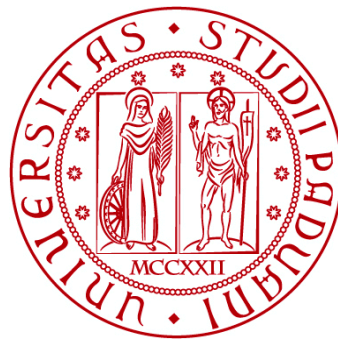


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



ELABORATO DI LAUREA

Utilizzo della mutagenesi CRISPR/Cas9 indotta per svelare il ruolo delle isoforme Long Chain Acyl-CoA Sintetasi nel metabolismo lipidico di *Phaeodactylum tricornutum*

Tutor: Prof. Morosinotto Tomas

Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Santin Anna

Dipartimento di Biologia

Laureando: Bellarte Matteo

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

Indice:

Abstract	1
1. Introduzione	2
1.1. <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	2
1.2. Metabolismo lipidico nelle piante	2
1.3. Geni LACS in <i>P. Tricornutum</i>	4
1.4. L'editing genomico nelle diatomee	4
2. Approccio sperimentale	
2.1. Studio dell'espressione delle isoforme ptACSL	5
2.2. Espressione di proteine di fusione ptACSL-eGFP	5
2.3. Saggio enzimatico <i>in vitro</i>	6
2.4. Generazione di mutanti <i>ptACSL</i> KO con CRISPR-Cas9 multiplex	6
2.5. Analisi del profilo lipidico in mutanti e wild-type	7
2.6. Analisi trascrittomiche dei mutanti	7
3. Risultati	
3.1. Analisi dell'espressione di <i>ptACSL1-5</i> in <i>P. tricornutum</i> esposto a condizioni di mancanza di N e alti livelli di CO ₂	8
3.2. Specificità ed efficienza catalitica delle proteine ptACSL1-5	8
3.3. Localizzazione subcellulare delle isoforme ptACSL	9
3.4. Analisi della crescita e del contenuto lipidico dei mutanti ptACSL KO	10
3.5. Effetti dell'assenza di <i>ptACSL3</i> sulla sintesi di lipidi e sul profilo di acidi grassi dei glicerolipidi.	11
3.6. Analisi dei cambi trascrizionali nella transizione tra stati di crescita in mutanti <i>ptACSL3</i> KO	13
3.7. Effetti dell'assenza di <i>ptACSL1/ptACSL5</i> sulla sintesi di lipidi	14
4. Discussione e prospettive future	
4.1. Vantaggi dell'utilizzo di CRISPR/Cas9 multiplex	15
4.2. Discussione dei risultati ottenuti	15
4.3. Prospettive future	16
Bibliografia	18

Abstract

Phaeodactylum tricornutum è una diatomea di particolare interesse industriale grazie alla sua capacità di accumulare triacilgliceroli (TAG) in condizioni di assenza di azoto. Questa tesi esplora il ruolo cruciale degli enzimi LACS (Long Chain Acyl-CoA Synthetases) nel metabolismo lipidico della microalga attraverso l'editing genomico. Con la tecnica CRISPR/Cas9 multiplex, sono stati generati mutanti knockout per ciascuno dei cinque geni *ptACSL*, codificanti per enzimi LACS. Inoltre, è stata studiata l'espressione degli enzimi in diverse condizioni ambientali ed è stata determinata la loro localizzazione subcellulare mediante tecniche come l'immunoblotting e l'espressione di proteine di fusione con eGFP. I risultati dimostrano la diversa specificità di substrato e localizzazione subcellulare delle isoforme, che riflettono i loro distinti ruoli nella sintesi e accumulo di lipidi. Di particolare interesse è *ptACSL3*, localizzato nei mitocondri, la cui mutazione provoca una riduzione del contenuto di TAG e una crescita ridotta. I risultati sperimentali indicano che *ptACSL3* potrebbe essere coinvolto nella β -ossidazione, importante per la degradazione dei lipidi di riserva nel passaggio tra crescita lenta e crescita rapida. Questo studio ha permesso di approfondire il metabolismo lipidico di *P. tricornutum*, aprendo la strada all'ottimizzazione della produzione di TAG e altri lipidi di valore economico, anche tramite editing genomico.

1. Introduzione

1.1. *Phaeodactylum tricornutum*

P. tricornutum è una diatomea, gruppo molto eterogeneo di microrganismi unicellulari fotosinteticamente attivi considerati i principali responsabili della produzione primaria negli ecosistemi acquatici (Dhaouadi et al., 2020). Le loro proprietà fisiologiche e biochimiche conferiscono loro la capacità di adattarsi a diverse condizioni di salinità, concentrazione di diossido di carbonio (CO₂), disponibilità di azoto (N) e fosforo (P), temperatura (Dhaouadi et al., 2020).

Una caratteristica che rende le diatomee particolarmente interessanti per la ricerca è la loro capacità di accumulare lipidi, soprattutto sotto forma di Triacilgliceroli (TAG), quando si trovano in condizioni di stress, come la carenza di nutrienti. In queste condizioni, il flusso di carbonio (C) viene deviato dalla crescita cellulare alla sintesi di lipidi di riserva, i quali permettono la sopravvivenza durante periodi di condizioni ambientali avverse. Le diatomee possono accumulare quantità significative di lipidi, fino al 20-50% del loro peso secco, sotto forma di gocce, chiamate “oil bodies”, immagazzinate intracellularmente (Dhaouadi et al., 2020). Questa loro caratteristica rende le diatomee organismi promettenti per la produzione di biocarburanti, ottenuti attraverso processi chimici come la transesterificazione dei lipidi estratti.

Inoltre, le diatomee si sono dimostrate delle fonti di una grande varietà di metaboliti secondari e sostanze bioattive, come gli acidi grassi poli-insaturi (Very-Long Polyunsaturated Fatty Acids - VL-PUFA), preziosi per l'industria alimentare e farmaceutica, o sostanze antimicrobiche come l'Acido Eicosapentaenoico (EPA) (Dhaouadi et al., 2020). L'interesse economico ha spinto la ricerca verso l'ottimizzazione della produzione degli acidi grassi, sia in termini di quantità che di qualità, utilizzando anche tecniche di ingegneria genetica. Infatti, i recenti progressi nella biologia sintetica e nella bioinformatica hanno permesso di mappare e modificare con precisione i percorsi metabolici delle diatomee, migliorando così la loro capacità di produrre composti di alto valore.

Negli ultimi anni, *P. tricornutum* è diventato un ottimo modello per lo studio della fisiologia delle microalghe così come per la produzione di sostanze bioattive grazie ai numerosi vantaggi offerti, tra cui l'alto tasso di divisione cellulare, la possibilità di criopreservazione, la conoscenza del genoma e l'esistenza di diversi protocolli genetici per la sua manipolazione (Dhaouadi et al., 2020). Tra le risorse disponibili sono di particolare importanza le diverse tecniche di trasformazione, i vettori episomali, tecnologie di silenziamento genico e di editing, come CRISPR/Cas9 (Dhaouadi et al., 2020).

1.2. Metabolismo lipidico nelle diatomee

Diversamente da animali e funghi, i quali producono acidi grassi principalmente nel citosol (Hao et al., 2022), nelle piante così come nelle diatomee la biosintesi *de novo* di acidi grassi avviene nel cloroplasto (Hao et al., 2022).

Il primo step del ciclo di reazioni prevede la formazione di malonil-Coenzima A (malonil-CoA) a partire da acetil-CoA e bicarbonato, reazione catalizzata dalla Acetil-CoA Carbossilasi (ACC). Prima di entrare nella via di sintesi degli acidi grassi, il gruppo malonil viene trasferito dal CoA ad una proteina Carrier (ACP),

formando malonil-ACP. Questo fornisce due unità di C che sono aggiunte in ogni step dell'allungamento della catena nascente. Queste reazioni sono catalizzate dalla Fatty Acid Synthase (FAS), un complesso multisubunità formato da numerosi enzimi coinvolti nella via di sintesi (Li-Beisson et al., 2013).

Gli acidi grassi neosintetizzati possono avere diversi destini. Nel cloroplasto, gli acidi grassi possono essere desaturati da delle acil-ACP desaturasi per produrre acidi grassi con uno o più doppi legami che vengono incorporati nei lipidi della membrana plastidiale. Questa via prende il nome di Pathway Procariotico e porta alla produzione di mono- (MGDG) e di-galattosil diacilglicerolo (DGDG), sulfoquinovos-1 diacilglicerolo (SQDG) e fosfatidilglicerolo (PG).

La maggior parte dei prodotti sono esportati in forma libera nel citosol, dove possono entrare nel pathway Eucariotico, che ha luogo nel reticolo endoplasmatico (ER) e porta alla formazione dei fosfolipidi e fosfoglicerolipidi di membrana, e dei TAG di riserva. Affinché gli acidi grassi siano accessibili al pathway eucariotico, essi devono essere attivati dall'esterificazione con il CoA, reazione catalizzata dalle sintetasi di acil-CoA a catena lunga (Long-Chain Acil-CoA Synthetases - LACS) (Hao et al., 2022).

Alternativamente, nel citosol, gli acil-CoA possono entrare nei pathway di sintesi degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena (Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids - LC-PUFA), che portano alla produzione di acidi grassi essenziali come l'acido eicosapentaenoico (EPA) e il docosaesaenoico (DHA). Queste vie comprendono reazioni di desaturazione e allungamento degli acil-CoA, catalizzate da desaturasi ed elongasi specifiche, che producono LC-PUFA classificati in base alla posizione del primo doppio legame a partire dal gruppo metilico terminale in omega-3 (n-3) e omega-6 (n-6). L'EPA può essere reimportato nel plastidio per la sintesi dei lipidi plastidiali, integrando ulteriormente il metabolismo lipidico tra compartimenti cellulari. Alcuni acidi grassi liberi, in particolare l'acido palmitico (16:0) e l'acido palmitoleico (16:1), possono essere rilasciati dall'idrolisi di TAG, attivati da LACS e trasportati nei mitocondri o nei perossisomi, dove sono degradati via β -ossidazione (Hao et al., 2022). La β -ossidazione è un processo chiave per la mobilizzazione delle riserve lipidiche e la produzione di energia, soprattutto in condizioni di stress o cambiamenti ambientali.

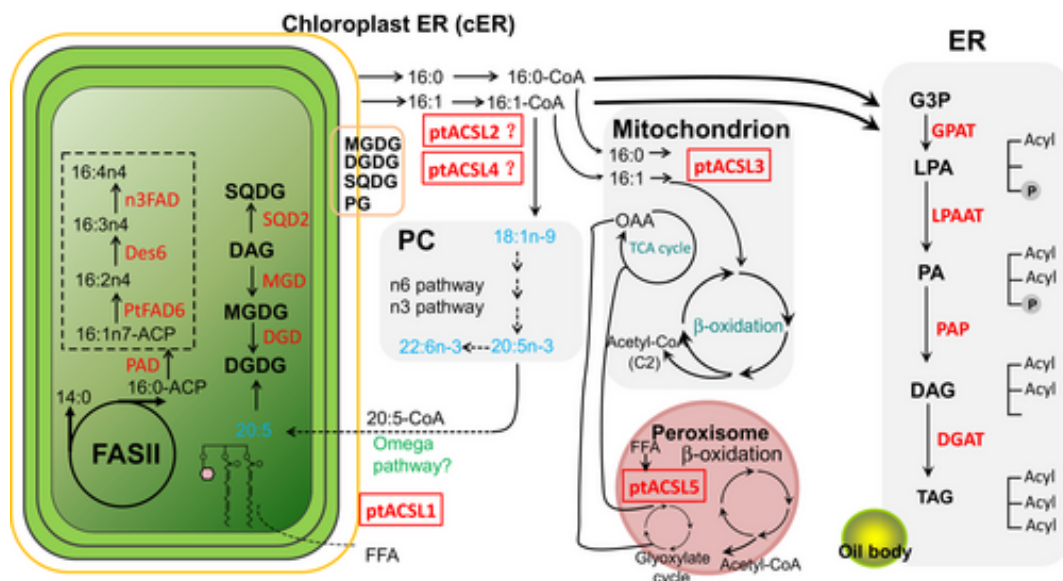


Figura 1. Metabolismo lipidico in *Phaeodactylum*. (Hao et al., 2022).

1.3. Geni LACS in *P. tricornutum*

Gli acidi grassi prodotti nel cloroplasto ed esportati in forma libera nel citosol sono inerti e necessitano di essere attivati per il loro utilizzo.

La tioesterificazione degli acidi grassi liberi con il CoA è catalizzata dalle acil-CoA sintetasi (ACS) ed è uno step fondamentale per l'attivazione degli acidi grassi che fungono da substrato nei processi metabolici come la sintesi di fosfolipidi e triacilgliceroli. La reazione di esterificazione prevede due passaggi. Prima l'acido grasso libero reagisce con ATP per generare un intermedio acil-AMP, dopodichè esso viene legato al gruppo tiolo del CoA, con rilascio di AMP e acil-CoA (Guo et al., 2014). La classificazione delle ACS viene effettuata in base alla lunghezza della catena dei substrati su cui agiscono: in particolare, le ACS che attivano gli acidi grassi prodotti dalle diatomee, acido palmitico, acido palmitoleico e acido oleico (18:1), sono gli enzimi LACS, che agiscono su substrati tra C12 e C20.

In *P. tricornutum*, sono stati individuati cinque geni *ptACSL*, codificanti per le LACS e denominati *ptACSL1-5*, tuttavia il loro ruolo funzionale nel metabolismo lipidico, in particolare il loro contributo all'accumulo di lipidi di riserva, rimane sconosciuto. Le cinque isoforme di *P. tricornutum* condividono una bassa identità nella sequenza amminoacidica tra loro (11-28%). L'analisi delle sequenze rivela che tutte le isoforme *ptACSL* contengono un motivo altamente conservato nella superfamiglia degli enzimi attivanti il gruppo acile (acyl-activating enzyme - AAEs) necessario per il legame di AMP. Inoltre, le isoforme condividono anche un motivo, definito "ACS signature motif", con una sequenza di 25 amminoacidi che sembra essere essenziale sia per il legame degli acidi grassi sia per la loro attività catalitica. Le isoforme *ptACSL2*, *ptACSL3* e *ptACSL4* contengono delle inserzioni rispettivamente di 1, 5 e 9 amminoacidi in questo motivo che potrebbero riflettere le loro distinte funzioni (Guo et al., 2014).

1.4. L'editing genomico nelle diatomee

L'editing genomico permette di modificare una o più copie di un gene di una cellula, agendo in maniera precisa attraverso l'uso di endonucleasi. Il primo approccio di editing sviluppato nelle diatomee prevede l'uso delle meganucleasi, endonucleasi caratterizzate da siti bersaglio tra e 12 e le 40 bp che possono essere utilizzate per eliminare, rimpiazzare o modificare una sequenza (Kroth et al., 2018). Successivamente, sono state sviluppate altre tecniche di genome editing più efficienti e flessibili, come TALENs e CRISPR/Cas9, le quali possono essere progettate per bersagliare gran parte delle regioni genomiche. Entrambe le tecniche si basano sull'utilizzo di una endonucleasi in grado di causare dei tagli a doppia elica a livello della regione bersaglio del genoma, attivando successivamente i sistemi di riparazione della cellula. Il NHEJ (Non-Homologous End Joining) è un meccanismo di riparazione del DNA che unisce le estremità di doppio filamento rotte senza la necessità di una sequenza omologa, risultando spesso in inserzioni o delezioni. Più raramente, l'HDR (Homology Directed Repair) può utilizzare una sequenza come stampo per riparare la rottura e può essere sfruttato per inserire specifiche sequenze (Kroth et al., 2018).

CRISPR/Cas9 è la tecnica che ha dimostrato la maggiore versatilità e precisione nell'ultimo decennio (Kroth et al., 2018). Si basa sull'espressione di un RNA

complementare alla regione bersaglio, chiamato RNA guida (gRNA) e di una endonucleasi che tagli entrambe le eliche del DNA, generalmente la Cas9 o forme simili. Il gRNA contiene una regione complementare al bersaglio (crRNA) e una regione deputata al reclutamento della nucleasi (tracrRNA). Il gRNA si associa all'endonucleasi Cas9 e la guida al sito bersaglio, dove il DNA viene tagliato (Kroth et al., 2018).

Generalmente, il gene codificante l'endonucleasi viene espresso da un plasmide, e la cassetta può integrarsi nel genoma a seguito di una trasformazione stabile o rimanere in forma episomale all'interno della cellula se a seguito di coniugazione (Kroth et al., 2018). In quest'ultimo caso, più recentemente sviluppato, il vettore plasmidico possiede delle sequenze, come la sequenza centromerica di lievito *Cen-Ars-His*, che permettono il suo mantenimento in forma episomale e la sua replicazione indipendente. Inoltre, sono presenti resistenze ad antibiotici che, oltre a permettere la selezione delle colonie trasformate, garantiscono la possibilità di eliminare l'episoma rimuovendo la pressione selettiva. In questo modo, si limita l'esposizione della cellula all'endonucleasi, che potrebbe causare problematiche come dei tagli in regioni non bersaglio (off-targets) (Kroth et al., 2018).

2. Approccio sperimentale

2.1. Studio dell'espressione delle isoforme di ptACSL

Per analizzare l'espressione delle isoforme ptACSL in condizioni di assenza di N e a diverse concentrazioni di CO₂, è stato effettuato un western blot con anticorpi specifici per ogni isoforma. Per osservare l'effetto della mancanza di N, le colture cellulari sono state incubate in un mezzo F/2 privo di N e l'estrazione delle proteine è stata effettuata a 0, 12, 24, 48 e 72 ore. Nel caso della CO₂, le cellule sono sottoposte a diverse concentrazioni (1%, 4% e 10%) per 6 ore ognuno e l'estrazione è effettuata alla seconda e alla sesta ora (Hao et al., 2022).

2.2. Espressione di proteine di fusione ptACSL-eGFP

Per determinare la precisa localizzazione subcellulare della isoforma di *ptACSL1*, precedentemente individuata nel plastidio, è stata utilizzata la tecnica "GFP self-assembling system". In questo sistema, solo l'ultimo foglietto β (GFP_S11) è stato fuso al C-terminale della *ptACSL1*, mentre i foglietti β 1-10 sono stati espressi indipendentemente dallo stesso vettore. Questa tecnica permette di aggirare problemi dovuti alla fusione della proteina di interesse con l'intera GFP, che comprendono la perdita di solubilità, l'errata localizzazione, il folding scorretto e l'alterazione dell'attività. Il gene *ptACSL1* fuso al frammento S11 e il frammento S1-S10 della GFP sono stati espressi dallo stesso vettore, costruito a partire dal plasmide pPha-Dual che possiede due siti di clonaggio (MCS) per l'inserimento dei geni. Nel caso delle altre isoforme, il gene *ptACSL* è stato fuso con l'intera GFP.

La trasformazione dei plasmidi di fusione con la GFP in *P. tricornutum* è stata effettuata per bombardamento di microparticelle (Hao et al., 2022).

2.3. Saggio enzimatico *in vitro*

Per testare l'attività enzimatica delle proteine ptACSL, esse sono state espresse in *E. coli* BL21 pLysS in forma ptACSL-*His*₆, ovvero fondendo la proteina con un His tag che permette la successiva purificazione utilizzando una resina His-bind. Le proteine così estratte sono state inserite in pozzetti in cui sono poi aggiunti i reagenti necessari alla reazione catalizzata e diversi acidi grassi substrato, i più presenti (acido palmitico, palmitoleico, oleico, stearico e EPA) in *P. tricornutum*. In seguito all'aggiunta dell'enzima, la reazione è stata monitorata per 10 minuti e l'assorbanza è stata misurata a 340 nm. L'attività specifica è stata calcolata dal coefficiente di estinzione per l'ossidazione di due molecole di NADH per ogni AMP rilasciato. Misurando le velocità iniziali della reazione catalizzata a diversi valori di concentrazione di substrato e a concentrazione saturante di ATP e CoA è possibile ricavare i dati cinetici, ovvero K_m , K_{cat} e K_{cat}/K_m per i differenti substrati utilizzando l'equazione di Michaelis-Menten (Hao et al., 2022):

$$v = V_{max} [S] / (K_m + [S])$$

con K_m che rappresenta l'affinità con cui un enzima lega il substrato, K_{cat} la velocità con cui l'enzima catalizza la reazione e K_{cat}/K_m che indica l'efficienza catalitica.

2.4. Generazione di mutanti *ptACSL* KO con CRISPR-Cas9 multiplex

Per mutare *P. tricornutum* è stata utilizzata la tecnica CRISPR/Cas9 multiplex, che permette di bersagliare più *loci* contemporaneamente, aumentando l'efficienza di modifica del gene. In questo caso, sei RNA guida (gRNA) sono stati disegnati sulla regione codificante di ciascun gene *ptACSL*, e tre di questi sono stati inseriti in un singolo vettore che contiene anche la cassetta codificante l'endonucleasi Cas9 e il gene di resistenza alla zeocina. Il plasmide utilizzato è stato disegnato in modo da facilitare la selezione per i trasformanti contenenti la cassetta Cas9 e aumentare l'efficienza di mutazione evitando colonie con genotipi misti prodotti durante la coniugazione. Ciò è stato reso possibile dalla fusione di *Cas9* e *sh-ble*, gene di resistenza alla zeocina, attraverso il peptide di taglio P2A (Moosburner et al., 2020). In questo modo, *Cas9* e *sh-ble* sono trascritti dallo stesso promotore e separati dopo l'auto-taglio del peptide, permettendo di selezionare le colonie che contengono l'intera cassetta *Cas9* senza la necessità di effettuare una PCR di controllo.

L'episoma contiene, inoltre, la sequenza *Cen-Ars-His*, che garantisce la stabilità e la replicazione del vettore.

I tre gRNA vengono inseriti con la tecnica del golden-gate cloning e, tra le loro sequenze è stata inserita la cassetta LacZ, che fa sì che le colonie positive assumano una colorazione blu in presenza di IPTG e Xgal. Queste due sostanze permettono uno screening "red-white-blue" in cui le colonie non trasformate correttamente appaiono bianche o rosse (Moosburner et. al., 2020). In seguito alla costruzione, il vettore viene trasformato in cellule di *Escherichia coli* contenenti anche il plasmide pta-MOB, necessario per la coniugazione con *P. tricornutum*.

A seguito della trasformazione, nel nucleo di *P. tricornutum* avviene l'espressione sia dei gRNAs che di Cas9, con formazione dell'endonucleasi che taglia entrambi gli alleli dei geni bersaglio nel genoma diploide della diatomea.

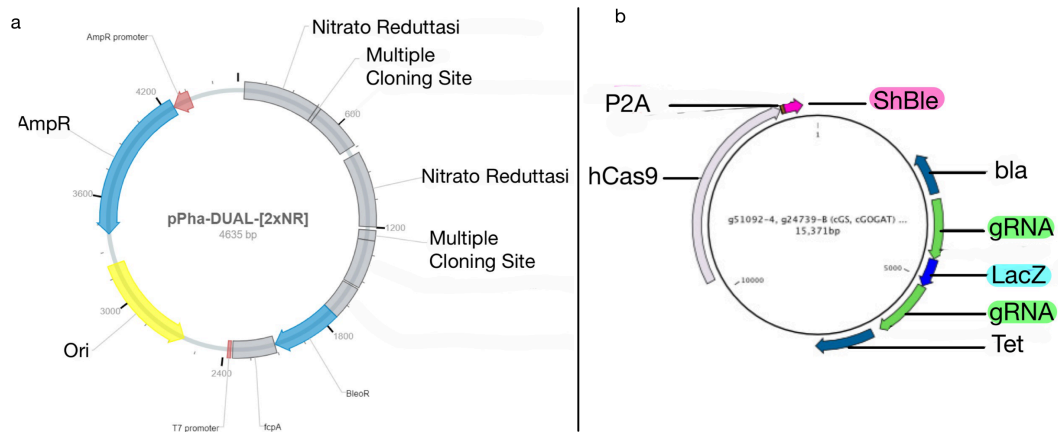


Figura 2. (a) Plasmide pPha-DUAL-[2×NR] utilizzato per la co-espressione della proteina di fusione ptACSL1:GFP_S11 e GFP_S1-10. I geni inseriti nei due Multiple cloning sites (MCS) del vettore sono posti sotto la regolazione trascrizionale dei promotori della Nitrato Reduttasi (NR) di *P. tricorutum*. **(b)** Plasmide contenente due gRNA separati dalla cassetta LacZ. La cassetta Cas9 è separata dal gene della resistenza alla zeocina (ShBle) dal frammento P2A (Moosburner et al., 2020).

2.5. Analisi del profilo lipidico in mutanti e wild-type

Per la caratterizzazione e la quantificazione delle specie molecolari di glicerolipidi presenti in *P. tricorutum*, i lipidi estratti sono stati analizzati con la tecnica della perdita preferenziale, utilizzando cromatografia liquida abbinata a spettrometria di massa (LC-MS) e spettrometria di massa in tandem (MS2). La perdita preferenziale è una tecnica utilizzata per studiare la frammentazione di molecole complesse e identificare strutture chimiche in base a specifiche perdite di massa. Le perdite di massa identificate permettono di determinare la struttura chimica della molecola e la posizione sn (stereospecific numbering) degli acidi grassi sulla molecola di glicerolo attraverso l'interpretazione dello spettro da parte di specifici algoritmi (Fabritius et al., 2023). La caratterizzazione della posizione sn è importante in quanto la posizione degli acidi grassi sui C del glicerolo può influenzare le proprietà fisiche e biologiche dei lipidi, come la fluidità della membrana cellulare (Fabritius et al., 2023).

Per l'analisi delle differenze nel profilo di TAG tra wild-type (WT) e mutanti *ptACSL3* knock-out (KO), i TAG sono stati estratti e quantificati con LC-MS.

2.6. Analisi trascrittomica dei mutanti

Un sequenziamento dell'RNA (RNA-seq) è stato utilizzato per determinare le differenze nel trascrittoma dei mutanti *ptACSL3* KO rispetto ai WT nelle due condizioni di crescita, ovvero in coltura statica e in coltura areata. L'RNA-seq, infatti, permette di ottenere un profilo completo dell'espressione genica, consentendo di identificare i geni differenzialmente espressi (DEGs) tra KO e WT. Una volta identificati, i DEGs sono stati sottoposti ad analisi della Gene Ontology (GO) per classificare le funzioni biologiche, i processi cellulari e i componenti molecolari associati ai geni espressi.

3. Risultati

3.1. Analisi dell'espressione di *ptACSL1-5* in *P. tricornutum* esposto a condizioni di mancanza di N e alti livelli di CO₂

P. tricornutum è caratterizzato dalla capacità di accumulare grandi quantità di lipidi in condizioni di mancanza di N e in risposta ad elevate concentrazioni di CO₂. Per osservare come l'espressione dei geni *ptACSL* di *P. tricornutum* sia regolata da questi due fattori, è stata effettuata un'analisi Immunoblot utilizzando anticorpi specifici per le diverse isoforme.

Dall'analisi si è potuto osservare come l'espressione delle prime quattro isoforme sia regolata dall'assenza di N, mentre *ptACSL5* abbia un'espressione costante. In particolare, le forme *ptACSL1* e *ptACSL3* hanno mostrato un'induzione dell'espressione con l'assenza di N, con un massimo a 72 ore. *PtACSL2* ha mostrato invece un andamento contrario, con una concentrazione maggiore in presenza di N e che decresce gradualmente con il passare del tempo quando l'N non è disponibile.

Inoltre, l'effetto della CO₂ è studiato somministrando alle colture un contenuto di CO₂ pari al 1, 4 e 10% per sei ore. L'espressione delle isoforme *ptACSL1*, 2 e 4 ha mostrato una lieve inibizione ad alte concentrazioni di CO₂. *PtACSL3* ha mostrato un comportamento diverso, con un'espressione che è aumentata raggiungendo un massimo al 4% di CO₂, per poi diminuire quando la CO₂ raggiunge il 10%.

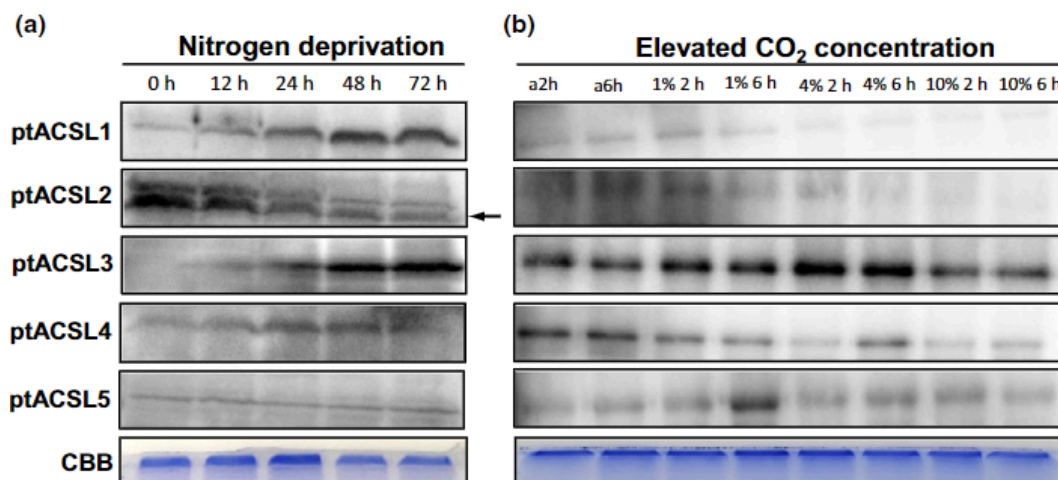


Figura 3. (a) Livelli di espressione delle isoforme *ptACSL* in condizioni di mancanza di N e a diversi intervalli temporali. (b) Livelli di espressione delle isoforme di *ptACSL* a concentrazioni crescenti di CO₂. **CBB**= Coomassie Brilliant Blue utilizzato come loading control per normalizzare la quantità di proteine estratte caricate nel gel. (Hao et al., 2022).

3.2. Specificità ed efficienza catalitica delle proteine *ptACSL1-5*

I parametri cinetici di ogni isoforma *ptACSL* sono determinati con un saggio enzimatico in cui sono forniti acidi grassi endogeni come substrato. Per tutte le isoforme, il valore di K_m è contenuto nell'intervallo 27-451 μM , con tutte e cinque le forme che mostrano attività enzimatica per l'acido oleico (18:1) con K_{cat}/K_m , che rappresenta l'efficienza catalitica, tra 1851 e 5912 $M^{-1} s^{-1}$ (Hao et al., 2022). *PtACSL1* è l'isoforma che possiede la maggiore efficienza catalitica per EPA, il VLC-PUFA più abbondante in *P. tricornutum*. Similmente, *ptACSL4* ha mostrato

un'efficienza catalitica per EPA che è 5 volte maggiore quella per l'acido oleico (18:1) e 28 volte maggiore quella per l'acido stearico (18:0). L'unica isoforma a non mostrare attività catalitica per EPA è stata ptACSL5, la quale possiede una maggiore affinità per l'acido stearico.

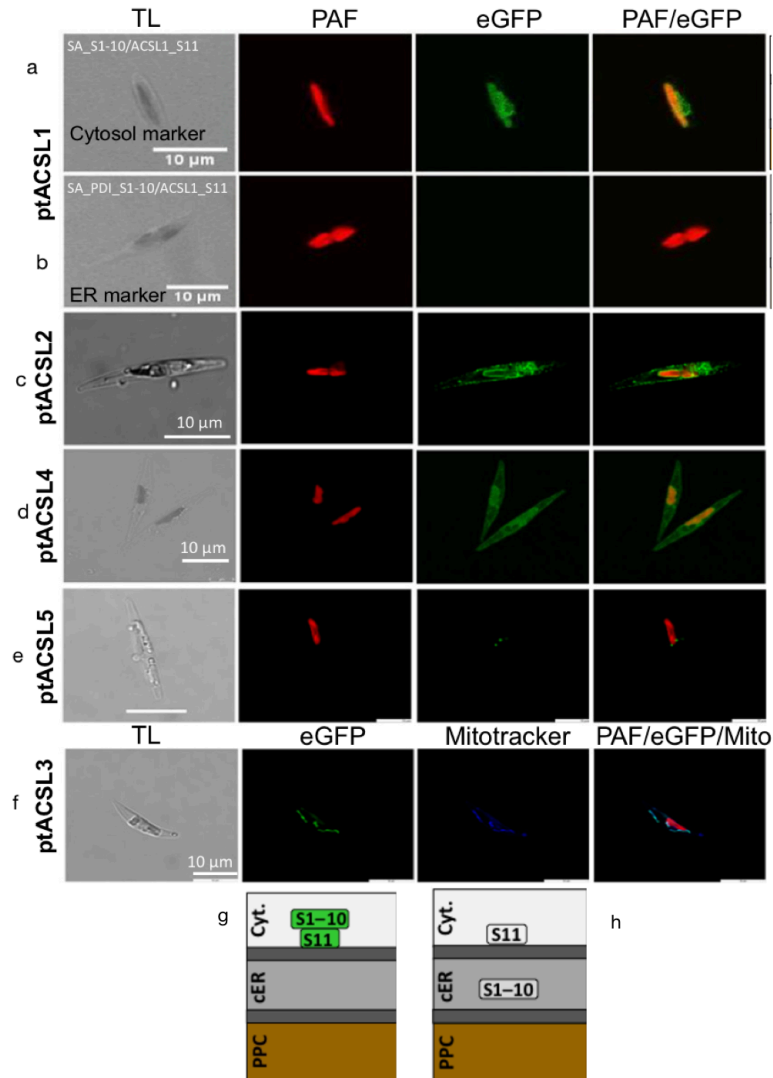


Figura 4. (a) co-espressione di ptACSL1:GFP_S11 e GFP_S1-10. (b) PDI-GFP_S1-10 indirizzata al cER. (c) ptACSL2:eGFP. (d) ptACSL4:eGFP. (e) ptACSL5:eGFP. (f) ptACSL3:eGFP. Rappresentazione della co-espressione di ptACSL1:GFP_S11 con (g) GFP_S1-10 e (h) PDI-GFP_S1-10 PAF= autofluorescenza del plastidio. PAF/eGFP= sovrapposizione della fluorescenza del plastidio e della eGFP. TL= luce trasmessa.

3.3. Localizzazione subcellulare delle isoforme ptACSL

La localizzazione delle isoforme ptACSL è indagata attraverso l'espressione di proteine di fusione ptACSL:eGFP o, nel caso di ptACSL1, con il metodo GFP self assembling system. ptACSL1 era stato precedentemente localizzato nel plastidio (Chen et al., 2018) ma la precisa localizzazione tra le quattro membrane del cloroplasto secondario di *P. tricornutum* era sconosciuta. Il grafico di idrofobicità per ptACSL1 ha predetto una regione idrofobica all'N-terminale, che indica una possibile localizzazione in una delle membrane del plastidio. Per determinare la

sua posizione, *ptACSL* fusa a GFP_S11 è stata co-espressa sia con il frammento GFP_S1-10 (Figura 4a), sia con il frammento PDI-GFP_S1-10, indirizzato al cER (reticolo endoplasmatico citoplasmatico) (Figura 3b). Nel primo caso è stata misurata fluorescenza mentre nel secondo il segnale è assente. Questo risultato indica che *ptACSL1* si trova nel citosol, associato alla membrana del cER attraverso la regione N-terminale. Sia *ptACSL2* che *ptACSL4* fusi alla eGFP hanno mostrato un segnale fluorescente disperso in tutto il citosol (Figura 3c-d). Il segnale causato dall'espressione di *ptACSL3:eGFP* è stato localizzato nei mitocondri, che si trovano in stretta associazione al plastidio (Figura 3f). La struttura amminoacidica di *ptACSL5* possiede una sequenza segnale per l'importazione nel perossisoma (PTS), e la sua localizzazione in questo organulo è stata confermata dalla fluorescenza di *ptACSL5:eGFP* (Figura 3e). L'espressione delle isoforme *ptACSL* in forma fusa alla eGFP ha permesso di rilevare la diversa localizzazione delle diverse isoforme, che riflette un ruolo differente nel metabolismo lipidico.

3.4. Analisi della crescita e del contenuto lipidico dei mutanti *ptACSL* KO

I mutanti per ogni gene *ptACSL* sono stati generati attraverso delezioni indotte dal sistema CRISPR/Cas9 guidato da gRNAs disegnati sulla porzione codificante dei geni. Per studiare l'effetto del KO di ogni isoforma, la crescita cellulare e l'accumulo di lipidi sono stati monitorati sia in condizioni di coltura statica che in colture areate, in cui viene insufflata aria filtrata. Per i mutanti *ptACSL1*, *ptACSL2* e *ptACSL4* KO non sono state rilevate differenze sia nella crescita che nell'accumulo di lipidi rispetto al WT in coltura statica. (Hao et al., 2022). Nel caso di *ptACSL3* KO, un significativo aumento del contenuto lipidico è stato registrato al settimo giorno di coltura statica e in corrispondenza alla riduzione della concentrazione di nitrato del 50%. In condizioni areate, la crescita dei mutanti *ptACSL3* e *ptACSL1* KO è risultata diminuita rispetto ai WT.

Nei mutanti *ptACSL3* KO, la concentrazione di nitrati è diminuita più lentamente rispetto al WT. Questi ultimi hanno esaurito i nitrati disponibili nel mezzo al giorno 6 mentre nei mutanti la minore concentrazione è stata raggiunta al giorno 8 (Hao et al., 2022). Il minore accumulo di lipidi osservato nei mutanti *ptACSL3* KO dopo il settimo giorno potrebbe essere conseguenza del fatto che l'N è stato consumato più lentamente. Inoltre, i mutanti *ptACSL3* KO hanno accumulato una minore quantità di TAG.

La crescita dei mutanti *ptACSL5* KO in colture areate è stata osservata essere lievemente minore rispetto al WT, tuttavia l'accumulo di lipidi non è risultato alterato.

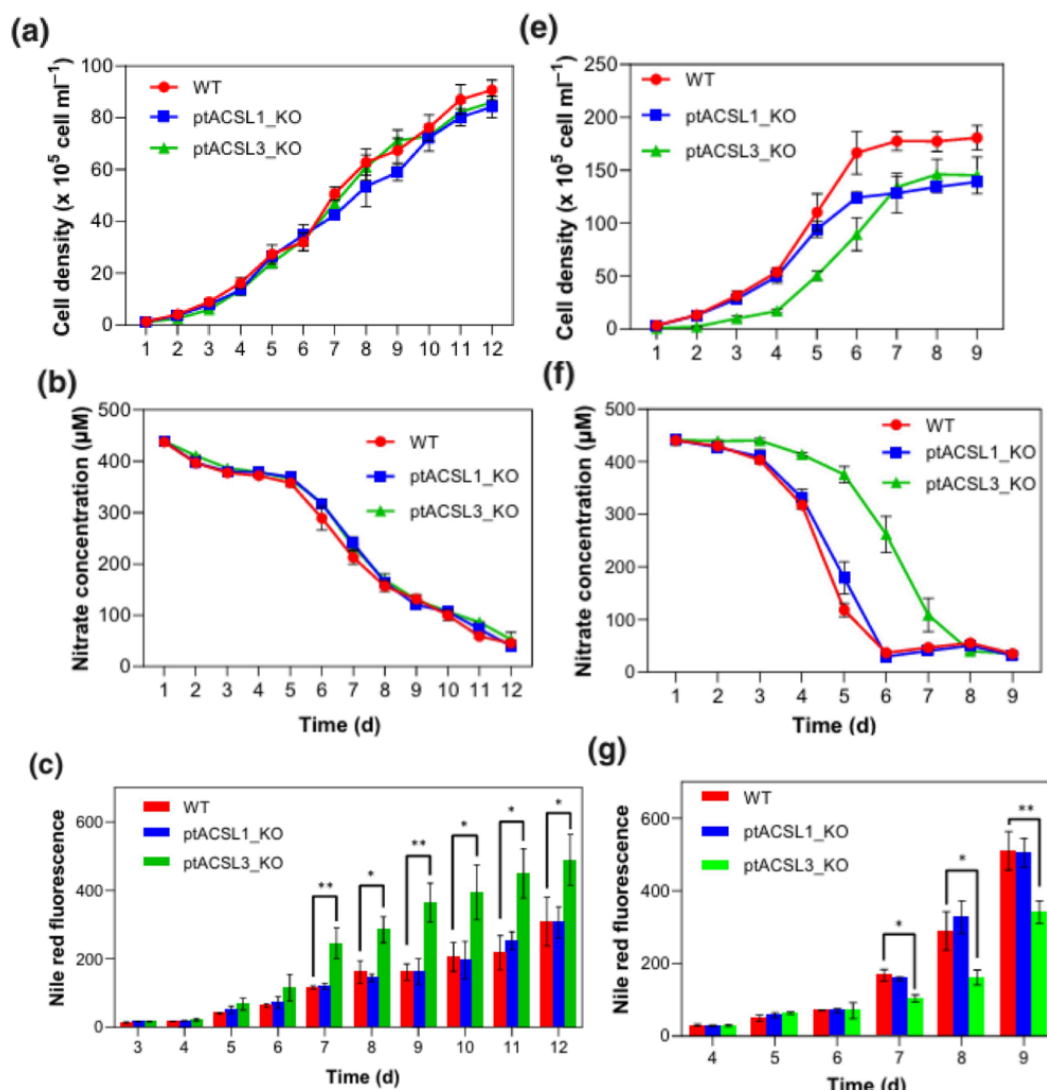


Figure 5. (a) Densità cellulare dei mutanti *ptACSL1* e *ptACSL3* KO rispetto ai Wild type in coltura statica. (b) Concentrazione di nitrati in coltura statica. (c) Fluorescenza Nile red, che indica l'accumulo di lipidi, in coltura statica. (e) Densità cellulare di mutanti *ptACSL1* e *ptACSL3* KO rispetto ai wild type in coltura areata. (f) Concentrazione di nitrati in coltura areata. (g) Fluorescenza Nile red in coltura areata (Hao et al. 2022).

3.5. Effetti dell'assenza di *ptACSL3* sulla sintesi di lipidi e sul profilo di acidi grassi dei glicerolipidi.

Il particolare fenotipo dei mutanti *ptACSL3* KO nell'accumulo di lipidi è stato approfondito attraverso l'analisi del profilo di acidi grassi nei glicerolipidi. Sia in fase di crescita esponenziale che in fase stazionaria si è potuto osservare una significativa diminuzione nel peso secco degli acidi grassi totali, con una notevole riduzione di quelli prodotti nel cloroplasto (acido palmitico, palmitoleico e oleico). La loro diminuzione è bilanciata dall'aumento di acido esadecadienoico (16:2), acido esadecatrienoico (16:3) e EPA nei mutanti. Per osservare come il KO di *ptACSL3* abbia influenzato la distribuzione delle specie di acidi grassi tra le classi di lipidi sono state effettuate delle analisi glicerolipidomiche (Hao et al., 2022). Nei mutanti è stata osservata una significativa riduzione nel contenuto di TAG e DAG (diacilglicerolo) e un aumento in tutti i fosfolipidi, con la

fosfatidilcolina che ha mostrato un incremento di cinque volte rispetto al WT. Anche i tre più abbondanti glicolipidi tilacoidali, MGDG, DGDG e SQDG hanno mostrato un significativo aumento in fase stazionaria (Hao et al., 2022).

In questi lipidi, le specie contenenti 16:0/16:0 e 16:1/16:0, dicitura che indica specie in cui i due acidi grassi occupano la posizione sn-1 e sn-2, risultano significativamente diminuite, mentre le specie contenenti acido esadecadienoico (16:2), acido esadecatrienoico (16:3) e EPA mostrano un aumento, il che dimostra che i lipidi della membrana del cloroplasto dei mutanti *ptACSL3* KO contengono più acidi grassi polinsaturi rispetto al WT. 16:0 e 16:1 sono prodotti nel cloroplasto dalle FAS in forma esterificata alle proteine ACP e sono poi trasferiti alla molecola di glicerolo. Questo processo non richiede l'attivazione degli acidi grassi con la formazione di acil-CoA mediata da enzimi LACS, di conseguenza, si può affermare che il KO di *ptACSL3* comporti un'inibizione della sintesi *de novo* di acidi grassi (Hao et al., 2022). Allo stesso modo, anche le specie molecolari di PC (fosfatidilcolina) contenenti 16:0 e 18:1 sono significativamente ridotte, con un aumento nelle specie contenenti 20:5.

Riassumendo, il KO di *ptACSL3* in condizioni areate ha comportato un ridotto accumulo di TAG, un aumento di fosfolipidi e l'alterazione del profilo di acidi grassi di MGDG, DGDG e PC con la diminuzione di acido palmitico, palmitoleico, oleico e un aumento nel contenuto di acidi grassi polinsaturi come EPA (Hao et al., 2022).

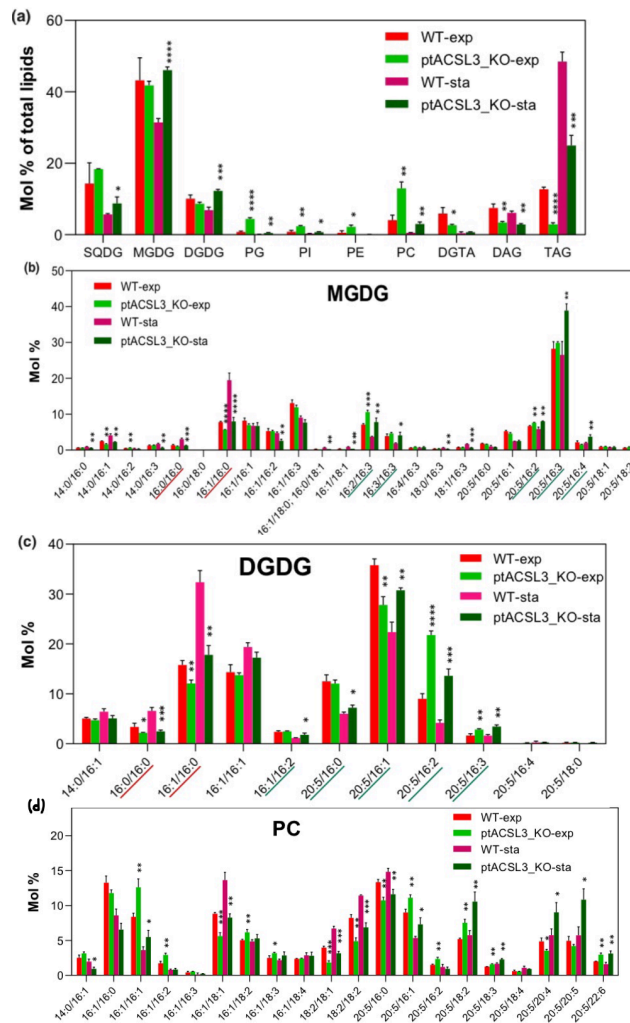


Figura 6. (a) Contenuto dei vari glicerolipidi. **(b)** Profilo degli acidi grassi delle specie di MGDG. **(c)** Profilo di acidi grassi delle specie di DGDG. **(d)** Profilo di acidi grassi delle specie di PC. Tutti i profili sono stati analizzati sia in fase di crescita esponenziale (exp) sia in fase stazionaria (sta) (Hao et al., 2022).

L'analisi della composizione delle specie molecolari di TAG è stata effettuata con LC-MS. In entrambe le condizioni, crescita statica e areata, le specie più abbondanti di TAG, ovvero acido tetracontaoctanoico monoinsaturo (48:1), acido tetracontaoctanoico diinsaturo (48:2) e acido tetracontaoctanoico triinsaturo (48:3), non hanno subito nessuna variazione. Nella condizione areata, le specie contenenti acido oleico e EPA, che rappresentano i due substrati per cui l'isoforma *ptACSL3* è selettiva, come dimostrato dal saggio enzimatico, hanno mostrato una diminuzione nell'abbondanza. Questo suggerisce il ruolo svolto da *ptACSL3* anche nella sintesi di lipidi di riserva. In condizioni statiche, tre specie contenenti prevalentemente acido palmitoleico e acido oleico, ovvero acido pentacontanoico triinsaturo (50:3), acido pentacontanoico tetra-insaturo (50:4) e acido pentacontanoico penta-insaturo (50:5), risultano arricchite rispetto al WT.

3.6. Analisi dei cambi trascrizionali nella transizione tra stati di crescita in mutanti *ptACSL3* KO

Per osservare i cambiamenti dal punto di vista del trascrittoma dei mutanti *ptACSL3* KO che avvengono nel passaggio tra la condizione di crescita lenta e la condizione di crescita rapida è stato estratto ed analizzato l'mRNA a differenti intervalli di tempo (0, 2, 3, 4 giorni). L'allineamento con il genoma di riferimento di *P. tricornutum* ha rilevato 5622 geni sui quali è stata allineata almeno una read, che corrispondono a circa il 45% di tutti i geni conosciuti dell'organismo (Hao et al., 2022). Di questi, 746 hanno mostrato un'espressione differenziale in più di un intervallo temporale sia nei campioni WT che in quelli KO. Questo era atteso considerando che la transizione tra le condizioni di crescita comporta una significativa risposta trascrizionale, osservabile attraverso l'aumento del numero di geni differenzialmente espressi durante la crescita in coltura areata. Rispetto alla coltura statica, a 2, 3 e 4 giorni dalla transizione tra lo stato di crescita lenta e veloce sono stati misurati rispettivamente 1937, 2543 e 3830 geni differenzialmente espressi nei WT e 2986, 3342 e 3913 geni differenzialmente espressi nei mutanti *ptACSL3* KO (Hao et al., 2022).

Per individuare la relazione tra i geni differenzialmente espressi nei WT e nei KO è stata effettuata un'analisi della Gene Ontology (GO). L'intervallo temporale al quale si registra la maggiore differenza tra le categorie arricchite corrisponde al giorno 2, nel quale i WT mostrano un arricchimento nelle categorie "divisione cellulare" e "componenti strutturali del ribosoma", mentre nei mutanti *ptACSL3* KO è particolarmente rappresentata la categoria "mitocondri" (Hao et al., 2022). I mitocondri sono la sede dell'ossidazione degli acidi grassi, con la quale i tioesteri acil-CoA generati dagli enzimi LACS vengono degradati producendo CoA e potenziale riducente.

Per analizzare ulteriormente come il KO di *ptACSL3* impatti sulla β -ossidazione è stata osservata l'espressione dei geni coinvolti nel percorso di degradazione degli acidi grassi. Nei WT, i geni che codificano per la carnitina O-aciltransferasi (*CAT*), enoil-CoA idratasi/3-idrossil-CoA deidrogenasi (*HADA*) e β -chetoacil-CoA tiolasi (*KCT3*) sono stati indotti dalla transizione tra le due condizioni di crescita mentre nei mutanti l'espressione è rimasta inalterata o è

repressa (Hao et al., 2022). Inoltre, i geni codificanti la O-aciltransferasi (*CAT2*), acil-CoA deidrogenasi (*MACAD1*) e 3-idrossiacil-CoA deidrogenasi (*HAD2*), normalmente sottoregolati nel WT, hanno subito una downregolazione significativamente maggiore nei mutanti *ptACSL3* KO (Hao et al., 2022).

I risultati dell'analisi trascrittomica indicano che il KO di *ptACSL3* comporta un'inibizione della β -ossidazione, essenziale per l'omeostasi della cellula nella transizione tra condizioni di crescita lenta e di crescita rapida. Ciò potrebbe avere un impatto sulla sintesi di acidi grassi causandone l'inibizione in colture areate, che comporta la diminuita produzione di lipidi osservabile nei mutanti *ptACSL3* KO.

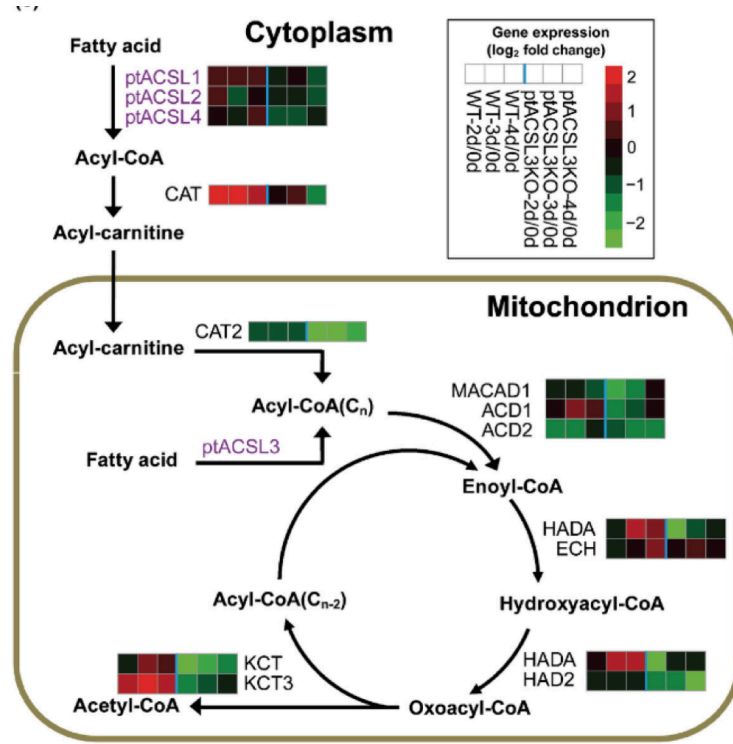


Figura 7. Espressione dei geni codificanti gli enzimi responsabili delle reazioni della β -ossidazione. I valori della variazione di espressione per ogni gene sono rappresentati con una heatmap (Hao et al., 2022).

3.7. Effetti dell'assenza di *ptACSL1* e *ptACSL5* sulla sintesi di lipidi

I mutanti *ptACSL1* e *ptACSL5* KO hanno mostrato una crescita leggermente diminuita rispetto al WT in condizioni areate. L'espressione di *ptACSL1* è indotta dalla mancanza di N, con un picco a 72 ore dalla deprivazione. Per valutare l'effetto della mancanza di questa isoforma è analizzato il contenuto lipidico di mutanti *ptACSL1* KO e WT in fase di crescita esponenziale e dopo 72 ore dalla privazione di N. Nella fase esponenziale, le differenze nel profilo lipidico tra mutanti e WT sono risultate minime e principalmente riguardanti una leggera diminuzione del contenuto di EPA, in particolare nelle specie molecolari di TAG e di lipidi polari. Dopo 72 ore, i lipidi di membrana sono stati più affetti dalla mancanza di N nei WT rispetto ai mutanti, indicando un ruolo di *ptACSL1* nel rimodellamento dei lipidi di membrana in risposta alla privazione di N (Hao et al., 2022).

Il profilo lipidico dei mutanti *ptACSL5* KO è stato analizzato in fase di crescita

esponenziale e in fase stazionaria in condizioni areate. In fase stazionaria, è stato misurato un leggero aumento del contenuto di acidi grassi, in particolare di acido palmitoleico. Le analisi lipidomiche hanno rivelato che l'aumento di acido palmitoleico è dovuto soprattutto ad un aumento nelle specie molecolari di PC contenenti l'acido grasso a discapito di quelle contenenti l'EPA. Allo stesso modo, anche le specie molecolari di TAG contenenti acido palmitoleico risultano arricchite, a discapito di quelle contenenti EPA e 16:0/16:0. La localizzazione subcellulare dell'isoforma *ptACSL5* è stata confermata sperimentalmente nei perossisomi, tramite l'espressione della proteina di fusione *ptACSL5:eGFP*.

4. Discussione e prospettive future

4.1 Vantaggi dell'utilizzo di CRISPR/Cas9 multiplex

La tecnologia CRISPR/Cas9 multiplex ha facilitato diverse applicazioni di ingegneria genetica, aumentando notevolmente l'efficienza dell'editing genomico e della regolazione trascrizionale (McCarty et al., 2020). Negli ultimi anni, sempre più studi hanno sottolineato i vantaggi dell'utilizzo di un approccio multiplex rispetto all'uso di un solo gRNA, che si è dimostrato essere un limite per l'efficienza dell'editing (McCarty et al., 2020).

In questo studio, l'utilizzo della CRISPR/Cas9 multiplex per generare singoli mutanti *ptACSL* KO si è rivelato un ottimo metodo per caratterizzarne le funzioni nel metabolismo lipidico. Comparando l'efficienza delle mutazioni sui geni *ptACSL* indotti da numeri diversi di gRNA disegnati sulla regione si è potuto notare come la frequenza delle inserzioni causate da due gRNA è due volte maggiore a quella delle inserzioni causate da un solo gRNA (Hao et al., 2021). La frequenza delle delezioni è rimasta inalterata con entrambi i sistemi. Per ulteriori indagini sarà necessario generare dei mutanti *ptACSL* multipli, in modo da svelare il complesso network di funzioni degli enzimi LACS di *P. tricornutum* (Hao et al., 2022).

4.2 Discussione dei risultati ottenuti

P. tricornutum rappresenta un ottimo modello per lo studio della biosintesi di lipidi, e in particolare dei VLC-PUFA, grazie alla sua capacità di accumularli in grandi quantità. Tuttavia, i processi di attivazione degli acidi grassi, di trasporto attraverso i compartimenti cellulari e di deposizione dei VLC-PUFA nei galattoglicerolipidi sono poco conosciuti (Hao et al., 2022). Un ruolo centrale nel metabolismo lipidico è ricoperto dagli enzimi LACS, i quali catalizzano l'esterificazione degli acidi grassi liberi, che possono provenire dalla sintesi *de novo* che avviene nel plastidio, dal turnover dei lipidi di membrana o dalla mobilizzazione dei TAG, con il gruppo CoA. Delle cinque isoforme di enzimi LACS individuate in *P. tricornutum*, *ptACSL1* è risultata l'unica localizzata nella membrana esterna del cER, con il C-terminale nel citoplasma. La sua localizzazione indica che potrebbe essere l'isoforma coinvolta nell'attivazione degli acidi grassi liberi esportati dal cloroplasto. Dal saggio enzimatico *in vitro* si è osservato come questa isoforma abbia la più alta efficienza catalitica per l'EPA. Inoltre, i mutanti *ptACSL1* KO hanno mostrato una leggera diminuzione delle specie molecolari di lipidi plastidiali contenenti EPA sia in fase esponenziale che in mancanza di azoto, suggerendo un ruolo nel trasferimento dell'EPA a questi lipidi (Hao et al., 2022).

L'isoforma *ptACSL3* ha mostrato dei risultati particolarmente interessanti in quanto la sua mutazione causa dei fenotipi associati all'accumulo di TAG (Hao et

al., 2022). PtACSL3 è stata localizzata nei mitocondri, fatto che suggerisce il suo coinvolgimento nell'attivazione degli acidi grassi per la loro degradazione attraverso la β -ossidazione. Infatti, quando le cellule sono sottoposte a cambi nel contenuto di nutrienti, temperatura o luce, i lipidi di riserva sono rapidamente degradati per garantire la sopravvivenza e la crescita delle cellule (Hao et al., 2022). I mutanti *ptACSL3* KO hanno mostrato una significativa diminuzione nell'accumulo di TAG, in particolare di specie molecolari contenenti gli acidi grassi sintetizzati nel cloroplasto da *P. tricornutum* (acido palmitico, palmitoleico e oleico) in condizioni di crescita rapida. Ciò suggerisce che nei mutanti di *ptACSL3*, l'inibizione della β -ossidazione si riflette in una inibizione della sintesi *de novo* di acidi grassi (Hao et al., 2022). Nelle cellule cresciute in coltura statica, l'assenza di differenze nell'accumulo di lipidi rispetto ai WT suggerisce che, in condizioni di crescita lenta, le cellule non necessitano di una β -ossidazione particolarmente attiva nel rimuovere acidi grassi liberi (Hao et al., 2022).

I risultati ottenuti per l'isoforma *ptACSL5* indicano la sua localizzazione nel perossisoma e il suo ruolo svolto nell'attivazione degli acidi grassi destinati alla degradazione in questo organello. L'approccio utilizzato non ha permesso di stabilire il ruolo delle isoforme *ptACSL2* e *ptACSL4*, entrambe localizzate nel citosol (Hao et al., 2022).

4.3 Prospettive future

Il problema di maggior entità che ha attirato l'attenzione della comunità scientifica è legato alla limitatezza delle risorse del mondo odierno. Le sfide principali includono, ma non si limitano a, acqua pulita, energia, disponibilità di medicinali e cibo sano (Bramhanwade et al., 2023). In questo contesto, le diatomee, grazie alla loro distribuzione, al ruolo fondamentale nel riciclo di silicio e di carbonio e nella produttività primaria terrestre rappresentano una possibile fonte di lipidi e metaboliti secondari capace di rispondere a queste problematiche (Bramhanwade et al., 2023).

La comprensione del ruolo svolto dagli enzimi che catalizzano le reazioni del metabolismo lipidico della diatomea è di notevole interesse economico e permetterà di migliorare quantità e qualità dei lipidi ottenuti dalle micro alghe per applicazioni biotecnologiche e nutraceutiche. L'applicazione biotecnologica di maggiore interesse è l'utilizzo dei TAG come substrato di partenza per la produzione di biocarburanti, campo in cui le diatomee si sono dimostrate promettenti per sostituire le fonti di energia non rinnovabili (Sharma et al., 2021). Conoscere il potenziale di accumulo di lipidi delle diatomee in diverse condizioni di disponibilità di nutrienti, stress ambientale e temperatura è fondamentale per ottimizzare la produzione dei lipidi di interesse (Sharma et al., 2021). Nella produzione di biocarburanti, le caratteristiche degli acidi grassi impiegati influenzano significativamente le proprietà del prodotto finale. Ad esempio, un'elevata percentuale di acidi grassi monoinsaturi è particolarmente desiderabile in quanto essi presentano un punto di fusione più elevato e una migliore stabilità ossidativa (Sharma et al., 2021). Ottimizzare la produzione di biomassa e il profilo di acidi grassi ottenuti, anche con approcci di editing genomico, rappresenta un'opportunità economica rilevante.

Anche se negli ultimi anni sempre più ricerche si sono rivolte alla comprensione della loro biologia e all'ottimizzazione del loro utilizzo industriale, ulteriori sforzi sono necessari per poter sfruttare tutto il loro potenziale e migliorare i progressi verso lo sviluppo sostenibile.

Bibliografia

Hao, X., Chen, W., Amato, A., Jouhet, J., Maréchal, E., Moog, D., Hu, H., Jin, H., You, L., Huang, F., Moosburner, M., Allen, A.E. and Gong, Y. (2022), Multiplexed CRISPR/Cas9 editing of the long-chain acyl-CoA synthetase family in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* reveals that mitochondrial ptACSL3 is involved in the synthesis of storage lipids. *New Phytol*, 233: 1797-1812.

Dhaouadi, F. , Awwad, F. , Diamond, A. and Desgagné-Penix, I. (2020) Diatoms' Breakthroughs in Biotechnology: *Phaeodactylum tricornerutum* as a Model for Producing High-Added Value Molecules. *American Journal of Plant Sciences*, 11, 1632-1670.

Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, T. P., Franke, R. B., Graham, I. A., Katayama, K., Kelly, A. A., Larson, T., Markham, J. E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., ... Ohlrogge, J. (2013). Acyl-lipid metabolism. *The arabidopsis book*, 11, e0161.

Xiaojing Guo, Mulan Jiang, Xia Wan, Chuanjiong Hu, Yangmin Gong (2014). Identification and biochemical characterization of five long-chain acyl-coenzyme A synthetases from the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 74, Pages 33-41, ISSN 0981-9428.

Kroth, P.G., Bones, A.M., Daboussi, F. et al.(2018). Genome editing in diatoms: achievements and goals. *Plant Cell Rep* 37, 1401–1408.

Moosburner, M. A., Gholami, P., McCarthy, J. K., Tan, M., Bielinski, V. A., and Allen, A. E. (2020). Multiplexed knockouts in the model diatom *Phaeodactylum* by episomal delivery of a selectable Cas9. *Front. Microbiol.* 11, 5.






Chen Z, Luo L, Chen R, Hu H, Pan Y, Jiang H, Wan X, Jin H, Gong Y. 2018. Acetylome profiling reveals extensive lysine acetylation of the fatty acid metabolism pathway in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. *Molecular and Cellular Proteomics* 17: 399–412.

N. Sharma, D.P. Simon, A.M. Diaz-Garza, E. Fantino, A. Messaabi, F. Meddeb-Mouelhi, H. Germain, I. Desgagné-Penix (2021). Diatoms biotechnology: various industrial applications for a greener tomorrow *Front. Mar. Sci.*, 8, p. 106.

Bramhanwade, K., Narkhedkar, V., Dhyani, S. (2023). Potential Industrial Application of Diatoms for a Greener Future. In: Srivastava, P., Khan, A.S., Verma, J., Dhyani, S. (eds) *Insights into the World of Diatoms: From Essentials to Applications*. Plant Life and Environment Dynamics. Springer, Singapore.

McCarty NS, Graham AE, Studená L, Ledesma-Amaro R. (2020). Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nat Commun.* 2020 Mar 9;11(1):1281.

Multiplexed CRISPR/Cas9 editing of the long-chain acyl-CoA synthetase family in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* reveals that mitochondrial ptACSL3 is involved in the synthesis of storage lipids

Xiahui Hao^{1*}, Wenchao Chen^{1,2*}, Alberto Amato³ , Juliette Jouhet³, Eric Maréchal³, Daniel Moog⁴, Hanhua Hu⁵ , Hu Jin⁶, Lingjie You¹, Fenghong Huang^{1,2}, Mark Moosburner^{7,8} , Andrew E. Allen^{7,8}  and Yangmin Gong^{1,2} 

¹Oil Crops Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China; ²Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China; ³Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Centre National de la Recherche Scientifique, Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Grenoble Alpes, UMR 5168, Grenoble F-38041, France; ⁴Laboratory for Cell Biology, Philipps-University Marburg, Marburg D-35032, Germany; ⁵Key Laboratory of Algal Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; ⁶Center for Microalgal Biotechnology and Biofuels, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; ⁷Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA; ⁸J. Craig Venter Institute, 4120 Capricorn Lane, La Jolla, CA 92037, USA

Summary

- Long-chain acyl-CoA synthetases (LACS) play diverse and fundamentally important roles in lipid metabolism. While their functions have been well established in bacteria, yeast and plants, the mechanisms by which LACS isozymes regulate lipid metabolism in unicellular oil-producing microalgae, including the diatom *Phaeodactylum tricornutum*, remain largely unknown.
- In *P. tricornutum*, a family of five genes (*ptACSL1*–*ptACSL5*) encodes LACS activities. We generated single *lacs* knockout/knockdown mutants using multiplexed CRISPR/Cas9 method, and determined their substrate specificities towards different fatty acids (FAs) and subcellular localisations.
- *ptACSL3* is localised in the mitochondria and its disruption led to compromised growth and reduced triacylglycerol (TAG) content when cells were bubbled with air. The *ptACSL3* mutants showed altered FA profiles in two galactoglycerolipids and phosphatidylcholine (PC) with significantly reduced distribution of 16:0 and 16:1. *ptACSL5* is localised in the peroxisome and its knockdown resulted in reduced growth rate and altered molecular species of PC and TAG, indicating a role in controlling the composition of acyl-CoAs for lipid synthesis.
- Our work demonstrates the potential of generating gene knockout mutants with the mutation of large fragment deletion using multiplexed CRISPR/Cas9 and provides insight into the functions of LACS isozymes in lipid metabolism in the oleaginous microalgae.

Author for correspondence:
Yangmin Gong
Email: gongyangmin@caas.cn

Received: 3 August 2021
Accepted: 1 December 2021

New Phytologist (2022) **233**: 1797–1812
doi: 10.1111/nph.17911

Key words: fatty acid, long-chain acyl-CoA synthetase, multiplexed CRISPR/Cas9, *Phaeodactylum tricornutum*, triacylglycerol.

Introduction

Fatty acids (FAs), a highly diverse class of molecules, have variable chain length and a number of double bonds and are building blocks for all membrane lipids and storage lipids in the cells. They are essential molecules in almost all organisms. Different from the process in animals and fungi, which produces FAs primarily in the cytosol for lipid biosynthesis, in plants *de novo* synthesis of FAs takes place in the plastid via a repeated cycle of reactions with fatty acyl intermediates covalently attached to acyl

carrier protein (ACP), providing 16:0-, 18:0- and 18:1-ACP as the final products (Ohlrogge & Browse, 1995). These fatty acyl-ACP thioesters can serve as substrates to plastid-localised acyl-transferases and feed directly into the 'prokaryotic' lipid synthesis pathway to produce phosphatidylglycerol (PG) and other thylakoid lipids such as sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG), monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) in the plastid (Heinz & Roughan, 1983; Jessen *et al.*, 2015). Alternatively, the current model proposes that some acyl-ACPs are hydrolysed in the plastid stroma by the action of acyl-ACP thioesterase to release free FAs that are targeted for export from the plastid. Once activated to fatty acyl-CoAs, these

*These authors contributed equally to this work.

acyl groups can enter the eukaryotic pathway in the endoplasmic reticulum (ER) for incorporation into extraplastidial membrane lipids and storage lipids. In addition, plastid-derived FAs are also substrates for the eukaryotic pathway to synthesise important lipid precursors, such as phosphatidic acid (PA) and diacylglycerol (DAG), which are imported back to the plastid for thylakoid lipid biosynthesis. This two-pathway hypothesis for thylakoid lipid biosynthesis was originally postulated by Roughan *et al.* (1980), Roughan & Slack (1982), supported by specific acyl compositions of lipid molecular species derived from the plastid and ER pathways (Heinz & Roughan, 1983), and later corroborated by genetic and biochemical analysis of several mutants in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Kunst *et al.*, 1988; Wallis & Browse, 2002; Xu *et al.*, 2008). In contrast with plants that contain the primary plastids with a two-membrane envelope, evidence is lacking to support such a similar pathway for phospholipid trafficking from the ER to chloroplasts to form galactolipids in photosynthetically active stramenopiles with a secondary plastid surrounded by four limiting membranes, such as the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. and the diatom *P. tricornutum*. In these photosynthetic eukaryotes, MGDG and DGDG are characterised by a high content of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3), which is synthesised in the ER from the initial substrate of plastid-exported 16:0. After synthesis in the ER, 20:5 needs to be imported into the plastid through the unknown ‘omega pathway’ (Petroustos *et al.*, 2014; Dolch *et al.*, 2017).

In plants, before becoming accessible to the ‘eukaryotic’ lipid synthesis pathway, free FAs need to be activated by esterification with CoA to form acyl-CoA thioesters as they are chemically inert. The activation of free FAs to form fatty acyl-CoAs is catalysed by long-chain acyl-CoA synthetases (LACS; EC 6.2.1.3). This reaction occurs in two steps. First, the free FA reacts with ATP to generate an intermediate fatty acyl-AMP (acyl adenylate) with the release of pyrophosphate. In the second step, the enzyme bound acyl-AMP reacts with CoA to form acyl-CoA, with the release of AMP (Groot *et al.*, 1976). In photosynthetic stramenopiles, LACS activity is likely to be not only required for activation of free FAs (16:0 and 16:1) exported from the plastid, but also involved in the downstream 16:0 to 20:5 route in which it provides activated FAs for FA elongases and acyltransferases.

LACS activities have been localised in various subcellular compartments including the chloroplast, cytoplasm, ER, peroxisome, mitochondria and oil bodies. The physiological function of LACS in cellular homeostasis, particularly in lipid metabolism, has been studied in detail in bacteria (Black & DiRusso, 1994; Black *et al.*, 1997), yeast (Færgeman *et al.*, 2001; Zou *et al.*, 2003) and plants (Lü *et al.*, 2009; Weng *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010, 2019; Jessen *et al.*, 2011, 2015). As in higher plants, plastids of photosynthetic microalgae are also the principle site for *de novo* FA synthesis while further desaturation and chain elongation occur in the ER and fatty acyl catabolism takes place in the mitochondria and/or peroxisome via β -oxidation. We previously reported the identification of five LACS genes in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* that can synthesise and accumulate large amounts of triacylglycerols (TAGs) at stationary phase of growth and under stress conditions, particularly nitrogen

starvation (Guo *et al.*, 2014). Although the LACS isozymes have been identified in *Phaeodactylum*, the functional role of individual LACS in lipid metabolism, especially their contribution to storage lipid biosynthesis, remains largely unknown. In the past 10 yr, development of genome-editing techniques, such as the mutagenesis with transcription activator-like effector nucleases (TALENs) and the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) method (Daboussi *et al.*, 2014; Weyman *et al.*, 2015; Serif *et al.*, 2018; Moosburner *et al.*, 2020), has allowed us to generate targeted and stable modification of the diatom genome to address the functions of key genes. Considering acyl-CoA thioesters as key building blocks required for acyl-CoA-dependent TAG biosynthesis, we here used a multiplexed CRISPR/Cas9 method to generate *lacs* single mutants and to assess the contribution of each ptLACS isozyme to lipid biosynthesis. In addition, we determined their subcellular localisations, protein expression patterns and enzyme activities. Our results advance the understanding on the functions of LACS isozymes in lipid metabolism in oil-accumulating unicellular microalgae.

Materials and Methods

Strains and growth conditions

Phaeodactylum tricornutum strain Pt1 wild-type (WT) and derived mutants were grown in artificial seawater (ASW) media with F/2 nutrients (Guillard, 1975) at 22°C under white fluorescent lights (50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) with a 12 h : 12 h, light : dark cycle, and additional supplementation of 100 mg l⁻¹ Zeocin™ was included for mutants. For time-course growth experiments in static culture, 200-ml algal cultures were grown in batch mode for 12 d with an initial addition of inoculum to give a starting cell density of *c.* 5 × 10⁶ cells ml⁻¹. For growth experiments with aeration, duplicate 300-ml cultures were bubbled for 9 d with air supply sterilised by filtration through 0.22- μm Millipore filters. Samples were taken daily for cell counting and measurement of Nile red fluorescence and nitrate concentration. For the immunoblot experiment, algal cells were grown in N-replete F/2 medium to the exponential phase and then transferred to N-free medium for additional 72 h, or to N-replete medium bubbled with air, 1%, 4% and 10% CO₂ enriched air for additional 6 h.

Plasmid construction

Plasmids for the generation of *Phaeodactylum ptACSL* mutants using CRISPR/Cas9 method were constructed as described by Moosburner *et al.* (2020). To construct enhanced green fluorescent protein (eGFP) fusion plasmids, full-length ptACSL sequences were cloned into the multiple cloning sites (MCSs) of the expression vector pPha-CG/pPha-NG. For self-assembling split GFP constructs, we used the pPha-Dual vector that harbours two MCSs for gene cloning. Details are described in Supporting Information Methods S1. All the plasmids and primer sequences used in this study are listed in Tables S1, S2.

Generation of ptACSL1-5 mutants

ptACSL1–*ptACSL5* knockout (KO) or knockdown lines were generated using a multiplexed CRISPR/Cas9 method. The Inference of CRISPR Edits tool (ICE; Synthego, <https://ice.synthego.com>) was used to genotype *Phaeodactylum* mutant lines. Details are described in Methods S1.

In vitro LACS enzyme assay

Recombinant *Phaeodactylum* ptACSL proteins were produced from *E. coli* BL21 (DE3) pLysS and purified with Ni-NTA affinity column (Novagen). LACS enzyme activity was measured spectrophotometrically using an enzyme-coupled assay (Horswill & Escalante-Semerena, 2002; Methods S1). Determination of kinetic constants of recombinant ptACSLs is described in Methods S1.

Transformation of *Phaeodactylum*

All the plasmids of GFP fusions were transformed into *Phaeodactylum* by microparticle bombardment using Bio-Rad Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) as previously described (Zaslavskaja *et al.*, 2000). Bacterial-mediated conjugation was used to introduce the Cas9-ShBle:sgRNA episome into *Phaeodactylum* as described by Karas *et al.* (2015). Resistant colonies were selected on F/2 medium supplemented with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Zeocin.

Immunoblotting

Antibodies for ptACSL1 and ptACSL4 were generated as described previously (Chen *et al.*, 2018). The polyclonal antibodies that specifically recognise ptACSL2, ptACSL3 and ptACSL5 were raised by immunising rabbits with purified full-length recombinant proteins. The expression levels of ptACSL1–ptACSL5 were examined by immunoblotting, as described in Methods S1.

Lipid extraction and analysis

Glycerolipids from *Phaeodactylum* wild-type and the ptACSL mutants were extracted as described by Abida *et al.* (2015). The *sn*-position of FAs on individual glycerolipids and quantification of each molecular species was analysed by preferential loss using MS and MS2 analysis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), respectively, as previously described (Jouhet *et al.*, 2017). For detailed analysis of the change of TAG molecular species, TAGs were isolated using thin-layer chromatography (TLC) from total lipids of wild-type and the ptACSL3 mutants grown at static (day 11) and air-bubbled (day 7) conditions, and LC-MS method was used to quantify each molecular species of TAGs as described by Xie *et al.* (2020) (Methods S1).

RNA-seq analysis

Wild-type and the *ptACSL3* mutants were grown in static culture for 6 d and then transferred to the cultures bubbled with filtered air for additional 4 d. Cells were harvested at 2, 3, and 4 d for RNA-seq and samples under static culture for 6 d were used as the control (0 d). Three biological replicates of wild-type and the *ptACSL3* mutant and of each condition were processed for total RNA isolation using TRIzol reagent (Invitrogen), and RNA sequencing were performed on the Illumina NovaSeq 6000 platform. RNA-seq reads were aligned to the Ensemble reference genome and gene model annotation files. The DESeq2 R package (1.20.0) was used to detect differentially expressed genes (DEGs) between the wild-type and mutants. The DEGs were subjected to gene ontology (GO) enrichment analysis using the CLUSTERPROFILER R package (Methods S1).

Results

Substrate specificities of ptACSL1–ptACSL5 determined using *in vitro* enzyme assay

The purified recombinant ptACSL proteins served as enzyme sources in LACS activity assays, using different free FAs as a substrate. The tested substrates are endogenous FAs and some are present in a high proportion in acyl lipids of *Phaeodactylum*. We used an enzyme-coupled method for measurement of LACS activity (Horswill & Escalante-Semerena, 2002). Substrate specificities and catalytic efficiencies of ptACSL1–ptACSL5-catalysed reactions were determined by varying the concentrations of free FAs with fixed saturating concentrations of ATP and CoA. The plots of initial velocities vs free FA concentrations were fitted to the Michaelis–Menten equation to determine the K_m , k_{cat} , and k_{cat}/K_m values. As shown in Table 1, K_m values for all five ptACSLs were in the range 27–451 μM , and all five ptACSL enzymes exhibited LACS activity for oleic acid (18:1n-9) with k_{cat}/K_m values ranging from 1851 to 5912 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. When supplied with different FA substrates, ptACSL1 was found to be the most active and have the highest catalytic efficiency (k_{cat}/K_m , the constant that better measures the specificity for the substrate) for EPA, with a value exceeding by two orders of magnitude that measured in the presence of 16:0. Similarly, ptACSL4 also displayed a preference for EPA, with a k_{cat}/K_m value 5-fold and 184-fold higher than those obtained with the two other FAs tested. Additionally, of the five LACS enzymes, ptACSL5 was the only LACS to show no activity for EPA. The K_m values determined for ptACSL5, which reflected the binding affinity of an enzyme for a substrate, indicated that ptACSL5 had the greatest affinity for 18:0 with a K_m value of 45 μM . These data showed that recombinant ptACSL proteins exhibited a difference in specificities towards free FAs, and that ptACSL1 and ptACSL4 had the highest catalytic efficiency for EPA, the most abundant very long-chain polyunsaturated FA (VLC-PUFA) detected in *Phaeodactylum*.

Table 1 Kinetic parameters of recombinant ptACSL1–ptACSL5 for the synthesis of fatty acyl-CoAs from free fatty acids.

FFA	ptACSL1			ptACSL2			ptACSL3		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
14:0	155	0.115	736	451	0.081	180	ND	ND	ND
16:0	95 ± 32	0.051 ± 0.01	540	27	0.09	3305	ND	ND	ND
18:0	83	0.071	848	50 ± 13	0.154	3063	ND	ND	ND
18:1	91	0.54	5912	80	0.242	2988	268 ± 93	0.497	1851
20:5	120 ± 38	5.263	43687	150	0.138	920	124 ± 29	0.171	639

FFA	ptACSL4			ptACSL5		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
14:0	ND	ND	ND	140	0.07	504
16:0	ND	ND	ND	179	0.068	378
18:0	135 ± 33	0.02	147	45	0.105	2300
18:1	160 ± 35	0.776	4853	165 ± 33	0.407	2465
20:5	202	5.487	27 136	ND	ND	ND

Experiments were carried out in triplicate at 37°C in 50 mM Hepes buffer (pH 7.5) by varying the concentration of free fatty acid substrate with fixed saturating concentrations of ATP (2.5 mM) and CoA (1.0 mM).

Unless otherwise indicated, standard errors on measurement are < 15%. ND, no detectable activity was observed in this experiment.

Subcellular localisation of LACS isozymes in *Phaeodactylum*

ptACSL1 was previously reported to be localised in the plastid (Chen *et al.*, 2018). To study its precise membrane location, we used the GFP self-assembling system (Cabantous *et al.*, 2005) to determine the localisation and orientation of ptACSL1. In this GFP reporter system, the last beta strand of GFP (GFP_S11) was attached to the C-terminus of ptACSL1 and the beta strands 1–10 (GFP_S1–10) were C-terminally fused either to a chloroplast ER (cER) marker to be expressed in the ER lumen or expressed as a cytosolically localised large GFP_S1–10 fragment. These constructs were transformed into *Phaeodactylum*, and a cER-characteristic GFP fluorescence could be observed only when a fusion protein consisting of full-length sequence of ptACSL1 and GFP_S11 was simultaneously expressed with the large GFP_S1–10 fragment. By contrast, expression of the same ptACSL1 fusion protein with a cER-targeted PDI-GFP_S1–10 (PDI) fusion construct resulted in the absence of detectable fluorescence signal (Fig. 1). This indicates a localisation of ptACSL1 in the cER or cER membrane (outermost membrane of the complex plastid) with a C-terminal orientation towards the cytoplasm. The hydrophobicity plot predicted a short transmembrane region at the N-terminus of ptACSL1, it is therefore possibly localised in the cER membrane with the C-terminus facing the cytoplasm.

The attachment of ptACSL2 to GFP (ptACSL2:eGFP) caused GFP fluorescence to be located in the cytoplasm. In the transformants harbouring the ptACSL4:GFP fusion construct, the GFP signal was also mainly dispersed throughout the cytoplasm. Fusion of ptACSL3 with GFP led to the mitochondria-characteristic fluorescence, indicating its location in the mitochondria that are in close proximity to the complex plastid. A peroxisomal targeting signal (PTS) type 1 (SKL), which is necessary for targeting and import of cytosolically expressed proteins

into peroxisomes, was found to be located at the extreme C-terminus of the ptACSL5 isoform. For the *in vivo* localisation study we fused eGFP upstream of full-length sequence of ptACSL5 to ensure the PTS remained accessible, and this eGFP:ptACSL5 fusion construct resulted in a punctate GFP fluorescence pattern (Fig. 1), confirming its peroxisomal localisation in transfected *Phaeodactylum* cells.

Immunoblot analyses of ptACSL accumulation in response to nitrogen deprivation and elevated CO₂

Nitrogen-starved *Phaeodactylum* cells are capable of accumulating large amounts of TAGs, the major storage compounds for FAs. Lipid accumulation also increased in *Phaeodactylum* cells grown in seawater in response to elevated atmospheric CO₂ concentration (Jensen *et al.*, 2019). We therefore studied the expression of LACS in response to nitrogen deprivation and increased CO₂ supply. Using a ptACSL-specific antibody (Fig. S1), we detected the protein levels using western blotting in *Phaeodactylum* cells grown in F/2 medium with nitrogen deprivation and supplied with different concentrations of CO₂. As shown in Fig. 2(a), the expression of ptACSL1–ptACSL4 proteins was regulated by nitrogen deprivation, while ptACSL5 showed a constant expression, suggesting differential expression of these LACS isozymes upon nitrogen deprivation at protein levels. The expression of ptACSL1 and ptACSL3 was induced by nitrogen deprivation and their abundances peaked at 72 h. By contrast, the level of ptACSL2 was very high under nitrogen-replete condition, but it declined during the time course of nitrogen deprivation. When cells were grown at atmospheric CO₂ or at high CO₂ concentrations (1%, 4% and 10%), the expression levels of ptACSL1, 2 and 4 were slightly suppressed at high CO₂ compared with that at atmospheric CO₂. Notably, the expression of ptACSL3 was

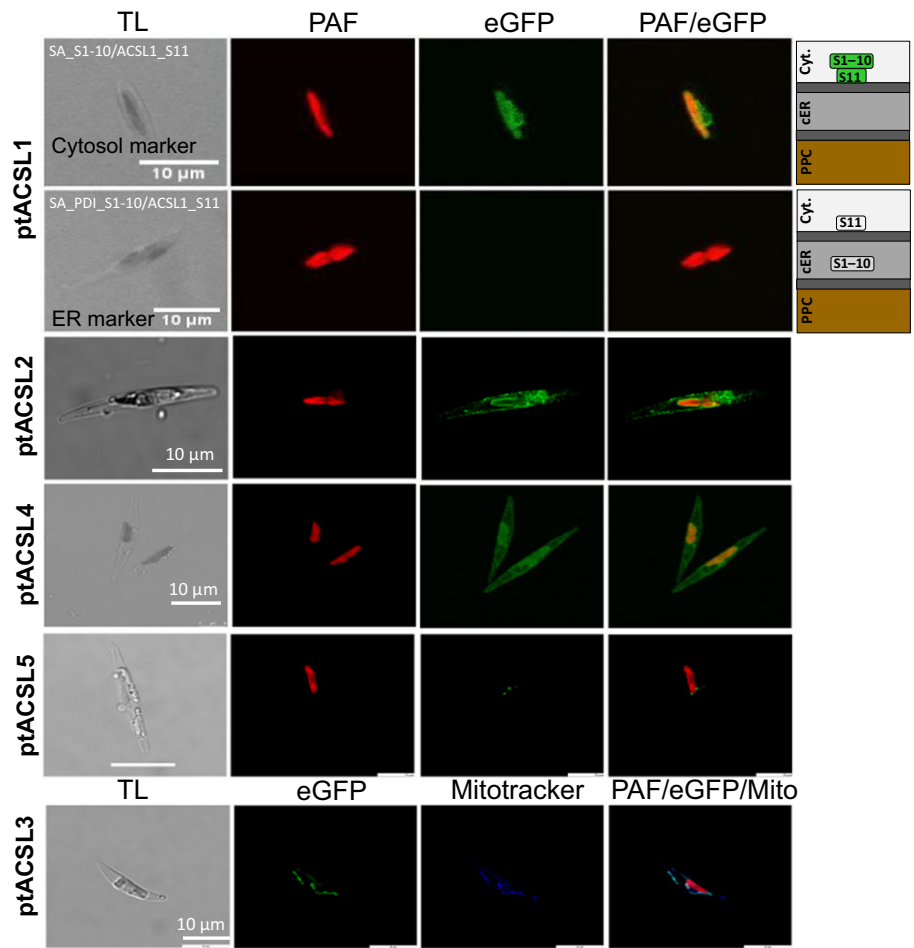
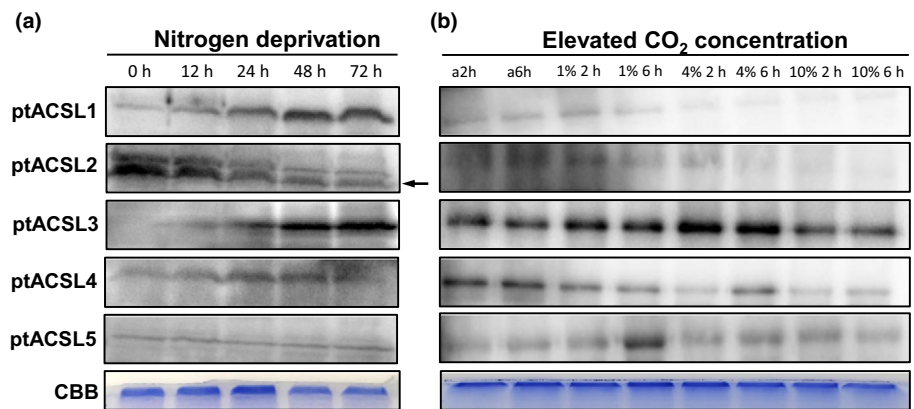


Fig. 1 *In vivo* localisation of *Phaeodactylum* long-chain acyl-CoA synthetase (LACS) isoforms. Self-assembly green fluorescent protein (GFP) system was used for analysis of ptACSL1 plastid localisation. The chloroplast endoplasmic reticulum (cER) characteristic fluorescence pattern could be observed when ptACSL1 fused to GFP_S11 was simultaneously expressed with a cytosolic GFP_S1-10. Expression of ptACSL1_S11 with the ER marker (PDI) fused to GFP_S1-10 led to no fluorescence. Expression of full-length ptACSL2 and ptACSL3 with C-terminally fused enhanced GFP (eGFP) indicated localisation in the plastid. Localisation of ptACSL4:eGFP fusion led to indistinct results (plastid, plasma membrane and cytosol). eGFP with N-terminal fusion with ptACSL5 showed a fluorescence signal in the peroxisome. PAF, plastid autofluorescence; PAF/eGFP, overlap of plastid and GFP fluorescence; TL, transmitted light. Bar, 10 µm.

Fig. 2 Expression patterns of *Phaeodactylum* long-chain acyl-CoA synthetase (LACS) family proteins. Lysates of *Phaeodactylum* cultures under (a) nitrogen deprivation condition, and (b) supplied with filtered air (low CO₂, c. 0.04% CO₂) for 2 h (a2h) and 6 h (a6h) or high concentrations of CO₂ (1%, 4% and 10%) for 2 h and 6 h, were analysed by western blotting using polyclonal antibodies against ptACSL1-5. Loading of protein samples was equalised using total protein extracts of each sample visualised with Coomassie brilliant blue (CBB) staining as loading control. Arrow in (a) indicates the target band of ptACSL2.



upregulated at elevated CO₂ and reached the highest level at 4% CO₂ concentration, followed by a decline at 10% CO₂ concentration (Fig. 2b).

Multiplexed CRISPR/Cas9 system induced mutation of single ptACSL gene

We used multiplexed CRISPR/Cas9 to generate single mutants for each ptACSL gene (Moosburner *et al.*, 2020). For creating the single mutants for all five ptACSL genes, we prepared 10

Cas9-sgRNA episome-based constructs that each carried three sgRNA expression cassettes to target three different sites within a gene (Fig. 3a). The final vectors expressing Cas9 and the sgRNA assay were transformed into *Phaeodactylum*, and polymerase chain reaction (PCR) followed using Sanger sequencing was conducted to detect targeted mutations. Detailed analysis of, in total, 246 sequenced sites from all five ptACSL genes showed that most colonies had a mixed genotype, which consisted of a wild-type sequence, nucleotide deletion and a very low percentage of nucleotide insertion. We compared the editing efficiencies of

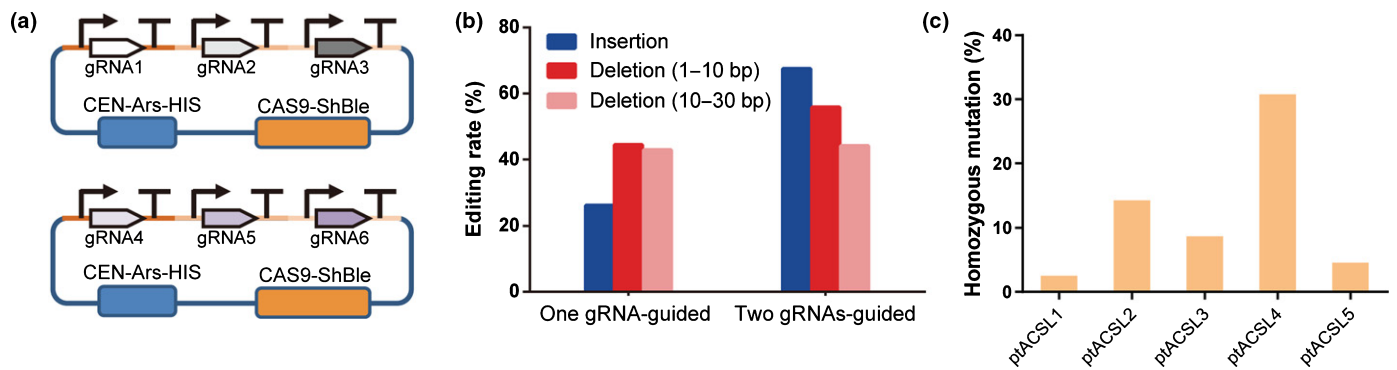


Fig. 3 Multiple targeted mutagenesis of *ptACSL1*–*ptACSL5* genes by clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) in *Phaeodactylum*. (a) Schematic depiction of the multiple CRISPR/Cas9 method for simultaneously targeting multiple sites in the *Phaeodactylum* genome. Each of the CRISPR-episome plasmids consists of three different gRNA expression cassettes driven by the sRNAi promoter, Cas9 protein, the *ShBle* resistance gene cassette, and the yeast-derived *CEN6-ARSH4-HIS3* element conferring episomal replication in the diatom *Phaeodactylum*. The gRNAs are transcribed independently and direct Cas9 to multiple targets. The gRNAs indicated by blunt ended arrows are controlled by the sRNAi promoter and terminator. (b) Frequencies of different editing events observed in *ptACSL1*–*ptACSL5* target regions induced by a single gRNA or double gRNAs using the multiple CRISPR/Cas9 system, which were calculated from 30 mutated sites (not including those of homozygous fragmental deletions between two targeted sites). (c) Comparison of mutation frequencies of large fragment deletions between two targeted sites occurred among five *ptACSL* genes.

target mutations induced by different numbers of gRNAs, and found that the mutation frequency of nucleotide insertion induced by double gRNAs was two-fold higher than that induced by a single gRNA. In double gRNAs-induced mutations, the frequencies of deletions of 1–10 bp in size were slightly higher than that of single gRNA-induced mutations, while the frequencies of deletions with 10–30 bp in size were similar (Fig. 3b). Notably, we also detected homozygous biallelic mutations with large fragment deletions (158–230 bp) between two cleavage sites in some colonies. Homozygous biallelic mutations occurred in a varied frequency among different *ptACSL* genes, with the highest mutagenesis frequency of 30% in *ptACSL4* and the lowest frequency of 2.5% in *ptACSL1* (Fig. 3c). We propagated these *Phaeodactylum* mutant lines in liquid medium and then plated dilutions to obtain single colonies. Further sequencing was conducted to detect the targeted mutations, and this showed that the percentage of homozygous biallelic mutations was greatly increased. Finally, we confirmed the absence of the wild-type gene using PCR with genomic DNA prepared from these sequenced single colonies. For this purpose, we designed a pair of primers with one being located in the region of fragmental deletion (between two active cleavage sites), and the other outside it and corresponding to the nonediting region (Fig. 4a,b). For instance, genomic PCR showed that the expected DNA bands could be observed in wild-type/control colonies, whereas there was no DNA band in the *ptACSL1* or *ptACSL3* KO mutants (Fig. 4c,d). The mutation of long fragment deletions was also verified using reverse transcription PCR (RT-PCR), indicating the complete lack of detectable expression of *ptACSL* genes (Fig. 4e,f). Using this method, we obtained the single KO mutants for *ptACSL1*, *ptACSL2*, *ptACSL3* and *ptACSL4*, and knockdown mutants for *ptACSL5* (Figs 4, S2). Therefore, creating long deletions with multiple gRNAs should be a more efficient approach to achieve targeted mutagenesis, and a rapid and low-cost PCR-based method could be used to screen positive KO colonies, not relying

on expensive genotyping methods such as high-throughput next generation sequencing. Finally, we selected three independent mutant lines for each *lacs* mutant for further phenotyping.

Growth and lipid content of *ptACSL* knockout mutants

To evaluate the influence of mutations on cell growth and lipid accumulation, we carried out time-course growth experiments using single mutants for each *ptACSL* gene under both static culture and air-bubbling conditions. During both 12 d of static cultivation and 9 d of growth with air-bubbling, there was no difference in cell density, nitrate concentration in the medium, and neutral lipid content revealed using Nile red fluorescence intensity between wild-type and either *ptACSL1*, *ptACSL2* or *ptACSL4* mutants (Figs 5a,b, S3, S4). Interestingly, in static conditions, there was a significant increase in neutral lipid content in the *ptACSL3* mutants after day 7, at which nitrate concentration was reduced to half the initial concentration (Fig. 5b,c). The *ptACSL3* mutants accumulated more TAGs compared with wild-type that was revealed using a TLC analysis of lipids from these algal samples (Fig. 5d). We further evaluated the growth of the mutants under lower or higher temperature, and found there was no difference in growth between wild-type and the *ptACSL3* mutants at 15°C in static culture (Fig. S5a). By contrast, wild-type cells grew slowly when the temperature was increased to 28°C, while the growth of the *ptACSL3* mutants was almost arrested (Fig. S5b). However, when algal cultures were bubbled with air (low CO₂, *c.* 0.04% v/v CO₂), cell densities of both *ptACSL1* and *ptACSL3* mutants were significantly reduced compared with the wild-type (Fig. 5e), especially after 6 d of growth. Indeed, whereas nitrate in the F/2 medium in wild-type was almost exhausted at day 6, nitrate concentration in the *ptACSL3* mutants was reduced to the lowest level at day 8 (Fig. 5f). Therefore, neutral lipid content was significantly reduced in the *ptACSL3* mutants after day 7 compared with wild-type, maybe

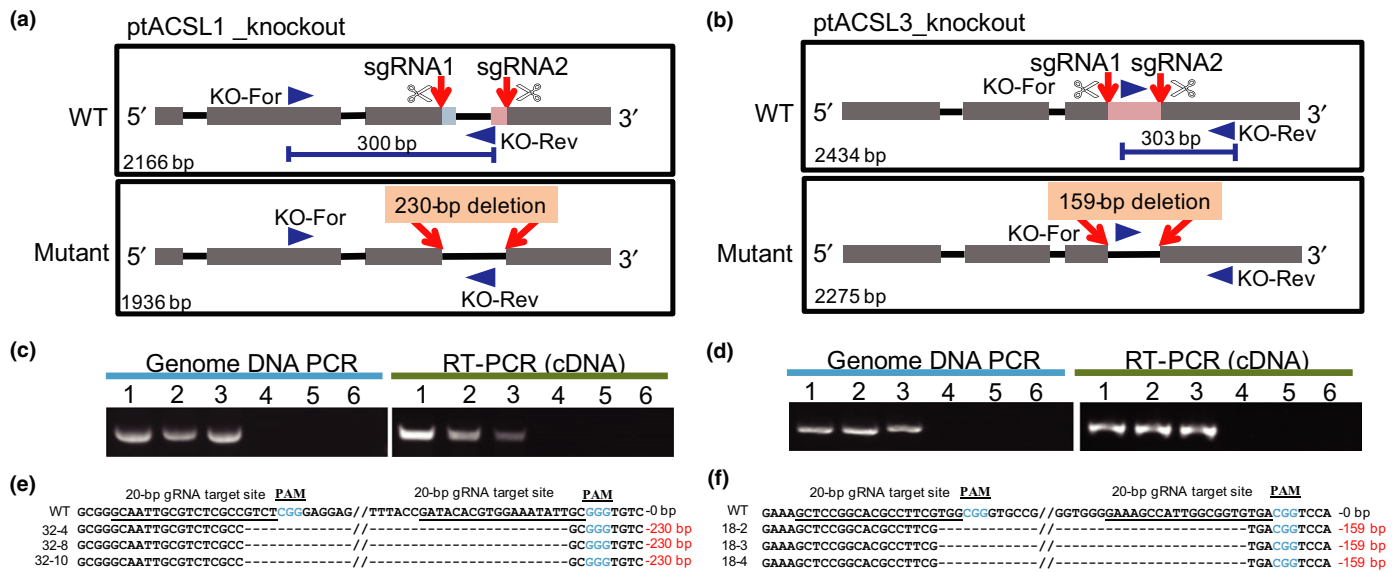


Fig. 4 Genome editing of *ptACSL1* and *ptACSL3* using multiple clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) system led to the generation of fragmental deletions in *Phaeodactylum*. Schematic representations show the fragmental deletions between two targeted sites of the (a) *ptACSL1* and (b) *ptACSL3* mutants. A pair of primers was designed to detect the large fragment deletions induced by multiple CRISPR/Cas9 in the (c) *ptACSL1* and (d) *ptACSL3* mutants with polymerase chain reaction (PCR) using genomic DNAs and total complementary DNAs (cDNAs) as templates. For DNA sequencing, PCR amplifications were carried out using primer pairs flanking the designed target sites, and the PCR products were sequenced directly using internal specific primers. Representative sequences of fragment deletions in the (e) *ptACSL1* and (f) *ptACSL3* mutants were aligned with that of wild-type. The protospacer adjacent motif (PAM) region is shown in blue colour letters, and the number at the end shown in red colour letters indicates deleted (–) bases between two Cas9 cuts.

because nitrogen starvation started slightly later in *ptACSL3* mutants. TLC also showed that the *ptACSL3* mutants accumulated less TAGs, especially at day 7 (Fig. 5g,h). In bubbled air conditions, we observed a slower growth of the *ptACSL5* knock-down mutants compared with the wild-type from day 4 and nitrate was almost exhausted at day 5 for both wild-type and the mutants. However, the impairment of *ptACSL5* did not result in a change in neutral lipid content, which was revealed using Nile red staining (Fig. S6).

ptACSL3 mutation affects TAG synthesis and fatty acid profiles of glycolipids when algal culture is bubbled with air

FAs and lipids from wild-type and the *ptACSL3* mutants were analysed at the exponential (6 d) and stationary phases (9 d) of growth. When cells were bubbled with filtered air and harvested at dusk, total FA accumulation in the exponential phase was decreased from 738 nmol mg⁻¹ of dry cell weight (dcw) in wild-type to 592 nmol mg⁻¹ of dcw in the *ptACSL3* mutants. In the stationary phase, total FA content declined from 1137 nmol mg⁻¹ of dcw in wild-type to 811 nmol mg⁻¹ of dcw in the *ptACSL3* mutants. KO of *ptACSL3* significantly reduced total FA accumulation relative to wild-type, indicating that *de novo* FA synthesis was inhibited in the *ptACSL3* mutants. As the major FAs synthesised in the chloroplast, palmitic acid (16:0) and palmitoleic acid (16:1) showed significantly reduced accumulation. The level of 16:0 was reduced from 132 nmol mg⁻¹ of dcw in the wild-type to an average of 89 nmol mg⁻¹ of dcw in the exponential phase, and from 331 to 189 nmol mg⁻¹ of dcw

in the stationary phase. Similarly, the level of 16:1 was also decreased in the mutants at both growth phases (Fig. 6a). KO of *ptACSL3* did not change the accumulation of other FA including the abundant EPA. Analysis of FA profiles revealed a significant decrease in the proportions of 16:0, 16:1 and 18:1 balanced by an increase in 16:2, 16:3 and 20:5 in the *ptACSL3* mutants relative to wild-type at both growth phases (Fig. 6b).

Glycerolipidomic analysis was performed to determine how the inactivation of *ptACSL3* influenced lipid class composition and the distribution of different molecular species within each lipid class. Compared with wild-type, disruption of the *ptACSL3* gene led to a significant reduction in TAG (76%, $P < 0.0001$), DAG (50%, $P < 0.01$) and DGTA (46%, $P < 0.05$) and an increase in every phospholipid, that is phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) in the exponential phase (Fig. 7a). With the depletion of nitrogen, wild-type accumulated large amounts of TAGs in the stationary phase, accounting for 48% of total glycerolipids. However, the relative content of TAG was reduced to 25% in the *ptACSL3* mutant (48% reduction; $P < 0.001$) (Fig. 7a). In addition to TAG, the *ptACSL3* mutants also showed lower DAG content (51% reduction at the exponential phase, $P < 0.01$; 43% reduction at the stationary phase, $P < 0.01$). The decrease in the proportions of DAG and TAG in the *ptACSL3* mutants was compensated for by a significant increase in PC (five-fold increase; $P < 0.0001$) and three abundant thylakoid glycolipids (55% increase in SQDG, $P < 0.05$; 47% increase in MGDG, $P < 0.0001$; and 78% increase in DGDG, $P < 0.001$) in the stationary phase (Fig. 7a).

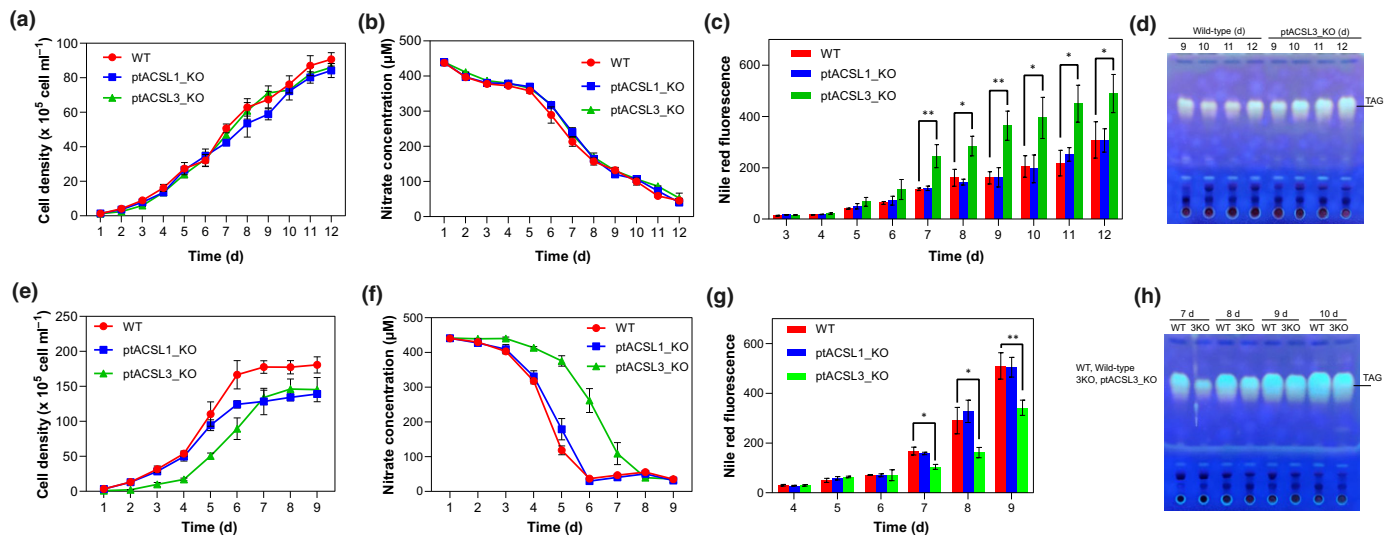


Fig. 5 Phenotype analyses of the *ptACSL1* and *ptACSL3* mutants. (a) Growth curves of the *ptACSL1* and *ptACSL3* mutants incubated in static cultures for 12 d. Cell densities were determined with a Z2 Coulter Counter. Results are the average of three biological replicates (independent lines) with error bars indicating standard deviations ($n = 3$). (b) Nitrate concentrations in culture medium for the *ptACSL1* and *ptACSL3* mutants incubated in static cultures. Data are the average of three biological replicates with error bars indicating standard deviations ($n = 3$). (c) Nile red fluorescence intensities of the *ptACSL1* and *ptACSL3* mutant cells incubated in static cultures for 12 d. Statistical analysis using paired-sample Student's *t*-test was performed by GRAPH PAD PRISM software (v.9.0): *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Data are the average of three biological replicates with error bars indicating standard deviations ($n = 3$). (d) Thin-layer chromatogram of total lipids from wild-type and the *ptACSL3* mutants incubated in static cultures for 9, 10, 11 and 12 d. Each lipid sample was extracted from $c. 5 \times 10^7$ cells. Triacylglycerols (TAGs) were visualised with 0.01% (w/v) Primuline reagent. (e) Growth curves of the *ptACSL1* and *ptACSL3* mutants under air-bubbling conditions for 9 d. Data are the average of three biological replicates (independent lines) with error bars indicating standard deviations ($n = 3$). (f) Nitrate concentrations in culture medium for the *ptACSL1* and *ptACSL3* mutant cultures bubbled with filtered air. Data are the average of three biological replicates with error bars indicating standard deviations ($n = 3$). (g) Nile red fluorescence intensities of the *ptACSL1* and *ptACSL3* mutant cultures bubbled with filtered air for 4–9 d. Statistical analysis using paired-sample Student's *t*-test was performed using GRAPH PAD PRISM (v.9.0): *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Data are the average of three biological replicates with error bars indicating standard deviations ($n = 3$). (h) Thin-layer chromatogram of total lipids from wild-type and the *ptACSL3* mutants under air-bubbling condition. 1, 3, 5, 7, 9, 10 d, respectively; 2, 4, 6, 8, lipid samples from the *ptACSL3* mutant grown for 7, 8, 9 and 10 d, respectively. Each lipid sample was extracted from $c. 5 \times 10^7$ cells, and TAGs were visualised with 0.01% (w/v) Primuline reagent.

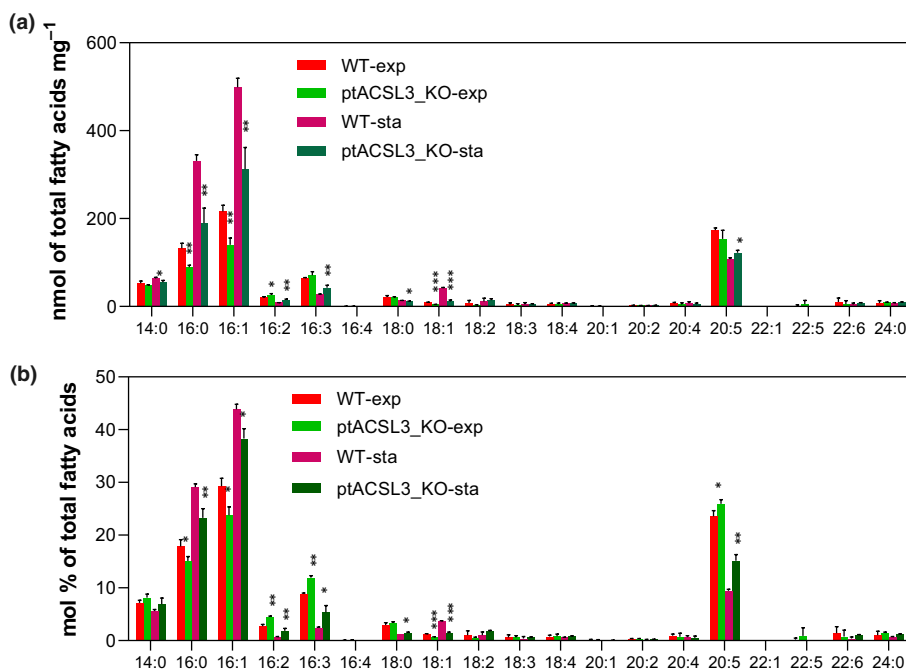


Fig. 6 Comparative analysis of (a) total fatty acid content and (b) fatty acid composition (mol % of total fatty acids) of wild-type and the *ptACSL3* mutants grown at exponential and stationary phases. Data are the average of three biological replicates with error bars indicating standard deviations ($n = 3$). Statistical analysis using paired-sample Student's *t*-test was performed by GRAPH PAD PRISM (v.9.0): *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

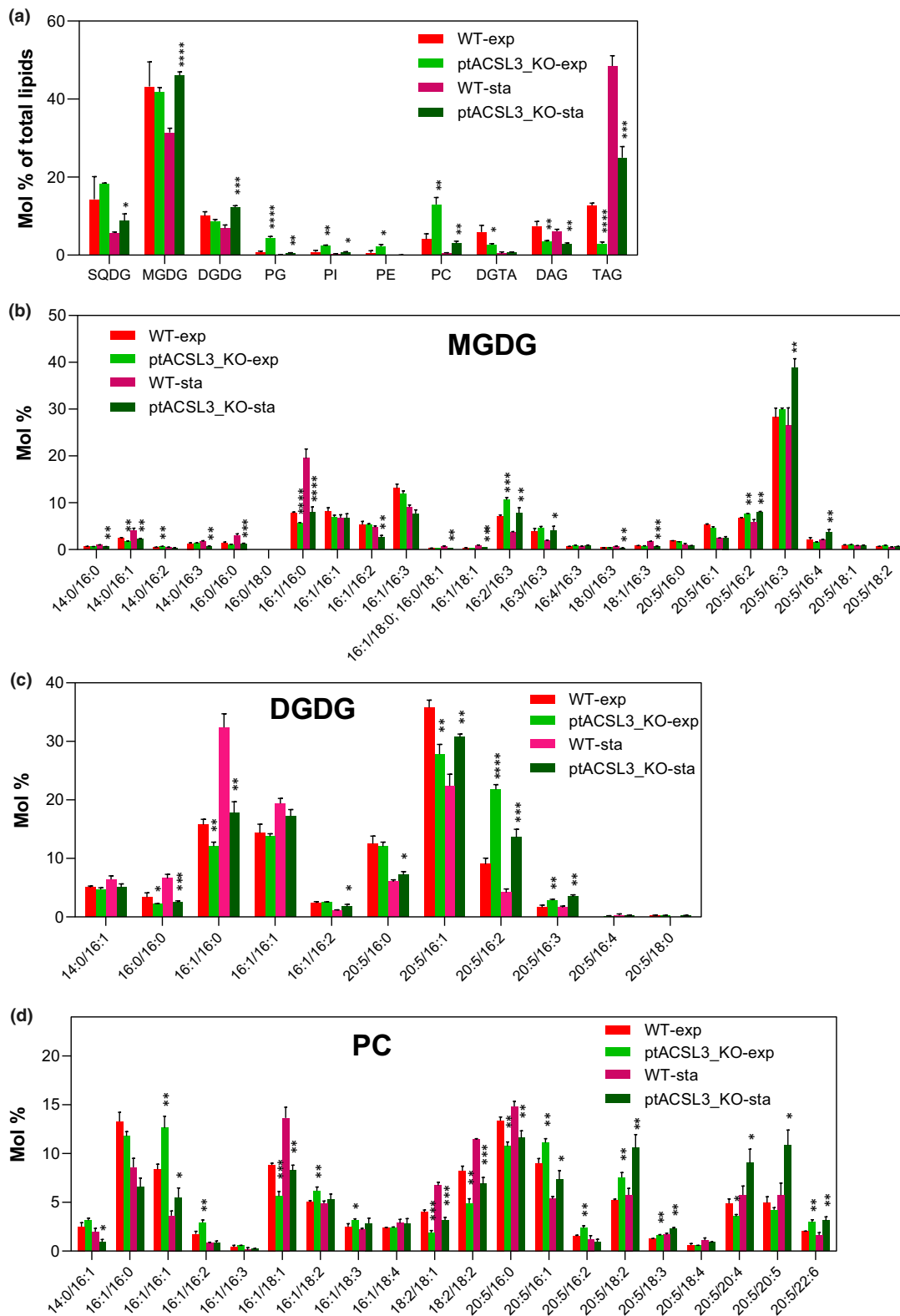


Fig. 7 Compared analysis of (a) the various glycerolipids and (b) lipid molecular species (monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)); (c) digalactosyldiacylglycerol (DGDG); (d) phosphatidylcholine (PC) between wild-type and the *ptACSL3* mutants grown at the exponential and stationary phases. Data are the average of three biological replicates with error bars indicating standard deviations ($n = 3$). Statistical analysis using paired-sample Student's *t*-test was performed by GRAPHPAD PRISM (v.9.0): *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

Further quantification of molecular species showed that at, both growth phases, both MGDG and DGDG in the *ptACSL3* mutants had a significant decrease in the proportions of molecular species containing 16:0/16:0 and 16:1/16:0. In MGDG of the *ptACSL3* mutants, 16:0/16:0 and 16:1/16:0 represented two species in which 16:0 is mainly enriched; 16:1 is distributed in seven molecular species, among which four species (14:0/16:1, 16:1/16:0, 16:1/16:2 and 16:1/18:1) showed significantly decreased levels while others (16:1/16:1, 16:1/16:3 and 20:5/16:1) remained unchanged at the stationary phase (Fig. 7b; Table S1). DGDG contains mainly nine molecular species and 16:0 is esterified in three species. Although the level of 20:5/16:0 was slightly increased in the *ptACSL3* mutants, 16:0/16:0 and 16:1/16:0 that contained the highest proportion of 16:0 showed a pronounced decrease (Fig. 7c; Table S1). These results suggested that the most abundant galactoglycerolipids MGDG and DGDG in the *ptACSL3* mutants had less 16:0 and 16:1, which was also supported by the analysis of FA composition of these two galactoglycerolipids (Figs S7, S8). As molecular species of MGDG and DGDG containing 16:0/16:0 and 16:1/16:0 in their DAG backbone are thought to be derived from the prokaryotic pathway, the impairment of *ptACSL3* led to a pronounced alteration in the FA profiles of chloroplast membrane lipids. In the plastid, 16:0 and 16:1 are released as acyl-ACPs from the FA synthase, and then transferred to the glycerol backbone of galactoglycerolipids. This process does not require the activated form of acyl-CoA thioesters. Therefore, the reduction of 16:0 and 16:1 in two galactoglycerolipids in the *ptACSL3* mutants reflects an inhibition of plastidic *de novo* FA synthesis. In the *ptACSL3* mutants, MGDG contained more 16:2/16:3, 16:3/16:3, 20:5/16:2, 20:5/16:3 and 20:5/16:4, while DGDG had higher levels of 20:5/16:0, 20:5/16:1, 20:5/16:2 and 20:5/16:3 at the stationary phase (Fig. 7b,c; Table S1). This change suggests that the chloroplast membrane lipids in the mutants contained more polyunsaturated FAs when compared with wild-type. More than 10 FAs were found to be at the *sn*-2 position of PC, where 16:0 was enriched in two molecular species (PC16:1/16:0 and 20:5/16:0) and 18:1 was found in the other two species (PC16:1/18:1 and 18:2/18:1). The proportions of all these four molecular PC species and one species with two C18 acyl chains (18:2/18:2) were significantly/slightly reduced in the *ptACSL3* mutants at both growth phases (Fig. 7d; Dataset S1), which was compensated for by an increase in 16:1/16:1- and 20:5-containing molecular species (20:5/16:1, 20:5/18:2, 20:5/18:3 and 20:5/22:6). Taken together, in air-bubbled conditions, the impairment of *ptACSL3* led to a significant reduction in TAG accumulation, an increase in phospholipid content and a strong alteration in FA profiles of MGDG, DGDG and PC with reduced distribution of 16:0, 16:1 and 18:1 in these lipid classes.

To examine whether molecular species of TAG were affected in the *ptACSL3* mutants, we used LC-MS to analyse the TAG composition of the wild-type and mutants grown under static conditions and in bubbling air. A heat map showing the variation in the percentage abundance of 20 major TAG species as the effect of *ptACSL3* disruption under both conditions revealed that the levels of the three most abundant TAG species, accounting for over 10% of total TAG species (48:1 (16:0/16:0/16:1), 48:2

(16:0/16:1/16:1) and 48:3 (16:1/16:1/16:1)), were not changed. When algal cultures were bubbled with filtered air, the levels of two molecular TAG species, including 50:1 (16:0/18:1/16:0) and 50:2 (16:1/18:1/16:0), and all 20:5/22:6-containing molecular species were decreased in the *ptACSL3* mutants compared with the wild-type (Fig. 8a). The decrease in percentage abundance of 18:1- and 20:5-containing TAG species in the *ptACSL3* mutants was in accordance with the substrate selectivity of the *ptACSL3* isozyme towards these two FAs from *in vitro* enzyme assay (Table 1). In the static culture, the *ptACSL3* mutants accumulated more TAGs than wild-type with no reduction in growth rate. However, TAG profiling showed that there was also no difference in percentage abundance in the three most abundant TAG species (48:1, 48:2 and 48:3) between the *ptACSL3* mutants and wild-type, and in the levels of only three molecular species, accounting for < 3% of total TAG species, TAG 50:3 (16:1/18:1/16:1), 50:4 (16:1/16:1/18:2) and 50:5 (16:1/16:1/18:3), were increased in the *ptACSL3* mutants (Fig. 8b).

Impacts of the *ptACSL3* KO on transcriptional change upon the transition of growth state

Because the *ptACSL3* mutants showed different changes in TAG accumulation under static culture (slow growth state) and in the culture bubbled with filtered air (rapid growth state), we performed mRNA-seq analysis to obtain mechanistic insight into the transcriptome response of *Phaeodactylum* to the shift of growth state. The global gene expression of *Phaeodactylum* as a function of time (i.e. over three time points, 2, 3 or 4 d) under the bubbling of air and static condition (0 d) was measured by mRNA-seq. In total, 5622 genes, accounting for 45% of all the annotated genes in the *Phaeodactylum* genome (http://protists.ensembl.org/Phaeodactylum_tricornutum/Info/Index/), were aligned with at least one read (fragments per kilobase of transcript per million (FPKM) mapped read value > 10) in each biological sample (Dataset S2). Based on the definition of differential gene expression, 746 genes were found to be significantly regulated at more than one time point in either the wild-type or the mutant sample (Dataset S2). Growth state transition led to strong transcriptomic responses, which was revealed by the gradually increased numbers of DEGs during growth in air-bubbling cultures. Compared with the static culture (0 d), 1937, 2543 and 3830 genes were significantly regulated ($P < 0.05$) at 2, 3 and 4 d respectively in wild-type; while 2986, 3342 and 3913 genes were detected to be differentially expressed at 2, 3 and 4 d, respectively, in the *ptACSL3* mutants. We used these DEG datasets to perform GO analysis with the *Phaeodactylum* genome as the reference, and found that the most obvious difference in the enriched GO terms between wild-type and the *ptACSL3* mutant was observed at 2 d. In wild-type, these DEGs were mainly enriched for cell division and structural constituent of ribosome at 2 d; whereas in the *ptACSL3* mutants the most over-represented GO term was 'mitochondria' (Fig. 9a,b).

In the mitochondria of most eukaryotes, both the tricarboxylic acid (TCA) cycle and FA β -oxidation occur, which play a central role in the catabolism of organic fuel molecules such as glucose,

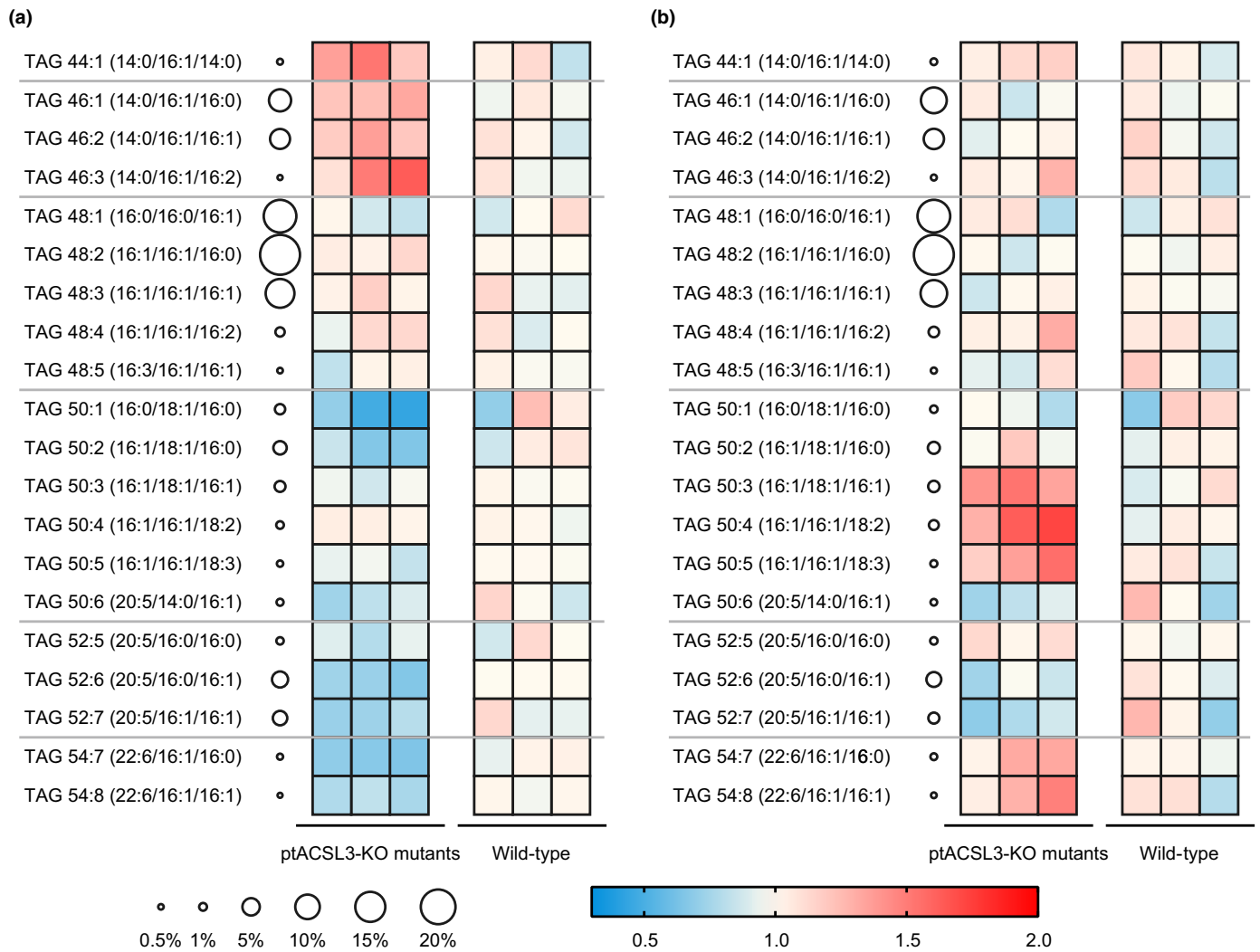


Fig. 8 The disruption of *ptACSL3* affects molecular composition of triacylglycerol (TAG). Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used to quantify different molecular species of TAG in wild-type and the *ptACSL3* mutants in three biological replicates. A heat map shows the percentage abundance of 20 major TAG species in each biological replicate relative to the average percentage abundance of that species in wild-type. Algal cultures were bubbled with filtered air and samples were (a) harvested at day 7, or (b) or cells were grown under static culture condition and harvested at day 9 for lipid extraction and TAG profiling.

FAs and amino acids. Mitochondria contain the full enzymatic machinery to oxidise FAs. After the conversion of FAs into CoA esters using a LACS enzyme, the acyl-CoA esters can enter the β -oxidation spiral, starting via the well established cascade of four steps involving dehydrogenation, hydration, dehydrogenation again and thiolytic cleavage of the acyl-CoA esters. We further determined if the expression patterns of genes associated with mitochondrial FA β -oxidation were affected in the *ptACSL3* mutants. In wild-type, genes encoding carnitine *O*-acyltransferase (CAT, Phatr3_J859), enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyl-CoA dehydrogenase (HADA, Phatr3_J35240) and β -ketoacyl-CoA thiolase (KCT3, Phatr3_J28068) known as the mitochondrial trifunctional protein β -subunit, were induced after growth state transition. However, the expression of these genes was downregulated or remained unchanged (Fig. 9c). Moreover, the expression

of genes encoding carnitine *O*-acyltransferase (CAT2, Phatr3_J48078), acyl-CoA dehydrogenase (MACAD1, J11014) catalysing the first step in β -oxidation, and 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HAD2, Phatr3_J39681) was slightly downregulated in wild-type after transfer to the culture bubbled with air, but the degrees of downregulation were higher in the *ptACSL3* mutants. These results indicated that disruption of *ptACSL3* led to an inhibition of mitochondrial FA β -oxidation upon transition from slow to rapid growth. As mitochondrial β -oxidation generates acetyl-CoAs and reducing power, and is essential for FA degradation and maintaining energy homeostasis in the cell, inhibition of mitochondrial β -oxidation might have a negative influence on FA synthesis under air-bubbling conditions, which caused a reduction in FA content and TAG synthesis in the *ptACSL3* mutants (Figs 5h, 6a).

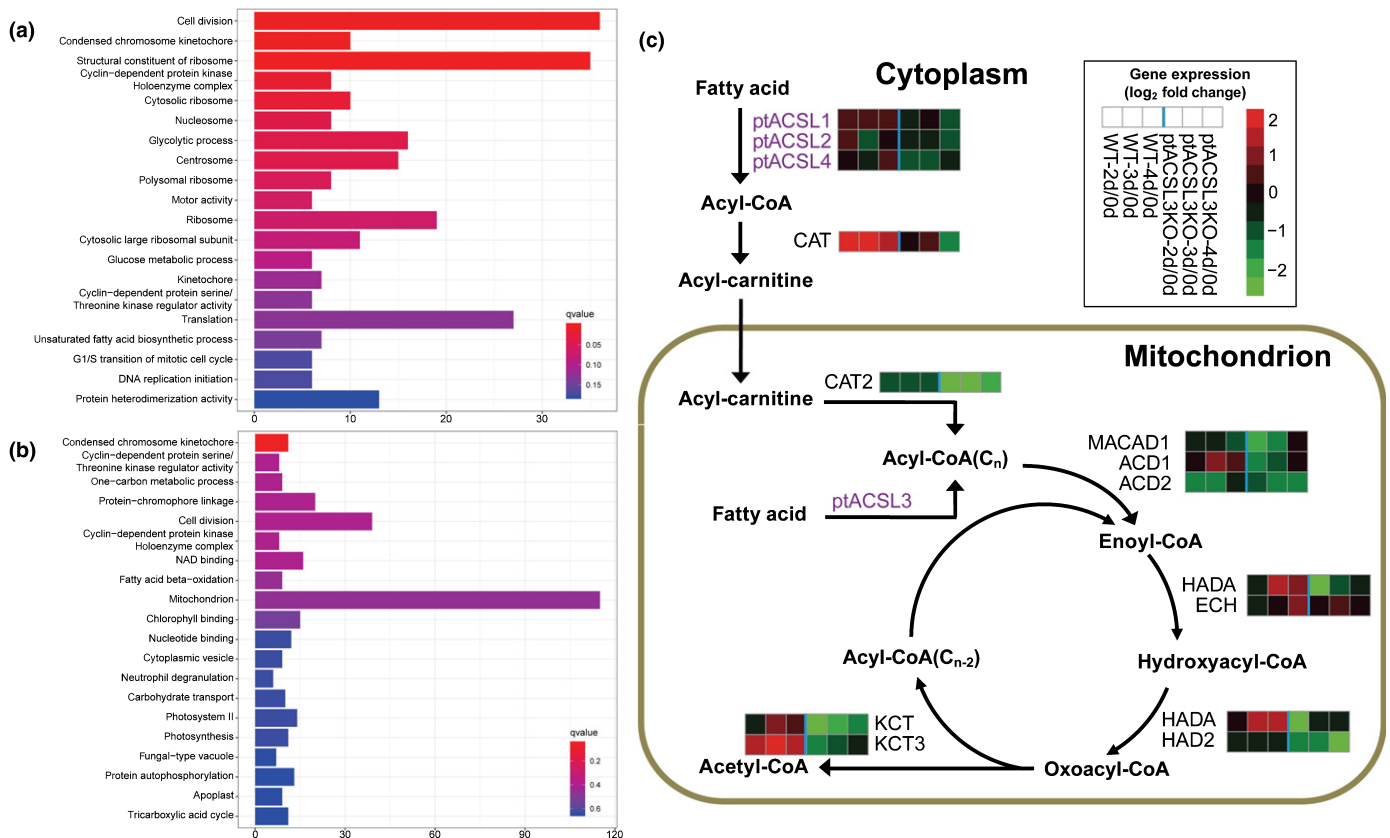


Fig. 9 Transcriptional change of the *ptACSL3* mutants upon the shift from static culture to cultures bubbled with filtered air. Gene ontology (GO) functional enrichment analysis of differentially expressed genes in (a) wild-type and (b) the *ptACSL3* mutants upon the shift from static culture (0 d) to culture bubbled with air for 2 d. Biological processes are listed on the y-axis with their enrichment folds against all *Phaeodactylum* genes (reference) presented on the x-axis. (c) For each differentially expressed gene, fold changes (FC) are presented as heat maps with shades of red or green colours according to the scale bar. FC was calculated as $\log_2(\text{FPKM (Dx, BA)}/\text{FPKM (0 d, SC)})$ (FPKM, absolute abundance of transcripts; Dx, a time point: 2 d/3 d/4 d; BA, in culture bubbled with air; SC, in static culture). Changes of genes with FDR-corrected P -value < 0.05 were considered as statistically significant. Time refers to the duration (in days) since the transfer of algal cells from static culture to the cultures bubbled with filtered air. Data are the mean of the FC of 2 d vs 0 d, 3 d vs 0 d and 4 d vs 0 d of wild-type and the *ptACSL3* mutants. Data are presented in Supporting Information Table S2.

Effect of the *ptACSL1/ptACSL5* mutation on lipid synthesis

As the expression of *ptACSL1* was upregulated during nitrogen deprivation, we analysed lipid samples prepared from wild-type and the *ptACSL1* mutants at the exponential phase (0 h) and deprived of nitrogen for 72 h (72 h). There was no difference in FA composition between wild-type and the *ptACSL1* mutant, except a small decrease in 20:5 at exponential phase in the mutant (Fig. S9). This decrease could be explained by a global decrease in 20:5-containing TAG and polar lipid species (Dataset S1). At 72 h of nitrogen starvation, membrane lipids, apart from DAG, were more affected in the wild-type than in the *ptACSL1* mutant, suggesting that *ptACSL1* might be involved in membrane lipid remodelling during nitrogen starvation.

The FA profiles and contents of wild-type and the *ptACSL5* mutants were analysed in the exponential and stationary phases of growth (bubbled with air). This revealed a slight increase in total FA content of the *ptACSL5* mutants at stationary phase (wild-type, 766 ± 55 and *ptACSL5* 867 ± 67 nmol mg⁻¹ dcw), which was correlated with a slight increase in the levels of 16:1 and proportions of 16:1 in FA profiles at both phases (Fig. S10).

Glycerolipidomic analysis showed that 16:1 was highly enriched in the *sn-1* position of PC, and the levels of almost all 16:1-containing molecular species were increased for PC in the *ptACSL5* mutants in the exponential phase at the expense of a reduction in 20:5-containing species (Dataset S1). In the *ptACSL5* mutants, 16:1-containing TAG species derived from the prokaryotic pathway were increased, which was balanced by a slight decline in TAG 20:5-containing species and TAG 16:0/16:0 species in both phases (Dataset S1). To further test whether peroxisomal *ptACSL5* was involved in FA β -oxidation, wild-type and the *ptACSL5* mutants were maintained in N-free medium for 3 d to promote TAG accumulation. After that period, algal cultures were transferred to N-replete medium for an additional 4 d to induce the turnover and hydrolysis of storage lipids. The *ptACSL5* mutants still showed a reduced growth rate compared with wild-type during both N starvation and resupply, but these algal strains displayed similar Nile red fluorescence (Fig. S11), indicating that storage lipid catabolism after a shift from N-starved to N-replete medium was not impaired in the mutants. Our results supported the idea that peroxisomal FA β -oxidation was not correlated with storage lipid remobilisation in

Phaeodactylum, but may be involved in the recycling of long-chain to very-long-chain FAs derived from polar lipids (Jallet *et al.*, 2020). To conclude, ptACSL5 might be involved in the balance of 16:0 vs 16:1 in acyl-CoA fluxes for membrane lipids (PC) and TAG synthesis, targeting a part of 16:0 into peroxisomal β -oxidation to prevent it from further elongation to enter the 16:0 to 20:5 synthetic route.

Discussion

Phaeodactylum accumulates large amounts of TAGs and produces EPA up to 30% of total FAs with trace amounts of C18 FA intermediates, representing a particularly interesting model for studies on VLC-PUFA and lipid biosynthesis. Despite recent advances in understanding the main routes of lipid metabolism in *Phaeodactylum* (Smith *et al.*, 2021), little information is known about FA activation, transport between different subcellular compartments and flux governing the ultimate deposition of VLC-PUFA into galactoglycerolipids. Consistent with the high proportions of palmitic acid (16:0), palmitoleic acid (16:1n-7) and EPA (20:5n-3) in total FAs, palmitic, palmitoleic and EPA-CoA were detected as the most abundant species in acyl-CoA profiles of *P. tricornutum* cells (Hamilton *et al.*, 2014). These high levels of acyl-CoAs may potentially act as acyl donors or intermediates for VLC-PUFA synthesis and TAG assembly. *Phaeodactylum tricornutum* has at least five LACS isozymes catalysing the formation of acyl-CoAs from free FAs and CoA. Recently, ptACSL4 was identified in proteome analysis as one of the lipid droplet-associated proteins (Lupette *et al.*, 2019). However, in our study, the *ptACSL4* mutants did not show any lipid-associated phenotype under the growth conditions. This finding is in contrast with its orthologue of the heterokont *Microchloropsis gaditana*. ptACSL4, also called PtACSBG (Phatr3_J45510), which was recently identified as the LACS isoform of the bubblegum subfamily and shares five conserved ACSBG motifs with MgACSBG, the phylogenetically closely related LACS isoform of the bubblegum type in the eustigmatophytes *M. gaditana* (Billey *et al.*, 2021). In this oleaginous microalga, the MgACSBG mutant of point mutations led to an overall reduction in 16:1 in lipids and C20 acyls in the betaine lipid, supporting a critical role in the generation of 16:1-CoA and 18:3-CoA within the cell.

ptACSL1 is the only LACS isozyme located in the outermost of cER membrane with the C-terminus facing the cytoplasm (Fig. 1), indicating that it may be the most possible isozyme responsible for activating *de novo-synthesised* FAs exported from the plastid. During nitrogen starvation, membrane lipids seem to be protected from degradation or recycling in the *ptACSL1* mutants compared with wild-type. In Arabidopsis, of the nine LACS isoforms only LACS9 was shown to reside in the plastid envelope and might be the major LACS isoform involved in the export of plastidial FAs for TAG formation. Although the *lacs9* null mutant had a 90% reduction in chloroplast LACS activity, the mutant did not exhibit any detectable phenotype. Further studies revealed that ER-localised LACS1 showed overlapping functions with LACS9 in TAG biosynthesis (Zhao *et al.*, 2010). In our study, ptACSL1 displayed LACS activity towards all tested

FAs and its disruption had no impact on the amounts of TAG (Fig. 5), which is mainly composed of 16:0 and 16:1, suggesting that one or more additional LACS isozymes may be involved in the activation of plastid-exported FAs and contribute to acyl-CoAs for storage TAG synthesis.

We identified the mitochondrial ptACSL3 as the LACS isozyme contributing to TAG synthesis. The *ptACSL3* mutants showed distinct TAG-associated phenotypes when cells were bubbled with air and in static culture (Fig. 5d,h). When algal cells are exposed to rapid changes in nutrient availability, temperature and light conditions, they must rapidly degrade or remodel storage and membrane lipids to ensure growth and survival. FA degradation therefore plays an important role in the response to these changing conditions. Recently, Jallet *et al.* (2020) confirmed the existence of a functional mitochondrial β -oxidation pathway that plays a principle role in the liberation of energy from TAG-derived FAs in *P. tricornutum*. This pattern differs in the green alga *Chlamydomonas* that possesses the major reactions of FA β -oxidation in peroxisomes (Kong *et al.*, 2017). In our study, when algal cultures were bubbled with filtered air, in rapidly growing cells mitochondrial FA β -oxidation played a 'housekeeping' role in removing harmful free FAs that may have been derived from the degradation of acyl lipids. Disruption of *ptACSL3* can result in the impairment of FA β -oxidation that breaks the balance of keeping the amounts of cytosolic free FAs coming from phospholipids below the threshold and also leads to a pronounced inhibition of plastidial *de novo* FA synthesis, which produces less FA acyls for TAG and chloroplast lipid synthesis and then reduces TAG content in the *ptACSL3* mutants. By contrast, algal cells grown in static culture may not need a highly dynamic and active mitochondrial FA β -oxidation to remove free FAs. Therefore, we observed a similar growth of the *ptACSL3* mutants compared with wild-type under static conditions (Fig. 5a), which may ensure that the mutant could accumulate more TAGs by diverting some of phospholipid-derived FAs from mitochondrial β -oxidation to the TAG synthesis pathway in the absence of ptACSL3.

In *Phaeodactylum*, free FAs may be derived from multiple routes: (1) *de novo* synthesis in the plastid, then hydrolysis by acyl-ACP thioesterase from ACP and finally export outside the plastid; (2) turnover or recycling of membrane lipids (e.g. DGTA and PC) under some conditions such as nitrogen or carbon starvation; (3) TAG remobilisation, possibly involving TAG lipases that remove acyl chains from glycerol backbone of TAG. Of the five LACSs, ptACSL1 is localised in the outermost part of the cER membrane and displayed the highest catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) for 20:5 in our *in vitro* enzyme assay (Table 1). In addition, the *ptACSL1* mutants grown both to the exponential phase (0 h) and in N-deprived condition (72 h) showed a slight decrease in the levels of 20:5-containing species in the plastid glycolipid of MGDG (Dataset S1), suggesting a possible role in the transfer of ER-derived 20:5 to plastid membranes. ptACSL3 and ptACSL5 may play a role in generating acyl-CoAs that are channelled into mitochondria or peroxisome for β -oxidation (Fig. 10). How ptACSL2 and ptACSL4 are involved in lipid metabolism in *Phaeodactylum*

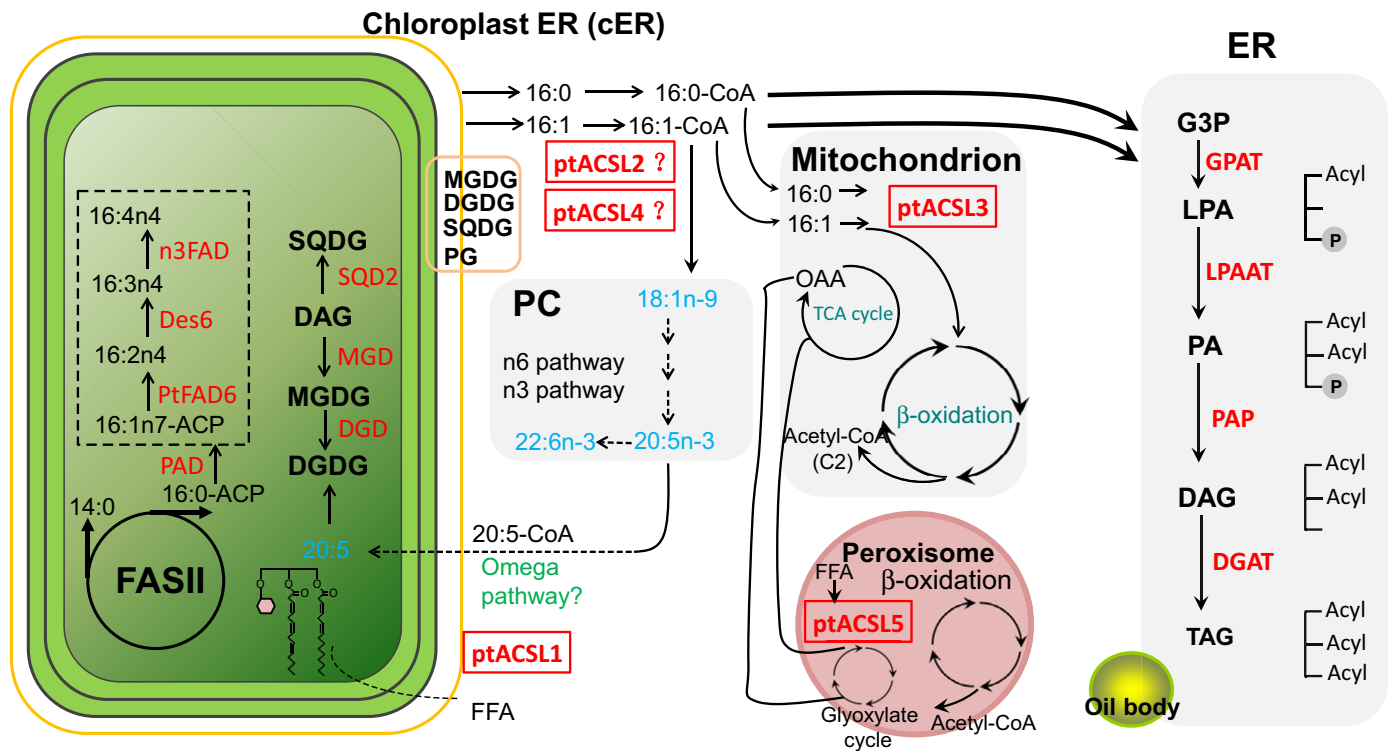


Fig. 10 Predicted long-chain acyl-CoA synthetase (LACS)-mediated lipid metabolic pathways in *Phaeodactylum*. *De novo* fatty acid (FA) synthesis takes place in the plastid. 16:0-acyl carrier protein (ACP) is released from the fatty acid synthase, and then enters the prokaryotic pathway to be desaturated by soluble acyl-ACP desaturases to produce C16 FAs with one or more double bonds which are used for synthesis of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), digalactosyldiacylglycerol (DGDG), sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and phosphatidylglycerol (PG) as chloroplast membrane lipids. The majority of 16:0 and 16:1 in the plastid is exported to the cytosol, converted to 16:0-CoA and 16:1-CoA and enters the Kennedy pathway for TAG biosynthesis. In the cytosol, 16:0-CoA can be elongated to 18:0-CoA and further desaturated to produce 18:1 Δ^9 -CoA. This FA enters long-chain polyunsaturated FA synthesis pathway to produce 20:5 (EPA) and 22:6 via the combined n3 and n6 pathways. EPA can be imported back into the plastid via the unknown omega-3 pathway for the synthesis of chloroplast membrane lipids. Some free FAs, mainly 16:0 and 16:1 species, can be released from TAG hydrolysis, then activated by LACS enzymes and transported into mitochondria or peroxisomes for β -oxidation. Enzymes are shown in red: DAG, diacylglycerols; Des6, plastidic soluble Δ^6 -desaturase; DGAT, diacylglycerol acyltransferase; DGD, DGDG synthase; DGTA, diacylglycerol-hydroxymethyl-*N,N,N*-trimethyl- β -alanine; ER, endoplasmic reticulum; FAD, fatty acid desaturases; FASII, fatty acid synthase II; FFA, free fatty acid; G3P, glycerol-3-phosphate; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransferase; LPA, lysophosphatidic acid; LPAAT, lysophosphatidic acid acyltransferase; MGD, MGDG synthase; OAA, oxaloacetate; PA, phosphatidic acid; PAD, palmitoyl-ACP Δ^9 -desaturase; PAP, phosphatidic acid phosphatase; PC, phosphatidylcholine; SQDG2, SQDG synthase; TAG, triacylglycerols; TCA, tricarboxylic acid. The detailed reactions of desaturation and elongation in the n-6 and n-3 pathways for the synthesis of 22:6n-3 from 18:1n-9 are not shown and indicated by the dashed arrows.

remains to be further elucidated. As the *Phaeodactylum* genome encodes multiple LACS isoforms, functional redundancy possibly exists within the *lacs* gene family. To distinguish the contributions of each ptACSL to lipid metabolism, the generation of higher-order *lacs* KO mutants using a multiplexed CRISPR/Cas9 method will provide more insight into the precise roles of each LACS and uncover the complex network of functions of all LACS isozymes in *Phaeodactylum*.

Acknowledgements






This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (41776175 and 31961133008 to YG) and the Agricultural Science and Technology Innovation Project of Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS-ASTIP-2013-OCRI) and in part by the 2021 CEA-CAS bilateral programme (to AA, EM, HH and YG). AA and EM were

also supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-LABEX-04 GRAL Labex, Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology; ANR-11-BTBR-0008 Océanomics; IDEX UGA CDP Glyco@Alps; Institut Carnot 3BCAR). This study was additionally funded by grants from the United States Department of Energy Genomics Science programme, the US National Science Foundation, NSF-MCB-1818390, and the Gordon and Betty Moore Foundation GBMF3828 (to AEA).

Author contributions

XH, WC, AA, DM, HJ and LY performed experiments. JJ, EM, HH and FH analysed data. MM and AEA contributed to the generation of *ptACSL* mutant lines by multiplexed CRISPR/Cas9 method. YG planned and designed the research and wrote the manuscript. XH and WC contributed equally to this work.

ORCID

Andrew E. Allen  <https://orcid.org/0000-0001-5911-6081>
 Alberto Amato  <https://orcid.org/0000-0002-9126-5535>
 Yangmin Gong  <https://orcid.org/0000-0002-4096-3640>
 Hanhua Hu  <https://orcid.org/0000-0002-8485-7591>
 Mark Moosburner  <https://orcid.org/0000-0002-8672-8742>

Data availability

The data that support the findings of this study are available in the Supporting Information of this article.

References

- Abida H, Dolch LJ, Mei C, Villanova V, Conte M, Block MA, Finazzi G, Bastien O, Tirichine L, Bowler C *et al.* 2015. Membrane glycerolipid remodeling triggered by nitrogen and phosphorus starvation in *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiology* 167: 118–136.
- Billey E, Magneschi L, Leterme S, Bedhomme M, Andres-Robin A, Poulet L, Michaud M, Finazzi G, Dumas R, Crouzy S *et al.* 2021. Characterization of the Bubblegum acyl-CoA synthetase of *Microchloropsis gaditana*. *Plant Physiology* 185: 815–835.
- Black PN, DiRusso CC. 1994. Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism, and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1210: 123–145.
- Black PN, Zhang Q, Weimar JD, DiRusso CC. 1997. Mutational analysis of a fatty acyl-coenzyme A synthetase signature motif identifies seven amino acid residues that modulate fatty acid substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry* 272: 4896–4903.
- Cabantous S, Terwilliger TC, Waldo GS. 2005. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 23: 102–107.
- Chen Z, Luo L, Chen R, Hu H, Pan Y, Jiang H, Wan X, Jin H, Gong Y. 2018. Acetylome profiling reveals extensive lysine acetylation of the fatty acid metabolism pathway in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Molecular and Cellular Proteomics* 17: 399–412.
- Daboussi F, Leduc S, Maréchal A, Dubois G, Guyot V, Perez-Michaut C, Amato A, Falciatore A, Juillerat A, Beurdeley M *et al.* 2014. Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricorutum* for biotechnology. *Nature Communications* 5: 3831.
- Dolch L-J, Lupette J, Tourcier G, Bedhomme M, Collin S, Magneschi L, Conte M, Seddiki K, Richard C, Corre E *et al.* 2017. Nitric oxide mediates nitrite-sensing and acclimation and triggers a remodeling of lipids. *Plant Physiology* 175: 1407–1423.
- Færgeman NJ, Black PN, Zhao XD, Knudsen J, DiRusso CC. 2001. The acyl-CoA synthetases encoded within Faa1 and Faa4 in *Saccharomyces cerevisiae* function as components of the fatty acid transport system linking import, activation, and intracellular utilization. *Journal of Biological Chemistry* 276: 37051–37059.
- Groot PH, Scholte HR, Hulsmann WC. 1976. Fatty acid activation: specificity, localization, and function. *Advances in Lipid Research* 14: 75–126.
- Guillard RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH, eds. *Culture of marine invertebrate animals*. Boston, MA, USA: Springer, 29–60.
- Guo X, Jiang M, Wan X, Hu C, Gong Y. 2014. Identification and biochemical characterization of five long-chain acyl-coenzyme A synthetases from the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 74: 33–41.
- Hamilton ML, Haslam RP, Napier JA, Sayanova O. 2014. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricorutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metabolic Engineering* 22: 3–9.
- Heinz E, Roughan PG. 1983. Similarities and differences in lipid metabolism of chloroplasts isolated from 18:3 and 16:3 plants. *Plant Physiology* 72: 273–279.
- Horswill AR, Escalante-Semerena JC. 2002. Characterization of the propionyl-CoA synthetase (PrpE) enzyme of *Salmonella enterica*: residue Lys592 is required for propionyl-AMP synthesis. *Biochemistry* 41: 2379–2387.
- Jallet D, Xing D, Hughes A, Moosburner M, Simmons MP, Allen AE, Peers G. 2020. Mitochondrial fatty acid β -oxidation is required for storage-lipid catabolism in a marine diatom. *New Phytologist* 228: 946–958.
- Jensen EL, Yangüez K, Carrière F, Gontero B. 2019. Storage compound accumulation in diatoms as response to elevated CO₂ concentration. *Biology* 9: 5.
- Jessen D, Olbrich A, Knüfer J, Krüger A, Hoppert M, Polle A, Fulda M. 2011. Combined activity of LACS1 and LACS4 is required for proper pollen coat formation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 68: 715–726.
- Jessen D, Roth C, Wiermer M, Fulda M. 2015. Two activities of long-chain acyl-coenzyme A synthetase are involved in lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 167: 351–366.
- Jouhet J, Lupette J, Clerc O, Magneschi L, Bedhomme M, Collin S, Roy S, Maréchal E, Rébeillé F. 2017. LC-MS/MS versus TLC plus GC methods: consistency of glycerolipid and fatty acid profiles in microalgae and higher plant cells and effect of a nitrogen starvation. *PLoS ONE* 12: e0182423.
- Karas BJ, Diner RE, Lefebvre SC, McQuaid J, Phillips AP, Noddings C, Brunson JK, Valas RE, Deerinck TJ, Jablanovic J. 2015. Designer diatom episomes delivered by bacterial conjugation. *Nature Communications* 21: 6925.
- Kong F, Liang Y, Légeret B, Beyly-Adriano A, Blangy S, Haslam RP, Napier JA, Beisson F, Peltier G, Li-Beisson Y. 2017. *Chlamydomonas* carries out fatty acid β -oxidation in ancestral peroxisomes using a bona fide acyl-CoA oxidase. *The Plant Journal* 90: 358–371.
- Kunst L, Browse J, Somerville C. 1988. Altered regulation of lipid biosynthesis in a mutant of *Arabidopsis* deficient in chloroplast glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 85: 4143–4147.
- Lü S, Song T, Kosma DK, Parsons EP, Rowland O, Jenks MA. 2009. *Arabidopsis* CER8 encodes LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1) that has overlapping functions with LACS2 in plant wax and cutin synthesis. *The Plant Journal* 59: 553–564.
- Lupette J, Jaussaud A, Seddiki K, Morabito C, Brugière S, Schaller H, Kuntz M, Putaux JL, Jouneau PH, Rébeillé F *et al.* 2019. The architecture of lipid droplets in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Algal Research* 38, 10.1016/j.algal.2019.101415.
- Moosburner MA, Gholami P, McCarthy JK, Tan M, Bielinski VA, Allen AE. 2020. Multiplexed knockouts in the model diatom *Phaeodactylum* by episomal delivery of a selectable Cas9. *Frontiers in Microbiology* 11: 5.
- Ohlrogge J, Browse J. 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7: 957–970.
- Petroutsos D, Amiar S, Abida H, Dolch L-J, Bastien O, Rébeillé F, Jouhet J, Falconet D, Block MA, McFadden GI *et al.* 2014. Evolution of galactoglycerolipid biosynthetic pathways—from cyanobacteria to primary plastids and from primary to secondary plastids. *Progress in Lipid Research* 54: 68–85.
- Roughan PG, Holland R, Slack CR. 1980. The role of chloroplasts and microsomal fractions in polar-lipid synthesis from [1-¹⁴C]acetate by cell-free preparations from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Biochemical Journal* 188: 17–24.
- Roughan PG, Slack CR. 1982. Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 97–132.
- Serif M, Dubois G, Finoux A, Teste M, Jallet D, Daboussi F. 2018. One-step generation of multiple gene knock-outs in the diatom *Phaeodactylum tricorutum* by DNA-free genome editing. *Nature Communications* 9: 3924.
- Smith R, Jouhet J, Gandini C, Nekrasov V, Marechal E, Napier JA, Sayanova O. 2021. Plastidial acyl carrier protein $\Delta 9$ -desaturase modulates eicosapentaenoic acid biosynthesis and triacylglycerol accumulation in *Phaeodactylum tricorutum*. *The Plant Journal* 106: 1247–1259.
- Wallis JG, Browse J. 2002. Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids. *Progress in Lipid Research* 41: 254–278.
- Weng H, Molina I, Shockey J, Browse J. 2010. Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis*. *Planta* 231: 1089–1100.
- Weyman PD, Beeri K, Lefebvre SC, Rivera J, McCarthy JK, Heuberger AL, Peers G, Allen AE, Dupont CL. 2015. Inactivation of *Phaeodactylum*

- tricornutum* urease gene using transcription activator-like effector nuclease-based targeted mutagenesis. *Plant Biotechnology Journal* 13: 460–470.
- Xie Y, Wu B, Wu Z, Tu X, Xu S, Lv X, Yin H, Xiang J, Chen H, Wei F. 2020. Ultrasound-assisted one-phase solvent extraction coupled with liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for efficient profiling of egg yolk lipids. *Food Chemistry* 319: doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126547.
- Xu C, Fan J, Cornish AJ, Benning C. 2008. Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in *Arabidopsis* requires the extraplastidic TGD4 protein. *Plant Cell* 20: 2190–2204.
- Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Kroth PG, Grossman AR, Apt KE. 2000. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *Journal of Phycology* 36: 379–386.
- Zhao L, Haslam TM, Sonntag A, Molina I, Kunst L. 2019. Functional overlap of long-chain acyl-CoA synthetases in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 60: 1041–1054.
- Zhao L, Katavic V, Li F, Haughn GW, Kunst L. 2010. Insertional mutant analysis reveals that long-chain acyl-CoA synthetase 1 (LACS1), but not LACS8, functionally overlaps with LACS9 in *Arabidopsis* seed oil biosynthesis. *The Plant Journal* 64: 1048–1058.
- Zou Z, Tong F, Færgeman NJ, Borsting C, Black PN, DiRusso CC. 2003. Vectorial acylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Fat1p and fatty acyl-CoA synthetase are interacting components of a fatty acid import complex. *Journal of Biological Chemistry* 278: 16414–16422.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Dataset S1 Lipidomic datasets.

Dataset S2 RNA-seq data.

Fig. S1 Test of antibodies against ptACSL1–5.

Fig. S2 Confirmation of the CRISPR/Cas9-mediated mutations in ptACSL2, ptACSL4 and ptACSL5.

Fig. S3 Physiological characterisation of wild-type and the *ptACSL2* mutants.

Fig. S4 Physiological characterisation of wild-type and the *ptACSL4* mutants.

Fig. S5 Growth of wild-type and the *ptACSL3* mutants at 15°C and 28°C.

Fig. S6 Physiological characterisation of wild-type and the *ptACSL5* mutants.

Fig. S7 Total fatty acid composition of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) in wild-type and the *ptACSL3* mutants.

Fig. S8 Total fatty acid composition of digalactosyldiacylglycerol (DGDG) in wild-type and the *ptACSL3* mutants.

Fig. S9 Total fatty acid composition of wild-type and the *ptACSL1* mutants.

Fig. S10 Total fatty acid content, individual fatty acid content and fatty acid profiles of wild-type and the *ptACSL5* mutants.

Fig. S11 Physiological characterisation of wild-type and the *ptACSL5* mutants under nitrogen deprivation and nitrogen resupply.

Methods S1 Details associated with plasmid construction, *in vitro* enzyme assay, immunoblotting, lipid extraction and analysis and RNA-seq analysis.

Table S1 List of plasmids used in this study.

Table S2 List of primers used in this study.

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any Supporting Information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.