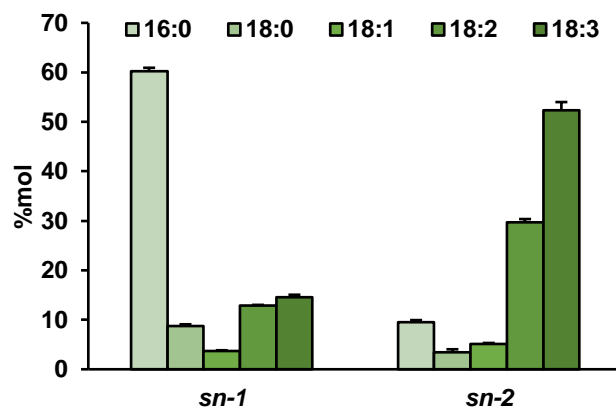
Rys. A2. Specyficzność względem różnych akceptorów grup acylowych acylotransferaz typu acylo-CoA:lizofosfolipid (LPLAT) obecnych w liściach z warunków *in vitro* (a) oraz korzeniach z warunków *in vitro* (b). Warunki reakcji: 5 nmol egzogennej *sn*-1-18:1-LPL, 5 nmol [¹⁴C]18:1-CoA, alikwoty frakcji mikrosomalnej zawierające 1 nmol mikrosomalnego PC, 60 minut reakcji z inkubacją w 30 °C. LPA – kwas lizofosfatydowy, LPC – lizofosfatydylocholina, LPE – lizofosfatydyloetanolamina, LPS – lizofosfatydyloseryna.



Rys. A3. Optymalizacja warunków reakcji dla acylotransferaz acylo-CoA: lizofosfatdyloetanolamina (LPEAT) obecnych w liściach *C. sativa* hodowanej w warunkach *in vivo*. Zoptymalizowano: czas reakcji (**a**), ilość frakcji mikrosomalne (**b**) oraz pH reakcji (**c**). Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$). p-buffer – bufor fosforanowy.



Rys. A4. Specyficzność substratowa, w stosunku do acylo-CoA, acylotransferaz typu LPCAT (a), LPEAT (b) oraz LPAAT (c) obecnych liściach *C. sativa* hodowanych w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).



Rys. A5. Kwasy tłuszczowe obecne w pozycji *sn-1* oraz *sn-2* fosfatydyloetanolaminy wyizolowanej z liści *C. sativa* hodowanej w warunkach *in vivo*. Wyniki zostały przedstawione jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym ($n \geq 3$).