

На правах рукописи



Пузанский Роман Константинович

**Метаболом и профиль экспрессии генов клеток *Chlamydomonas reinhardtii*
при различных трофических условиях**

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук
Шишова Мария Федоровна

Официальные оппоненты: **Новикова Галина Викторовна**,
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук,
ведущий научный сотрудник

Захаржевская Наталья Борисовна,
кандидат биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный научно-клинический центр физико-
химической медицины Федерального медико-
биологического агентства» России, младший научный
сотрудник

Ведущая организация: Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»

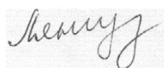
Защита состоится « 13 » ноября 2019 г. в 11 час. ____ на заседании диссертационного совета Д 002.211.02 по защите кандидатских и докторских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Ботаническом институте им. В.Л. Комарова Российской академии наук по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 2.
Тел: +7(812) 372-54-43, dissovet.d00221102@binran.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета



Лянгузова Ирина Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Растущий интерес к микроводорослям определяется как изучением фундаментальных законов функционирования и адаптации автотрофных клеток, так и прикладными задачами. Для фотоавтотрофных водорослей, важнейшим источником энергии и вещества являются свет и углекислый газ, тем не менее, ряд из них, в том числе и хламидомонада, способны утилизировать содержащиеся в среде органические вещества. Изменение трофических условий ведёт к перераспределению метаболических потоков между процессами роста и размножения, фиксации углерода, потребления энергии, катаболизма, синтеза и депонирования (Johnson, Alric, 2012, 2013; Fan et al., 2015). Направленность и сила изменений зависят от специализации организма и его физиологического статуса, который, в свою очередь, может определяться акклимацией, т. е. периодом, в течение которого организм претерпевает морфофизиологические изменения, адаптируясь к условиям окружающей среды. Совокупность сдвигов, происходящих на транскрипционном, протеомном и метаболомном уровнях выявляется современными системнобиологическими подходами.

Метаболомика – метод системного описания биохимических процессов, основанный на максимально полном качественном и количественном анализе, содержащихся в объекте низкомолекулярных соединений (Fiehn, 2002). Профилирование метаболитов стало широко использоваться для расширенной характеристики фенотипов (Weckwerth et al., 2004; Raman, Chandra, 2009), выявления взаимодействия организмов со средой и между собой (Brunetti, 2013), раскрытия механизмов стресс-индуцированных реакций (Xu et al., 2012; Arbona et al., 2013), диагностики патологических изменений (Song et al., 2012), поиска биохимических маркеров протекающих в организме физиологических процессов (Foyer et al., 2003). В основе физиологических перестроек лежат изменения активности ферментативных реакций первичного метаболизма, регулируемых, в том числе, за счет изменения количества фермента, контролируемого на уровне транскрипции (Wan et al., 2011; Deng et al., 2013; Lv et al., 2013; Fan et al., 2014).

Хламидомонада широко используется как модельный объект в физиологических, генетических и биохимических исследованиях, сфокусированных на изучении процессов фотосинтеза (Rochaix, 2002; Grossman et al., 2004), минерального питания (Boelling, Fiehn, 2005; Grossman, 2000), действия стрессоров (Jamers et al., 2013; Schmollinger et al., 2013), организации цитоскелета (Dutcher et al., 2003; Ide et al., 2013), структуры клеточной оболочки (Goodenough and Heuser, 1985; Voigt et al., 1997), липидного метаболизма (Moellering et al., 2009, Lv et al., 2013), развития культуры (Humby et al., 2013, Lv et al., 2013). Завершено секвенирование генома хламидомонады (Merchant et al., 2007). Созданы базы данных метаболитов, ферментов, реакций и биохимических путей, карты метаболических процессов (May et al., 2009). Всё это представляет собой прекрасную основу для системнобиологических исследований хламидомонады. Одно из таких направлений целесообразно сфокусировать на исследовании динамики метаболитного и транскриптомного профилей в процессе роста периодической культуры хламидомонады при разных трофических условиях и акклимации.

Цель работы – выявление системного действия трофических факторов на метаболизм *Chlamydomonas reinhardtii* в процессе развития периодической суспензионной культуры.

Задачи:

- охарактеризовать динамику основных физиологических параметров культуры, таких как рост клеточной плотности и её конечная величина, интенсивность дыхания и фотосинтеза, динамика содержания фотосинтетических пигментов при авто- и миксотрофных условиях, а также у культур, акклимированных к авто- и миксотрофии;
- провести профилирование метаболитов в клетках хламидомонады в процессе развития культур различного трофического статуса;
- охарактеризовать динамику экспрессии генов, кодирующих ферменты и пластидные транспортеры, вовлеченные в энергетические и пластические пути в процессе развития культуры хламидомонады при разных трофических условиях;
- на основе полученных данных методами математического анализа выявить системные различия авто- и миксотрофных культур, а также культур, акклимированных к авто- и миксотрофии.

Научная новизна исследования.

Впервые выявлено влияние трофической акклимации на динамику роста культуры, активность дыхания и фотосинтеза хламидомонады. Показано, что предварительное культивирование при миксотрофных условиях приводит к более быстрому росту клеточной плотности в начале развития суспензионной культуры и стимулирует активность фотосинтеза и дыхания в фазе экспоненциального роста как при авто-, так и при миксотрофных условиях.

Впервые проведен сравнительный анализ динамики профиля метаболитов и транскрипции генов ферментов первичного метаболизма и пластидных транспортеров, а также установлена их связь в процессе развития суспензионных авто- и миксотрофных культур хламидомонады.

Впервые установлено влияние трофической акклимации на метаболом и профиль транскрипции генов ферментов первичного метаболизма и пластидных транспортеров хламидомонады, а также на их связь при авто- и миксотрофных условиях

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные данные выявляют системные процессы, происходящие в культурах микроводорослей. На примере периодической суспензионной культуры хламидомонады на метаболомном и транскрипционном уровнях доказана регуляторная роль трофических факторов. Полученные результаты доказывают связь между пролиферацией, физиологической активностью, метаболомом и экспрессией генов, кодирующих ряд ферментов первичного метаболизма и хлоропластных транспортеров, демонстрируя функционирование клетки как целостной многоуровневой системы.

С практической точки зрения, полученные результаты могут быть использованы для оптимизации культивирования микроводорослей.

Выявленные закономерности могут быть включены в материалы курсов лекций, читаемых на биологическом факультете СПбГУ («Сигнальные системы растений», «Физиология растительной клетки» и др.).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. В процессе роста периодических суспензионных культур *C. reihardtii* происходят значительные изменения метаболома и профиля экспрессии генов, кодирующих ферменты первичного метаболизма и пластидные транспортеры. Главным образом, эти изменения определяют изменение баланса депонирования веществ и пролиферации, а также снижение физиологической активности при переходе в стационарную фазу.
2. Присутствие в среде ацетата и предварительное культивирование (акклимация) на среде, содержащей ацетат, стимулирует рост клеточной плотности, активность дыхания и фотосинтез периодических суспензионных культур *C. reihardtii*.
3. Трофические условия существенно влияют на метаболом, профиль экспрессии и их динамику в процессе развития периодической культуры *C. reihardtii*. Различия наиболее выражены в период экспоненциального роста. Они, с одной стороны, связаны с более высоким уровнем роста, депонирования и физиологической активности при миксотрофии; с другой стороны, определяются особенностями метаболизма, вытекающими из механизмов ассимиляции доступных источников энергии и углерода.
4. В процессе развития миксотрофной культуры на основе анализа метаболома и транскрипционного профиля выявлен сдвиг метаболизма в сторону автотрофии.
5. Показано значительное влияние акклимации к трофическим факторам на метаболом и профиль экспрессии генов, кодирующих ферменты первичного метаболизма и пластидные транспортеры. Роль акклимации была более значительна при миксотрофных условиях. Влияние акклимации ослабевало в процессе развития культуры. Особенности акклимированных к альтернативным условиям культур во многом определяется сохранением черт физиологического статуса предшествующего периода культивирования.
6. Показано существование корреляционных кластеров генов и метаболитов. Смена трофических условий приводит к изменению кластерной структуры, преимущественно за счет усиления корреляционных связей, что свидетельствует о скоординированных метаболических перестройках.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на (1) Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Plants under Environmental Stress), Москва, 9-12 ноября 2010 г.; (2) Всероссийской научной конференции с международным участием "Инновационные

направления современной физиологии растений", Москва, 2-6 июня 2013 г.; (3) Международной научной конференции «Физиология растений - теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий», Калининград, 19-25 мая 2014 г.; (4) VIII Съезде общества физиологов растений России «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий», Петрозаводск, 21-26 сентября 2015 г.; (5). III (XI) Международной ботанической конференции молодых ученых, Санкт-Петербург, 4-9 октября 2015 г.; (6) 4th International Symposium on Plant Signaling and Behavior, Санкт-Петербург, 19-24 июня 2016 г.; (7) Годичном собрании общества физиологов растений России «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма», Санкт-Петербург, 21-24 июня 2016 г.; (8) IV Российском симпозиуме с международным участием "Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений", Казань, 20-23 сентября 2016 г.; (9) V международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика», г. Ялта (Крым) 25-29 сентября 2017 года.

По теме диссертации опубликовано 13 работ, включая 4 статьи в журналах из перечня ВАК РФ, цитируемых в РИНЦ.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 366 страницах, содержит 111 рисунков, 19 таблиц. Список использованной литературы включает в себя 427 источников, в том числе 415 на иностранном языке. Работа содержит список сокращений, введение, обзор литературы, описание объекта и методов исследования, изложение результатов и их обсуждение, заключение, выводы, список использованной литературы и двух приложений.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю Шишовой Марии Фёдоровне за терпение, поддержку, мудрые советы, а главное, за огромный труд проделанный, чтобы эта работа состоялась; Шаварде Алексею Леонидовичу за введение в мир метабономики, содержательную критику и консультации, помощь в проведении экспериментов. Также автор выражает благодарность Тараховской Е. Р. и Маслову Ю. И. за знакомство с миром изучения водорослей, Чекуновой Е. М. за предоставление культуры хламидомонады и методику культивирования, Шевцову Ю. И. за техническую помощь, Романюк Д. А. за обучение и консультации по вопросам молекулярно-биологических методов и подготовке текста диссертации, Емельянову В. В. за критические замечания по тексту диссертации, Ермиловой Е. В. за обучение методам определения уровня экспрессии генов в клетках хламидомонады, Медведеву С. С. за организацию работы кафедры физиологии и биохимии СПбГУ. Сотрудникам кафедры физиологии и биохимии СПбГУ и лаборатории аналитической фитохимии БИН РАН за помощь и поддержку в работе.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы рассмотрены основные закономерности развития и роль трофических факторов в регуляции роста периодических культур микроводорослей. Проанализированы физиологические процессы, связанные с адаптацией к изменению трофических условий, в том числе механизмы ассимиляции экзогенных субстратов, перестройки фотоассимиляционного аппарата, изменение баланса катаболизма, депонирования и пролиферации. Рассмотрено значение экзогенных субстратов для повышения устойчивости к ряду стрессовых факторов. Освещены вопросы системной адаптации микроводорослей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модельным объектом является периодическая суспензионная культура *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard 1888 штамма cc-124, полученная из коллекции кафедры Генетики и биотехнологии биологического факультета Санкт-Петербургского Государственного Университета. Культуры поддерживали аксенично при миксотрофных условиях на среде ТАР (Tris Acetate Phosphate, Gorman, Levine, 1965) или автотрофных условиях на среде ТМ (Tris Minimal, отличается от ТАР отсутствием ацетата), при постоянном освещении люминесцентными лампами холодного свечения с интенсивностью 3000 люкс ($\approx 42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ фотонов ФАР), при комнатной температуре $\approx +23^\circ\text{C}$.

Схема эксперимента представлена на рисунке 1. Были исследованы культуры, постоянно поддерживаемые при миксотрофных или автотрофных условиях, а также культуры микроводорослей, выращенные длительное время при одних трофических условиях (акклимация), и перед началом исследования перенесенные в альтернативные условия.

Рост культуры оценивали по клеточной плотности. Число клеток в объёме суспензии определяли



Рисунок 1. Схема проведенного эксперимента.

подсчётом в камере Горяева. Интенсивность фотосинтеза и дыхания проводили по выделению/поглощению O_2 при освещении и в темноте. Концентрацию кислорода детектировали с использованием электрода Кларка (Armstrong, 1994). Измерения проводили в двух вариантах: при интенсивности освещения равной таковой при культивировании и при интенсивности освещения в 5 раз превышающей таковую (≈ 15000 люкс, $210 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ фотонов ФАР).

Метаболомный анализ.

Пробоподготовку проводили согласно методике Оливера Фина (Bolling, Fiehn, 2005; Lee, Fiehn., 2008) с модификациями (Пузанский и др., 2015).

Газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией. Пробы анализировали с помощью газовой хроматографии, сопряжённой с масс-спектрометрией. Для анализа использовали газовый хроматограф Agilent 5860. Разделение проводили на капиллярной колонке J&W HP-5MS. Газ-носитель – гелий, постоянный поток 1 мл/мин, температура испарителя – 230°C , режим «splitless», температурный режим термостата колонки: начальная температура 70°C затем линейное повышение со скоростью $6^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 340°C и удержание 5 минут. Регистрацию пиков проводили масс-селективным детектором Agilent 5975C.

Идентификация метаболитов и полуколичественный анализ. Обработку результатов хроматографического анализа проводили с применением программы Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS). По величине масс-спектра и хроматографическому удерживанию метаболиты идентифицировали по базам данных: NIST2010, Golm Metabolome Database (GMD), MassBank. В ходе работы также использовали библиотеку масс-спектров, предоставленную ресурсным центром «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского госуниверситета. Количественную интерпретацию метаболитного профиля осуществляли по площадям пиков полного ионного тока методом внутреннего стандарта с применением программы UniChrom.

Анализ уровня экспрессии генов.

Дизайн праймеров для амплификации. Праймеры разрабатывали с использованием программы Beacon-Designer 8 (Sigma Aldrich). Оценку качества праймеров проводили путём постановки реакции ПЦР в реальном времени с последующим анализом кривых накопления продуктов реакции и плавления, а также длины синтезированных фрагментов с помощью электрофореза в полиакриламидном геле.

Выделение РНК. 10^7 - 10^8 клеток осаждали центрифугированием (5 мин, 3000g), далее выделение проводили с помощью реактива Пурзол (PureZOL™, Bio-Rad, USA) (Chomczynski, 1987). Качество

и количество выделенной РНК проверяли спектрофотометрически с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Пробы хранили при -80°C

Получение кДНК. Очистку препарата РНК от примеси ДНК осуществляли ДНКазой (DNase I, RNase-free, Thermo Fisher Scientific, USA). Синтез кДНК осуществляли с использованием OligoT праймеров ("Бигль", Россия) и M-MuLV обратной транскриптазы (Thermo Fisher Scientific, USA) с применением ингибитора РНКаз (Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor). Пробы хранили при -80°C .

ПЦР в реальном времени. ПЦР-РВ проводили в присутствии SYBR Green I ("Синтол", Россия) на амплификаторе CFX96 (BioRad, USA) в следующем режиме: сначала 95°C – 7 минут, затем 45 циклов 95°C - 15 с, 60°C – 50 с. В качестве генов сравнения были использованы гены *CBLP* (*RACK1*) и *RPL19*. Относительную экспрессию рассчитывали как среднее геометрическое относительных экспрессий по двум генам сравнения по формуле $2^{-\text{ср.знач}(\Delta\text{Ct}^{\text{CBLP}}, \Delta\text{Ct}^{\text{RPL19}})}$ при анализе динамики экспрессии генов в процессе развития культуры а при сравнении разных трофических вариантах в качестве гена сравнения использовали только *RPL19* и уровень экспрессии определяли как $2^{(\Delta\text{Ct}^{\text{RPL19}} - \text{Ct})}$ (Ермилова и др., 2011).

Математический анализ и визуализация данных.

Анализ проводили в среде языка R (R Core Team, 2017). На первом этапе были идентифицированы и исключены выпадающие значения, была проведена импутация пропущенных значений. Данные были логарифмированы и стандартизированы. Переменные проверяли на нормальность распределения с помощью теста Шапиро-Уилка, и гомогенность дисперсии с помощью теста Флигера-Киллена. В случае удовлетворения требований, для парного сравнения выборок проводили t-тест. Для сравнения нескольких выборок проводили однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим проведением апостериорного теста Тьюки. При отклонении значений от нормального, как при сравнении выборок, состоящих из объединения нескольких подвыборок (например, принадлежащих нескольким временным точкам), использовали непараметрические критерии: для парного сравнения тест Уилкоксона-Манна-Уитни, для нескольких выборок Краскела-Уоллиса. Для поправки при множественных сравнениях использовали FDR. При иерархическом кластерном анализе в качестве меры близости использовали коэффициент корреляции. Для кластеризации использовали метод Варда. Метод главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) выполнен с помощью пакета *pcaMethods* (Stacklies et al., 2007). PLS-DA и OPLS-DA выполнены в пакете *ropls* (Thevenot et al., 2015). В качестве оценки связи переменной с различием классов использовали VIP (Variable Importance in Projection) (Tenenhaus, 1998). Random Forest (RF, Breiman, 2001) выполнен в пакете *randomForest* (Liaw, Wiener, 2002). Тепловые карты построены с использованием пакета *ComplexHeatmap* (Gu, et al., 2016). 3D графики выполнены с применением пакетов *scatterplot3d* (Ligges, Machler, 2003) и *circlize* (Gu, 2014). Диаграммы Венна построены с использованием пакета *limma* (Ritchie et al., 2015). Метаболиты и гены картировали по корреляционным связям их концентраций в программе построения графов Cytoscape (Shannon et al., 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Миксотрофная культура клеток Chlamydomonas reinhardtii

Изменение роста и физиологии клеток

Динамика клеточной плотности миксотрофной суспензионной периодической культуры была измерена и аппроксимирована логистической функцией $\text{CD} = 9.07 \pm 0.17 \cdot (1 + 10^{(7.39 \pm 1.64 - 2.45 \pm 0.55 \cdot t)})^{-1}$ (где CD - клеточная плотность (млн кл/мл), t - время после инокуляции (сутки), интервалы - SE коэффициентов).

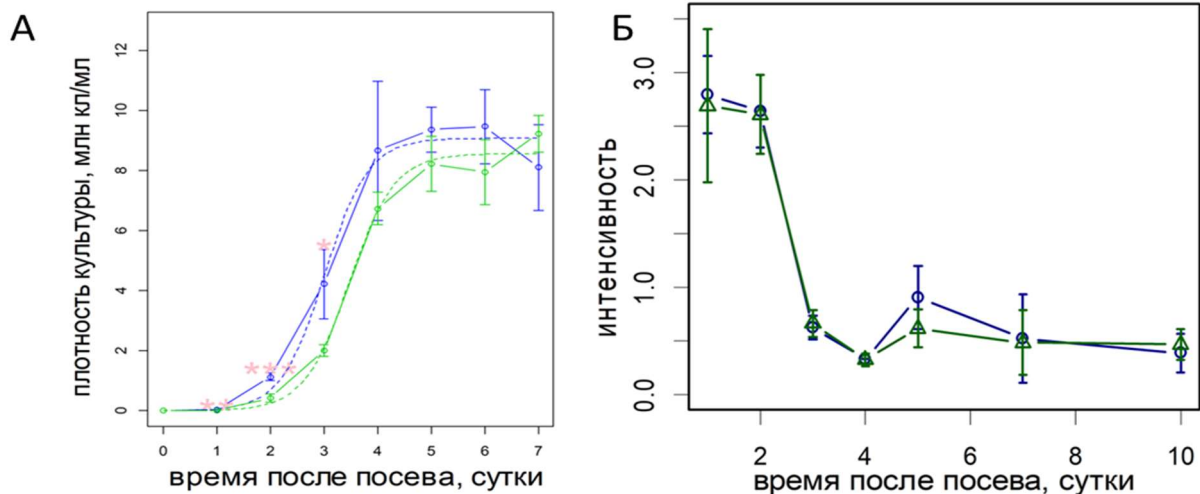


Рисунок 2. Динамика физиологических параметров в процессе развития миксотрофной культуры *C. reinhardtii*. А. Рост клеточной плотности культур акклиматизированных к миксотрофии (синий) и автотрофии (зелёный). Б. Динамика интенсивности (мкг $O_2/10^6$ клеток*с) и темнового дыхания (синий) и фотосинтеза (зелёный). Измерения проводились при 3000 lx, как при культивировании, при развитии периодической миксотрофной культуры *C. reinhardtii*. Интервалы – SD.

Интенсивность фотосинтеза и темнового дыхания (рис. 2Б) в расчёте на клетку значительно и синхронно менялась во время развития культуры. Максимальная активность газообмена отмечена в начальный период после инокуляции. Второй небольшой пик интенсивности наблюдали на 5-й день после инокуляции, когда экспоненциальный рост заканчивался, а культура переходила в стационарную фазу.

Метаболомный анализ

Динамика содержания метаболитов. ГХ/МС анализ позволил проанализировать содержание более 300 соединений. С помощью масс-спектрометрических баз данных было идентифицировано около 100 из них, включая жирные кислоты, сахара, аминокислоты, карбоновые кислоты, амиды и амины, спирты, терпены, фенольные соединения и т.д. Результаты визуализированы в виде тепловой карты (рис. 3). Выявлены значительные изменения содержания метаболитов в клетках в процессе развития культуры. Иерархическая кластеризация выявила 3 группы метаболитов. Первая - «метаболиты стационарного состояния». Большая часть этого кластера была образована липофильными соединениями, такими как насыщенные жирные кислоты и их производные. В группе «метаболитов роста» (вторая группа) доминировали олигосахариды (включая сахарозу и мальтозу) и жирные кислоты, преимущественно с относительно короткими цепями и ненасыщенными связями. Соединения группы 3 («метаболиты активности») имели 2 максимума: в середине периода роста и дополнительный пик при переходе культуры в стационарную фазу. Третий, как и второй, кластер включал ненасыщенные жирные кислоты со средними и умеренно длинными цепями (C₉-C₁₈), а также соединения различной биологической активности, в том числе продукты и интермедиаты энергетических циклов, таких как лактат, фумарат, гликолат и глюкоза.

Корреляционный анализ выявил преобладание положительных корреляционных связей. Можно заключить, что именно однонаправленная регуляция объёмов пулов метаболитов играет ключевую роль в системных метаболических перестройках.

Разведочный анализ. С целью выявления сходства и различий профилей метаболитов, детектируемых в разные периоды роста культуры, были проведены PCA и RF анализы без обучения. Полученные модели, показывают, что метаболитные профили группируются в пространстве меньшей размерности в зависимости от времени развития культуры (рис. 4).

Классификация и отбор признаков. Построенная PLS-DA модель, включала 3 РС, объясняющие 63.9% дисперсии. Метаболиты, статистически связанные с различием культур разного возраста (VIP > 1), включали липофильные соединения, сахара, сукцинат, лейцин и др. В случае классификации методом RF наблюдали аналогичные закономерности. Основное отличие

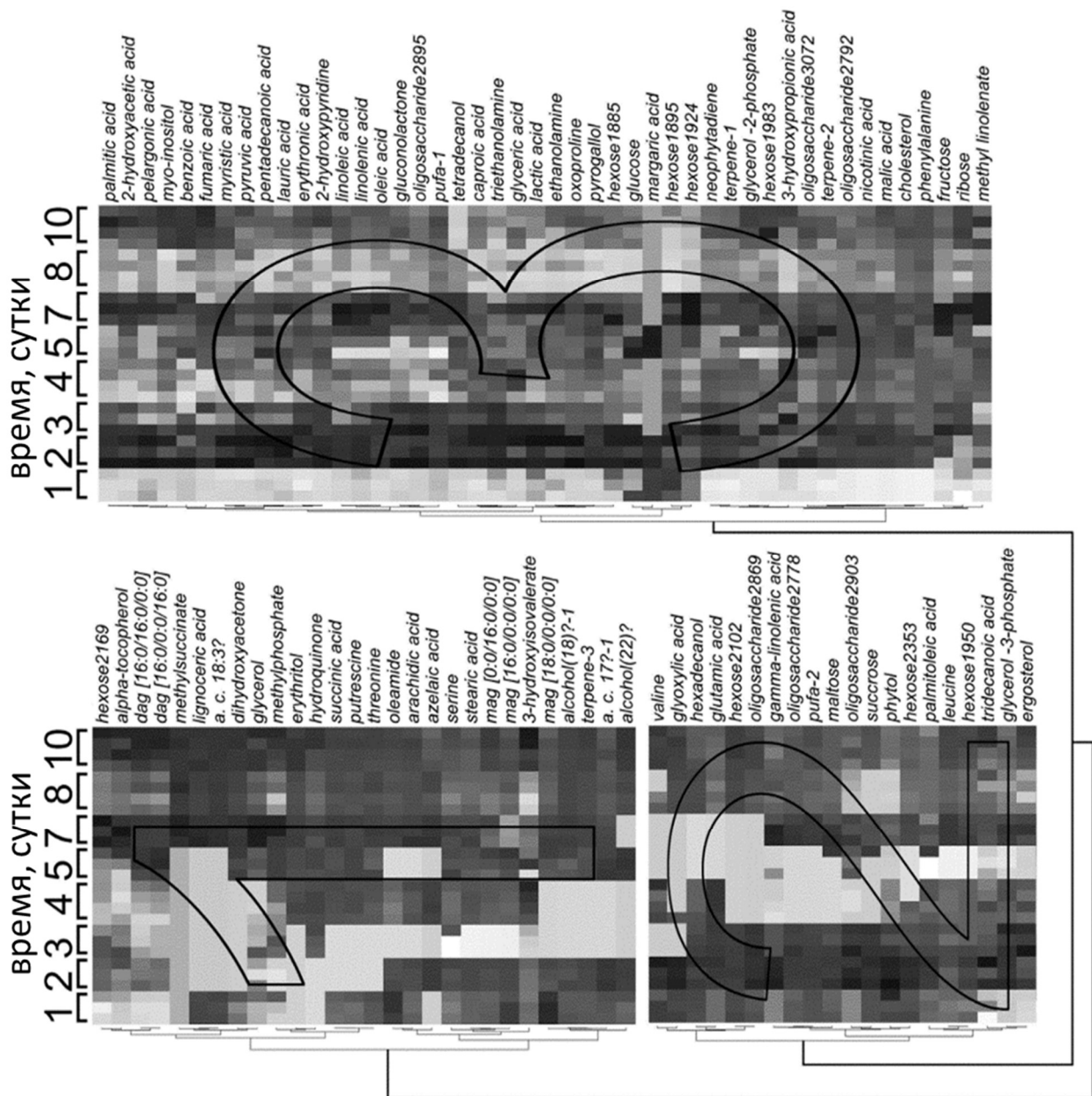


Рисунок 3. Тепловая карта содержания метаболитов в миксотрофных клетках хламидомонады, темный цвет соответствует большому содержанию метаболита в расчёте на клетку. Карта совмещена с дендрограммой иерархической кластеризации (расстояния определяются корреляцией, метод Варда).

заключалось в том, что при RF гексозы, включая глюкозу, и некоторые олигосахариды, такие как мальтоза, показали более высокую связь с возрастом культуры.

Анализ соотношений концентраций метаболитов, показал, что с возрастом связано большое число пар, образованных глутаматом и короткими жирными кислотами, а также фенилаланином и липофильными соединениями, что может отражать интенсивную биосинтетическую активность в экспоненциальной фазе, и переход к депонированию липидов в стационарной фазе.

Анализ динамики экспрессии генов интереса.

Различия профилей транскрипции культур на разных этапах роста. В ходе исследования был проанализирован уровень экспрессии 32 генов, кодирующих ферменты, вовлеченные в энергетический метаболизм, ассимиляцию ацетата, синтез липидов, метаболизм крахмала,

а также пластидные транспортеры. Как видно из графика матрицы счетов *PCA* (рис. 5), профили экспрессии формировали три группы, соответствующие началу, середине, а также группу, объединяющую завершение экспоненциального роста и стационарную фазу. Классификации методом PLS-DA и отбор переменных по значениям VIP (>1) показали, что различия этих трёх периодов связаны с экспрессией генов ассимиляции ацетата ACS1,2 и ACK2, входа ацетильных групп в цикл Кребса CIS2 и ACLA1, кодирующих ферменты,

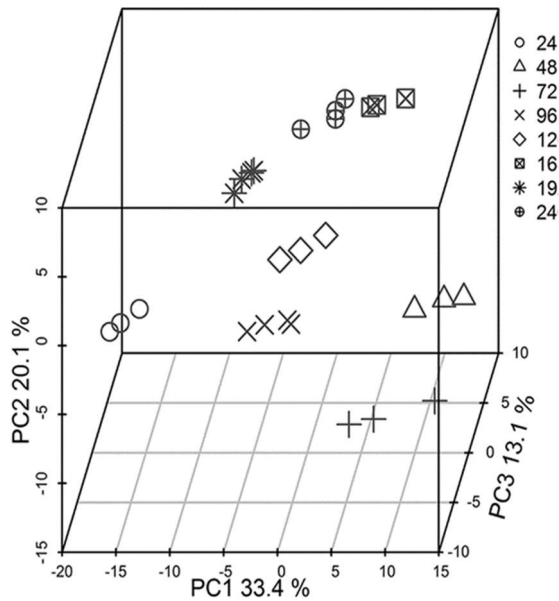


Рисунок 4. График матриц счетов, полученный методом PCA при анализе метаболитных профилей *C. reinhardtii*. Точки соответствуют профилям метаболитов, символы отражают время прошедшее после посева, сутки (ч), % - доля дисперсии, связанная с главной компонентой (PC).

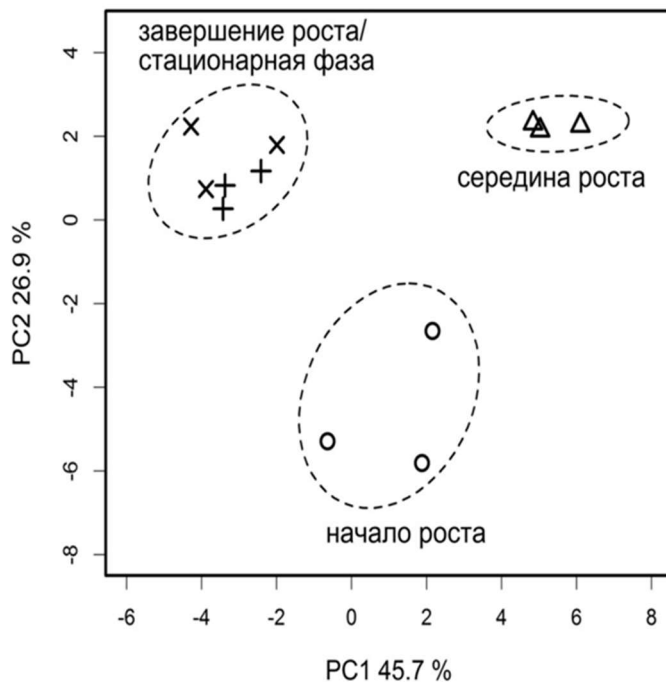


Рисунок 5. График матрицы счетов, полученный методом PCA при анализе профилей экспрессии 32 генов, кодирующих ферменты центрального метаболизма и пластидные транспортеры в клетках *C. reinhardtii* при выращивании (миксотрофные условия)

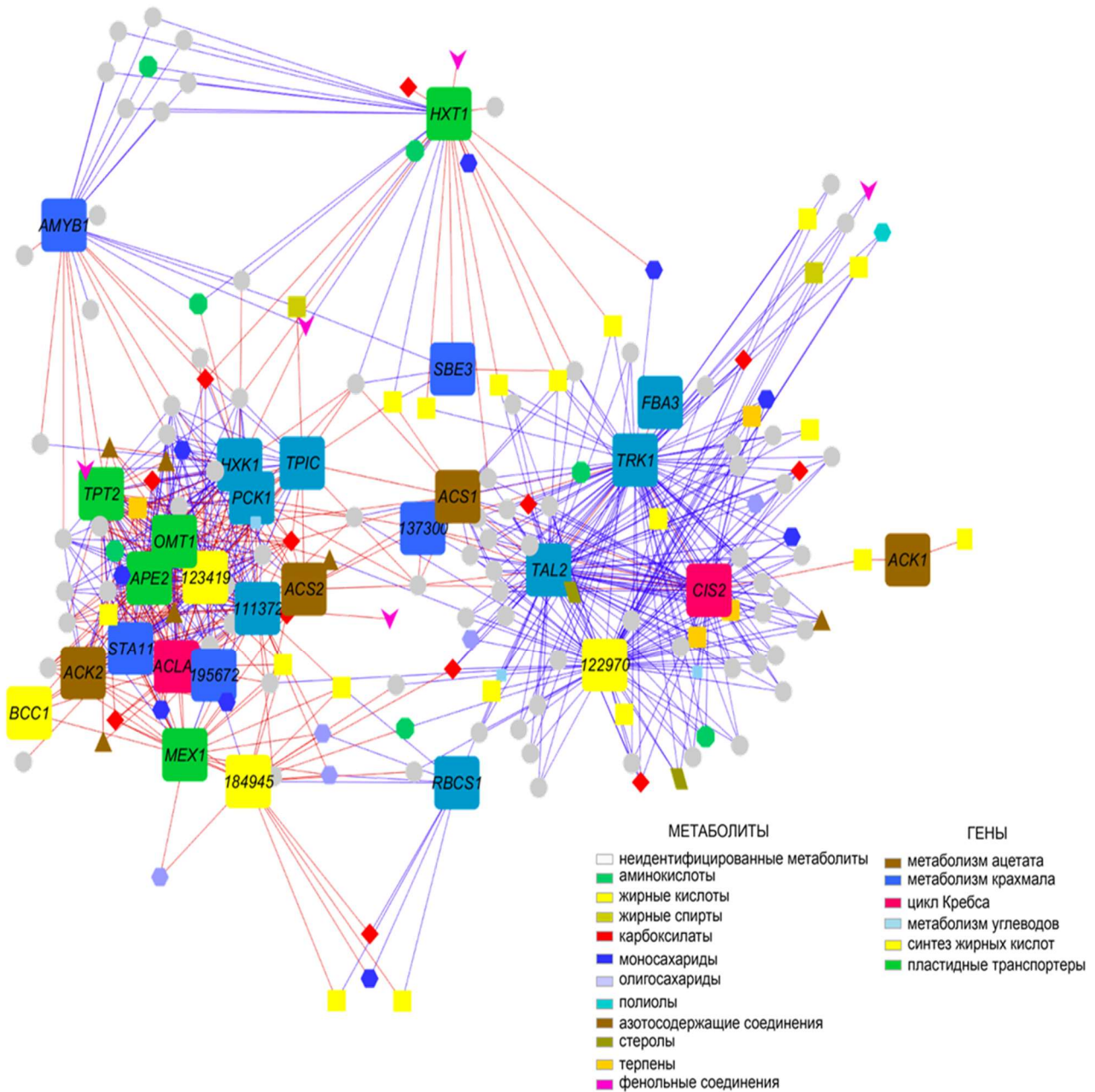


Рисунок 7. Сеть метаболитов и генов построенная по корреляционным связям уровней экспрессии между собой и их корреляции с содержанием метаболитов при развитии миксотрофной культуры. Узлы соответствуют генам и метаболитам, форма и цвет отражают химическую природу и физиологическую роль. Овалы – метаболиты, квадраты – гены. Рёбра соответствуют корреляционным связям ($|r| > 0.7$), синие – отрицательным, красные – положительным.

Паттерны динамики уровня экспрессии генов. В результате иерархической кластеризации были выделены 6 паттернов динамики уровня экспрессии генов интереса (рис. 6). Гены I и III групп характеризовались снижением уровня экспрессии в процессе развития культуры. Гены пятого и шестого кластеров, демонстрировали существенный рост уровня экспрессии в середине экспоненциальной фазы. Возможно, что активность этих генов связана с поддержанием высокого уровня пролиферации в условиях роста плотности, истощения питательных веществ и изменения состава среды. Для небольшого числа генов (кластер IV) показан устойчивый рост экспрессии с увеличением возраста культуры.

Связь динамики экспрессии с метаболомом.

Для выявления роли экспрессии генов в формировании метаболитного профиля при росте миксотрофных культур был проведён корреляционный анализ уровней экспрессии генов между собой и с содержанием метаболитов. Результат был визуализирован в форме графика, состоящего

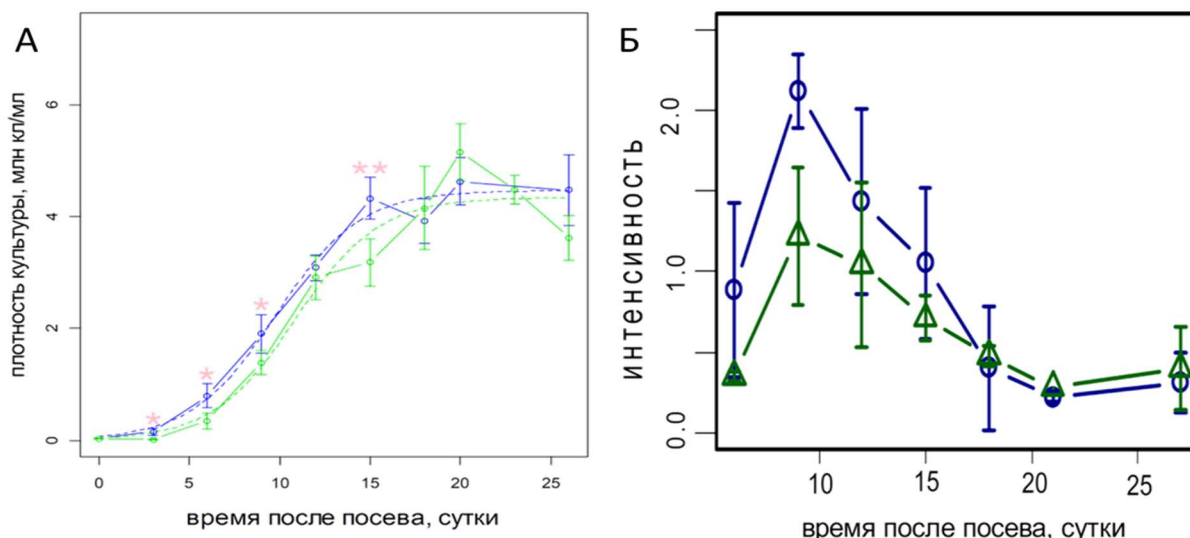


Рисунок 8. Динамика физиологических параметров в процессе развития автотрофной культуры *C. reinhardtii*. А. Рост клеточной плотности культур акклимированных к миксотрофии (синий) и автотрофии (зелёный). Б. Динамика интенсивности (мкг O₂/106 клеток*с) и темнового дыхания (синий) и фотосинтеза (зелёный). Измерения проводились при 3000 lx, как при культивировании, при развитии периодической миксотрофной культуры *C. reinhardtii*. Интервалы – SD.

из 2х субкластеров (рис. 7), где узлам соответствуют метаболиты и гены. Рёбрам соответствуют сильные корреляционные связи ($|r| > 0.7$). В первый кластер входят гены метаболизма углеводов, а также наиболее важные сахара такие, как глюкоза, сахароза, рибоза и др., которые связаны

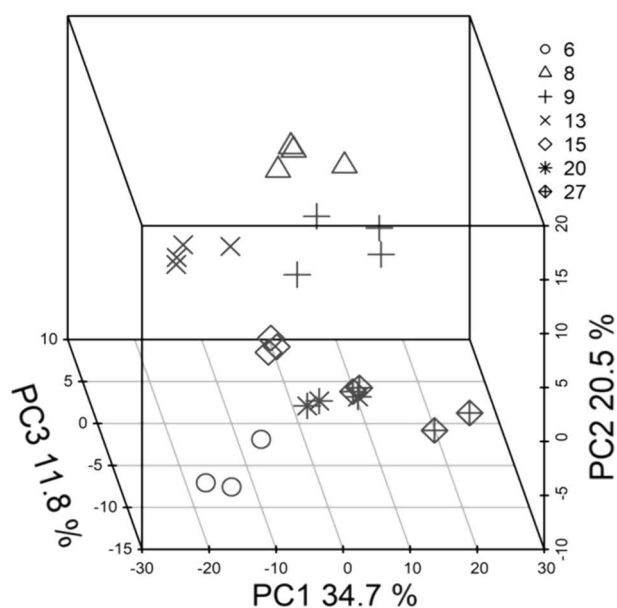


Рисунок 9. График матрицы счетов, полученный методом PCA при анализе метаболитных профилей автотрофных клеток *C. reinhardtii*, символы обозначают профили полученные в ходе развития культуры, цифры – сутки после посева.

преимущественно положительными связями. К данному кластеру примыкает ген, кодирующий одну из субъединиц АСС и ряд жирных кислот. Второй, меньший кластер, представлен генами, имеющими большей частью отрицательные связи. Его особенностью является наличие генов ферментов ПФП, цикла Кребса и синтеза жирных кислот. С ними связаны небольшое число аминокислот, терпенов, жирных кислот и ацилглицеринов, некоторые сахара, включая фруктозу и др.

Автотрофная культура клеток *Chlamydomonas reinhardtii*

Изменение роста и физиологии клеток

Рост клеточной плотности автотрофной культуры описывается логистической функцией (рис. 8А): $CD=4.35\pm 0.16\cdot(1+10^{(4.71\pm 0.81-0.43\pm 0.077\cdot t)})^{-1}$, где CD – клеточная плотность, млн. клеток/мл, t – время после посева, сутки, интервалы – SE коэффициентов. При том, что рост продолжался значительно дольше, максимальная плотность примерно вдвое ниже, чем у миксотрофной культуры.

Анализ активности темнового дыхания и фотосинтеза при интенсивности освещения, при котором происходило культивирование, показал, что, как и в случае миксотрофной культуры, значения интенсивности обоих процессов в автотрофных условиях изменялись синхронно (рис. 8Б). Эти показатели были относительно невысоки в начале развития, а затем постепенно увеличивались. Максимальные значения в расчёте на клетку были зарегистрированы в середине экспоненциальной фазы, затем они снижались, достигая минимума в стационарную фазу. Амплитуда изменений дыхания и фотосинтеза при автотрофных условиях были меньше, чем при миксотрофии.

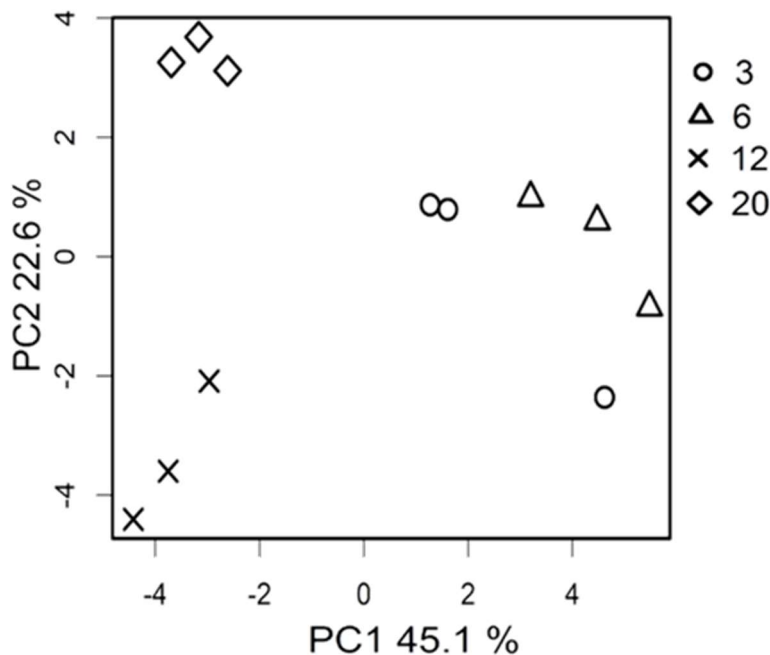


Рисунок 10. График матрицы счетов, полученный методом PCA при анализе профилей экспрессии автотрофных клеток *C. reinhardtii*, символы обозначают профили, полученные в ходе развития культуры, цифры – сутки после посева.

Метаболомный анализ

Паттерны динамики содержания метаболитов. По характеру динамики, метаболиты можно условно разделить на две большие группы: для первой характерно большее содержание в начале развития культуры, а для второй - во второй его половине. Как и при миксотрофии, кластер метаболитов с высоким содержанием в период активного роста включал короткие жирные кислоты, а также ряд интермедиатов энергетических и синтетических циклов, ряд аминокислот, аминов, сахаров, включая мальтозу, сахарозу, глюкозу, рибозу и др.

Разведочный анализ. Снижение размерности (рис. 9) методами без обучения выявило, что профили группируются в зависимости от времени развития культуры. Как в случае миксотрофных культур, масштабные метаболомные сдвиги сопряжены с интенсивными изменениями физиологической активности в период экспоненциального роста.

Классификация и отбор признаков. PLS-DA показал, что как и в случае миксотрофной культуры, среди метаболитов с высокими значениями VIP, широко представлены липофильные соединения. Также, к этой группе относятся олигосахариды, включая сахарозу, и небольшое число гексоз, среди аминокислот – триптофан, глицин, треонин. Высокие значения VIP ряда карбоновых кислот наблюдали только в случае автотрофии, например, малат, фумарат, глиоксилат, глицерат, 3-гидроксиизовалерианат, 3-гидроксипропионат, никотинат. В случае RF классификации сахара, в частности гексозы, и некоторые олигосахариды, а также жирные кислоты C₁₃-C₁₈ демонстрировали большую связь с возрастом культуры.

Анализ динамики экспрессии генов интереса

Различия профилей экспрессии на разных фазах роста культуры. Проведенный анализ накопления транскриптов 32 генов в ходе роста автотрофных культур выявил существенные изменения уровня экспрессии генов интереса. На графике матрицы счетов пробы группируются в зависимости от фазы роста (рис. 10). Профили экспрессии в начале экспоненциального роста отличаются от таковых во второй половине роста в пространстве PC1, во второй половине роста и в

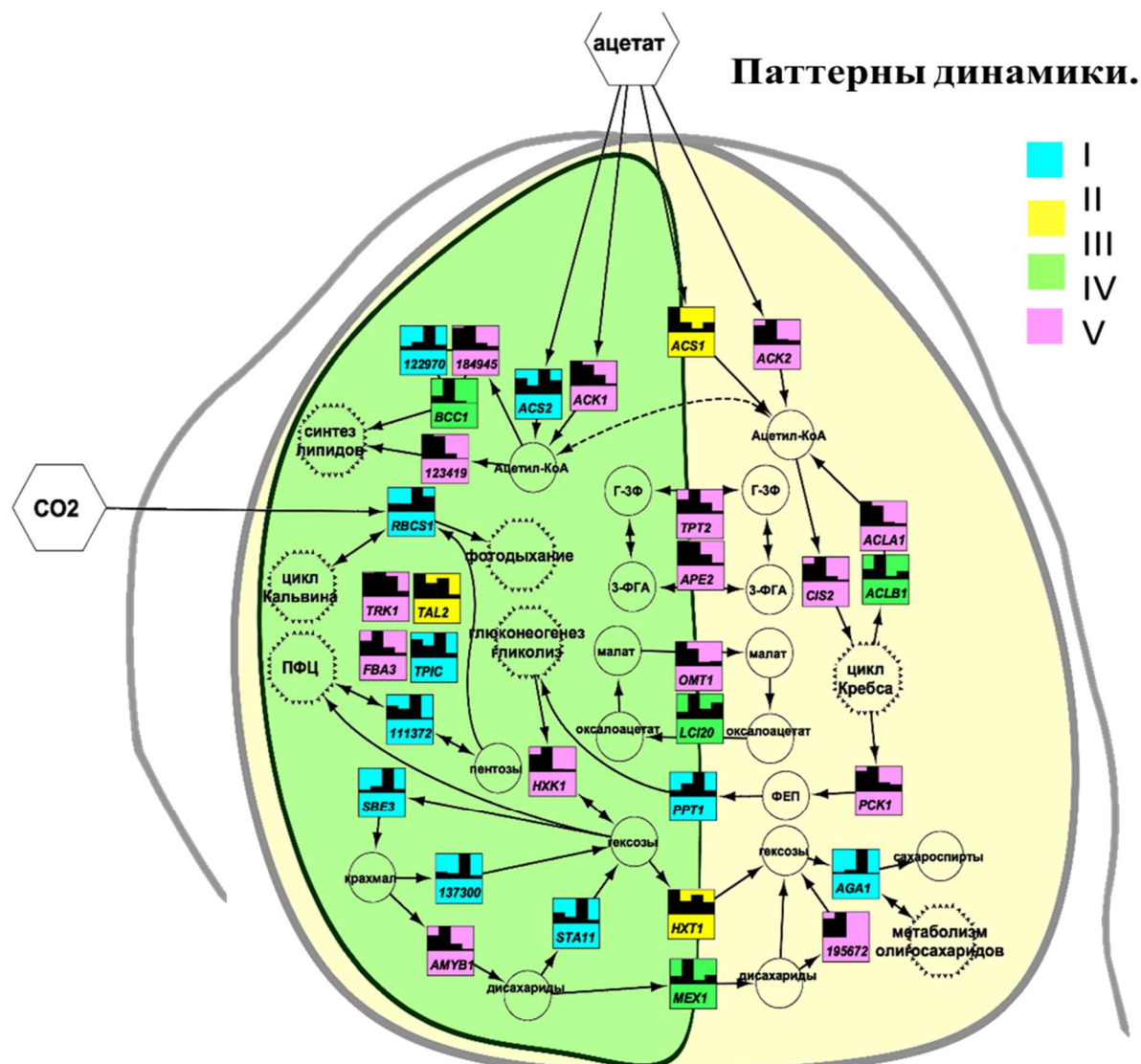


Рисунок 11. Динамика уровня экспрессии генов центрального метаболизма в процессе роста автотрофной культуры хламидомонады. Пробы отбирали в начале (3-ые сутки), середине (6-ые сутки), второй половине (12-ые сутки) экспоненциальной фазы и в стационарной фазе (20-ые сутки). Цветом обозначены группы генов со сходным паттерном динамики, выделенные на основе иерархического кластерного анализа.

стационарной фазе различаются в пространстве PC2. Наблюдения в начале и середине роста различались преимущественно в пространстве PC3. Можно заключить, что наиболее существенные изменения происходят в середине фазы экспоненциального роста.

PLS-DA выявил значительную связь ($VIP > 1$) экспрессии 14 генов с возрастом культуры. Большая часть генов демонстрирует относительно высокие нагрузки PC1 (44%), связанные с различиями между началом и второй половиной роста (рис. 10).

Паттерны динамики уровня экспрессии генов. Корреляционный анализ с последующей иерархической кластеризацией с использованием корреляции в качестве меры дистанции коэффициента корреляции ($1-r$) выявил 4 паттерна динамики уровня экспрессии генов интереса (рис. 11). Гены группы I демонстрировали повышение уровня активности в процессе развития

культуры, особенно в середине экспоненциальной фазы, и снижение при её завершении. Группа II объединяла только три гена, из которых достоверные различия показал только *ACSI*. Экспрессия этого гена снижалась со временем. Паттерн динамики экспрессии генов третьего кластера отличался пиком экспрессии во второй четверти периода роста (6 суток). Четвертый кластер объединял наибольшее количество (15) генов. Уровень экспрессии этих генов снижался со старением культуры либо с 3 суток, либо с 6 суток.

Связь динамики экспрессии с метаболомом.

Для выявления связи экспрессии генов с метаболитным профилем был проведён корреляционный анализ уровней экспрессии генов между собой и с относительным содержанием метаболитов. Результат был визуализирован в форме графика (рис. 12), включающего два кластера. Первый, меньшего размера, концентрируется вокруг генов пластидных экспортеров, генов ферментов синтеза и деградации крахмала и метаболизма углеводов. Уровень экспрессии этих генов имеет пик во второй половине экспоненциального роста (рис. 11). Данные гены связаны преимущественно с углеводами, включая глюкозу, фруктозу и сахарозу. К этому кластеру примыкает некоторое количество ацилглицеринов и жирных кислот. Второй кластер большего

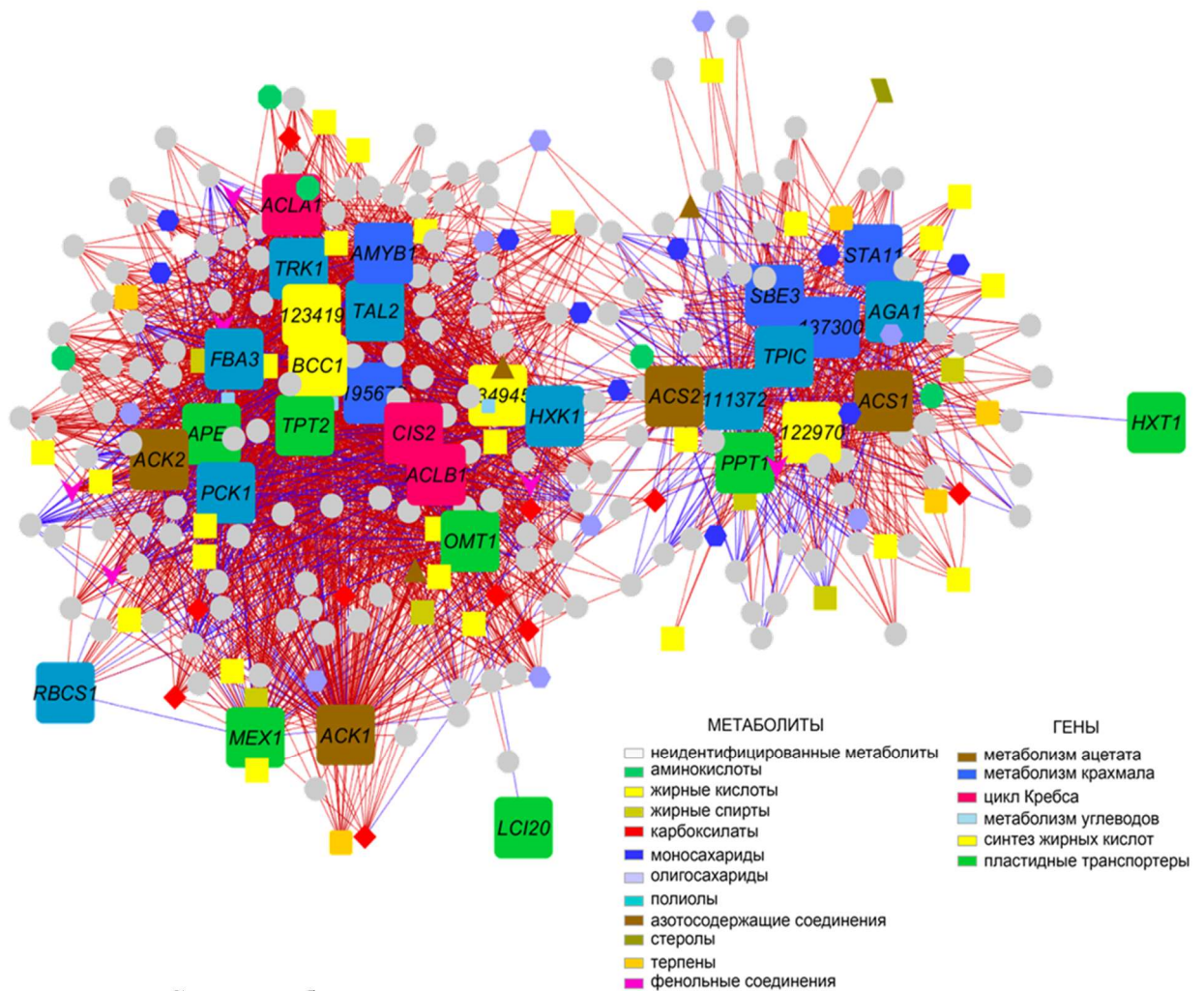


Рисунок 12. Сеть метаболитов и генов построена на основе корреляций экспрессии между собой и их корреляции с содержанием метаболитов при развитии автотрофной культуры. Узлы соответствуют генам и метаболитам, форма и цвет отражают химическую природу и физиологическую роль. Овалы – метаболиты, квадраты – гены. Рёбра соответствуют корреляционным связям ($|r| > 0.7$), синие – отрицательным, красные – положительным.

размера и разнообразия, объединяет гены с падением уровня экспрессии во второй части экспоненциального роста. В него входит большая часть генов ферментов синтеза жирных кислот, энергетических и пластических путей, пластидных транспортеров. Данный кластер содержит большую часть аминокислот, карбоновых кислот, значительное число жирных кислот.

Сравнительный анализ авто- и миксотрофных культур

Влияние трофических условий на профиль метаболитов

Разведочный анализ. Приведенные выше результаты свидетельствуют о значительных изменениях, происходящих на метаболомном уровне в клетках хламидомонады как при миксотрофных, так и автотрофных условиях. Применение методов снижения размерности без обучения показало, что метаболитные профили разделены на 2 большие группы, соответствующие трофическому статусу (рис. 13). В целом, метаболизм клеток, растущих при миксотрофных условиях, изменялся сильнее по сравнению с автотрофными культурами. Наибольшие различия метаболизма выявлены у авто- и миксотрофных клеток в середине экспоненциального роста. В случае миксотрофных культур, начиная со второй половины экспоненциального роста, наблюдался постепенный сдвиг метаболома в сторону состояния характерного для автотрофного культивирования.

Различия авто- и миксотрофных культур в фазе экспоненциального роста. Сравнение метаболизма клеток хламидомонады в фазу экспоненциального роста с помощью OPLS-DA показало, что с трофическим статусом связано около 55% дисперсии содержания метаболитов. Анализ факторных нагрузок с $VIP > 1$ показал, что содержание сахаров, в том числе глюкозы, фруктозы и мальтозы, было выше в автотрофных клетках. Для клеток миксотрофных культур было характерно большее содержание жирных кислот и их производных, например 6:0, 9:0, 12:0, 13:0, 16:0, 18:1 (9 Z), 16:1, 18:2 (9, 12 Z), 18:3 (9, 12, 15 Z), а также неидентифицированная ПНЖК и ДАГ[16:0/0:0/16:0]. Среди липофильных соединений также было больше эргостерола, фитола, терпенов и др. Тогда как при автотрофных условиях росли пулы жирных кислот 18:3 (9, 12, 15 E) и 24:0. Миксотрофные условия стимулировали накопление карбоновых кислот: fumarата, пирувата, лактата, малата, никотината, 3-гидроксиизовалерианата, но содержание сукцината было больше в автотрофных клетках. Наличие в среде ацетата способствовало накоплению ряда аминокислот (оксопролина, фенилаланина и глутамата), аминов (триэтанолamina и пропиламина) и глицеринфосфатов.

Связь старения миксотрофной культуры и трофического статуса. Сравнение факторных нагрузок предиктивных компонент, полученных при OPLS-DA различий авто- и миксотрофных культур, а также миксотрофных культур в экспоненциальной и стационарной фазах (рис. 14) показало, что

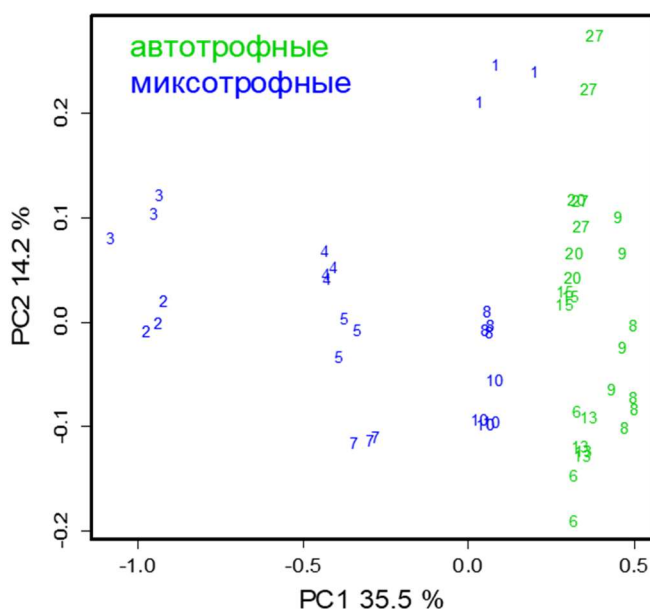


Рисунок 13. Графики матриц счетов, полученные при анализе метаболитных профилей автотрофных и миксотрофных культур методом нелинейного PCA основанным на нейронных сетях.

подавляющая часть метаболитов имела одинаковые знаки нагрузок. Кроме того, между их значениями наблюдалась сильная достоверная корреляция ($r=0.74$, $p<0.001$). Всё это говорит о большом сходстве изменений метаболитных пулов в процессе старения культуры и перехода к автотрофному питанию. Следовательно, одним из драйверов метаболических изменений в процессе роста миксотрофной культуры можно считать истощение ацетата и последующий сдвиг метаболизма в направлении автотрофии.

Влияние трофических условий на профиль экспрессии генов

Разведочный анализ. На графике матрицы счетов PCA (рис. 15) представлены профили экспрессии автотрофных и миксотрофных культур. Нужно отметить, что трофические условия в значительной степени определяли экспрессионные различия, а также, что по мере старения культур различия между авто- и миксотрофными культурами сглаживались. Последнее согласуется с гипотезой о смещении метаболизма в сторону автотрофного типа развития при старении миксотрофной культуры, сделанной при анализе профилей метаболитов.

Особенности различий авто- и миксотрофных культур в период экспоненциального роста. OPLS-DA анализ показал, что с предиктивной компонентой, связано около 46% дисперсии

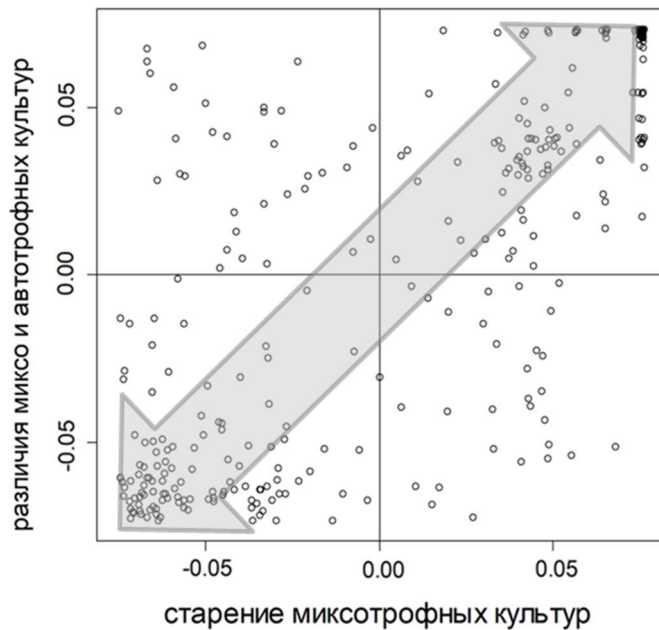


Рисунок 14. Взаимосвязь возрастных изменений миксотрофной культуры на уровне метаболома и смены типа питания. График SUS-plot (Shared and Unique Structures): рассеяние метаболитов в пространстве нагрузок предиктивных компонент, полученных при OPLS-DA анализе различий авто- и миксотрофных культур (ордината) и при сравнении миксотрофных культур в экспоненциальной и стационарной фазах (абсцисса).

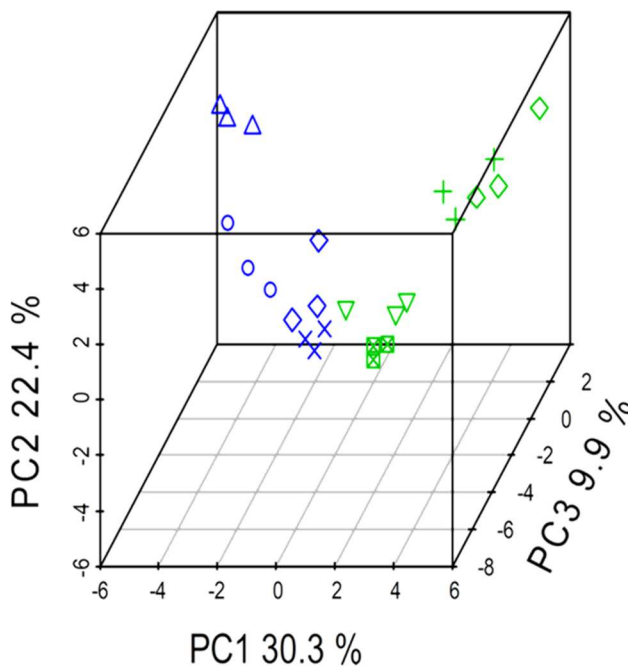


Рисунок 15. График матрицы счетов, полученный методом PCA при анализе профилей экспрессии генов автотрофных и миксотрофных культур *C. reinhardtii*. Цвет соответствует трофическому статусу: синий - миксотрофные, зелёный - автотрофные клетки. Символы обозначают профили полученные в ходе развития культуры, цифры - сутки после посева.

миксотрофные
автотрофные

○ 1 △ 2 + 3 × 4
◇ 6 ▽ 12 ▣ 20

относительного уровня экспрессии генов. Среди генов с $VIP > 1$, при миксотрофных условиях уровень экспрессии генов *ACS2*, *CHLREDRAFT_137300*, *PCK1*, *LCI20*, *STAI1*, *RBCS1*, *CHLREDRAFT_123419*, *CHLREDRAFT_184945*, *OMT1* был значительно выше. На стадии экспоненциального роста при миксотрофии усиливалась экспрессия *CHLREDRAFT_122970* и *TPIC*. Для автотрофных клеток была свойственна высокая экспрессия генов *ACLA1*, *ACLB1*, *ACK1*, *AMYB1*, *PPT1*, *HXT1*. Сходные результаты были получены и по результатам общего сравнения.

Однако фаза роста при автотрофии характеризовалась более высокой экспрессией генов *HXK1* и *AGI1*, кодирующих ферменты, играющие важную роль в углеводном обмене, что согласуется с данными метаболомики, показавшими большее содержание ряда сахаров при автотрофном питании.

Связь старения миксотрофной культуры и трофического статуса. Для выявления роли транскрипционных изменений при смещении трофического статуса миксотрофной культуры в сторону автотрофии при старении был построен график (рис. 16) рассеяния генов в пространстве нагрузок предиктивных компонент, полученных при OPLS-DA анализе различий между авто- и миксотрофными культурами (по оси абсцисс), миксотрофными культурами в экспоненциальной и стационарной фазах (по оси ординат). Показано, что возрастные изменения экспрессии генов интереса, происходящие в миксотрофной культуре, достоверно коррелируют с разницей между трофическими условиями ($r=0.45$, $p<0.01$), что согласуется с аналогичным выводом, сделанным на основе анализа метаболомных данных. Ряд генов (выделены пунктирной линией) не укладывается в эту закономерность, что, возможно, обусловлено тем, что уровень экспрессии этих генов падает со старением, как у авто- (рис. 6), так и миксотрофных культур (рис. 11), что искажает влияние на них сокращения ацетата в среде.

Влияние акклимации на развитие культуры при миксотрофном культивировании

Влияние акклимации на рост и физиологию клеток при миксотрофном культивировании

Скорость роста культур, растущих в дальнейшем как при авто-, так и при миксотрофных условиях, увеличивается при предварительном культивировании в миксотрофных условиях. Особенно этот эффект был выражен в начале роста культуры (рис. 2А), что, возможно, опосредовано большим объемом резервных соединений, накопление, которых было простимулировано ацетатом. Эти

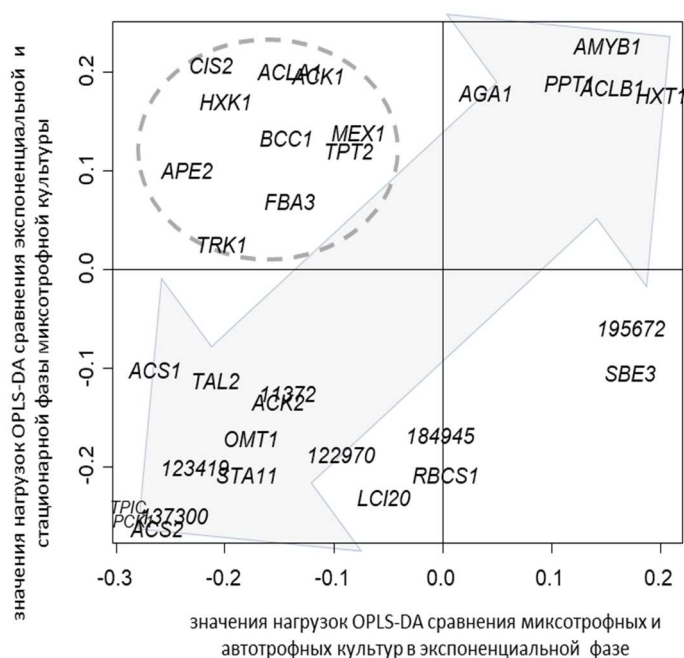


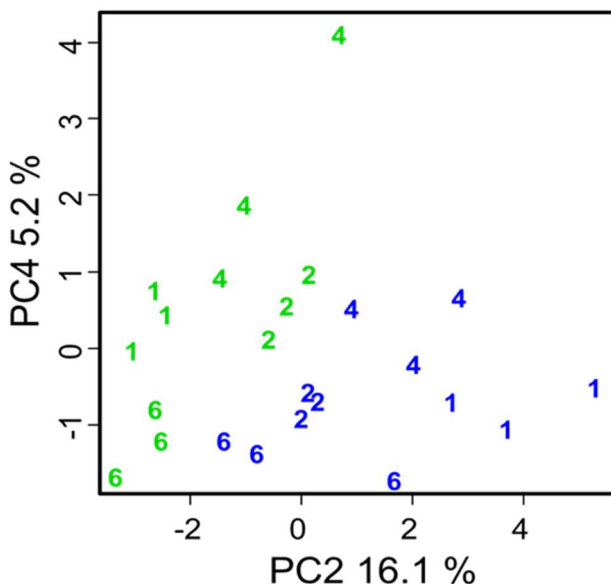
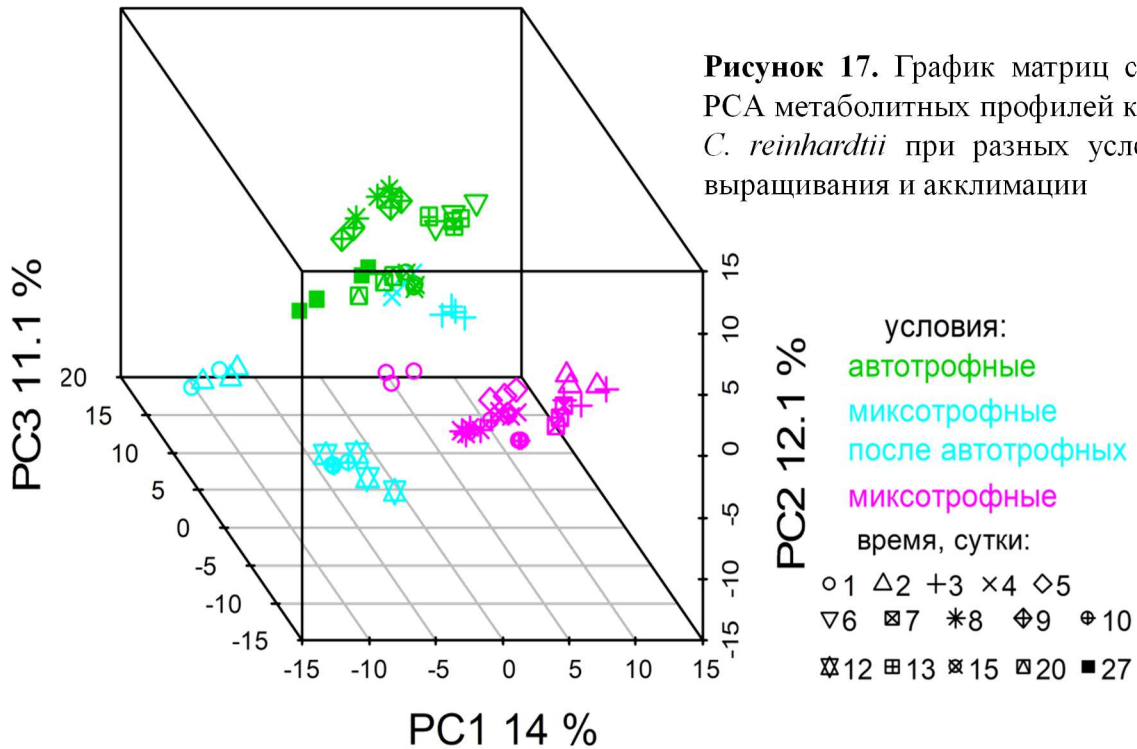
Рисунок 16. Рассеяние генов в пространстве нагрузок предиктивных компонент, полученных при OPLS-DA анализе различий авто- и миксотрофных культур, находящихся в фазе роста (абсцисса) и при сравнении миксотрофных культур в экспоненциальной и стационарной фазах (ордината).

запасы на начальных этапах роста культуры обеспечивали клетки дополнительным веществом и энергией, что интенсифицировало рост.

Уровень фотосинтетической активности и дыхания существенно различался в зависимости от предварительных условий культивирования. В экспоненциальной фазе роста активность фотосинтетических и респираторных процессов была выше при предварительном культивировании на среде с ацетатом. Однако активность фотосинтеза и дыхания в стационарной фазе слабо различалась в зависимости от трофических условий и акклимации.

Влияние акклимации на метаболитные профили миксотрофных культур

Общее влияние акклимации. Особенностью динамики метаболитных пулов при акклимации к автотрофии является более позднее наступление максимумов содержания большей части метаболитов по сравнению с акклимацией к миксотрофии. Эффект соответствует «отставанию» в росте культур, адаптированных к автотрофии. Наблюдался рост числа и усиление положительных корреляционных связей между содержаниями метаболитов.



Для того чтобы определить сходства профилей миксотрофных клеток, акклимированных к автотрофии, с таковыми миксотрофных и автотрофных культур они были представлены в пространстве счетов первых трёх главных компонент PCA (рис 17). Выявлено, что метаболитные профили образуют группы, соответствующие трофическому статусу. В пространстве PC2 пробы группируются согласно текущим трофическим условиям. В пространстве PC3 группа, соответствующая миксотрофным клеткам, предадаптированным к автотрофии, занимает промежуточное положение между авто- и миксотрофными клетками. Метаболитные профили в

период роста культуры оказываются близки к профилям автотрофных культур, а в стационарной фазе - к миксотрофным культурам.

Различия в начале роста. Моделирование с помощью OPLS-DA выявило, что с предиктивной компонентой, отражающей влияние акклимации, связано около 38% дисперсии содержания метаболитов. Большая часть метаболитов показала высокий уровень содержания при акклимации к миксотрофии. Трофическая акклимация культуры тесно связана с содержанием липофильных соединений таких, как жирные кислоты и спирты, диацилглицерины. Акклимация к миксотрофии приводила к повышению содержания жирных кислоты 22:0, 18:2 (9, 12 Z), 16:1, 18:1 (9, Z), 18:3 (6, 9, 12, Z), 18:3 (9, 12, 15 Z), 15:0, 12:0 и таких липофильных соединений, как терпены, фитол, эргостерол, α -токоферол и др. и ряда карбоновых кислот: лактата, пирувата, гликолата, а также серина, ряда аминов (триэтанолamina и пропиламина) и амидов (гексадеканамида и олеаида). В клетках акклимированных к автотрофии культур увеличены концентрации ацилглицеринов, сукцината, метилсукцината и β -гидроксibuтирата.

Различия во второй половине роста. OPLS-DA показал, что в этот период с трофическим статусом связано около 36% дисперсии содержания метаболитов, что сходно с таковыми показателями для клеток в начале роста. Однако характер различий в содержании метаболитов был иным. Практически полностью исчезали различия в содержании жирных кислот. Такие сохранялись по отношению к 16:1, 9:0, ПНЖК_RI_2173, которых было больше в акклимированных к миксотрофии культурах, и 14:1 (9, Z), 17:0, которые накапливались в акклимированных к автотрофии клетках. В клетках, постоянно растущих при миксотрофных условиях, по-прежнему было больше таких липофильных соединений, как некоторые терпены, эргостерол, ДАГ[16:0/0/0/16:0], фитол, а также амины и амиды. Напротив, МАГ[18:0/0/0/0] имел большее содержание в акклимированных к миксотрофии клетках. Кардинальное изменение произошло в метаболитных пулах сахаров. На этом этапе развития большое число сахаров имело высокое содержание в клетках культур, акклимированных к автотрофии. Среди них: глюкоза, сахароза, мальтоза, дигидроксиацетон и несколько неидентифицированных гексоз. Показательно, что в культурах, акклимированных к миксотрофии повышение содержания сахаров не выявлено, в отличие от карбоновых кислот (малат и фумарат). Содержание аминокислот не имело значительной связи с трофическим статусом акклимации, кроме лейцина, содержание которого было больше в клетках акклимированных к миксотрофии, а валина – к автотрофии.

Сравнительный анализ различий профилей метаболитов между миксотрофными культурами акклимированными к авто- и миксотрофии, и различий между авто- и миксотрофными культурами.

Сравнение нагрузок предиктивных компонент, полученных при OPLS-DA различий авто- и миксотрофных культур и миксотрофных культур, акклимированных к авто- и миксотрофии на этапе экспоненциального роста, выявило, что большая часть метаболитов имела одинаковые знаки нагрузок в обеих OPLS-DA моделях. Между ними наблюдалась достоверная корреляция ($r=0.52$, $p<0.001$), что свидетельствует о сохранении во времени значительного числа черт метаболома, характерных для автотрофных культур даже после перехода к миксотрофии.

Влияние акклимации на профили экспрессии миксотрофных культур.

Динамика профиля экспрессии в процессе развития культуры. Как и в случае культур, постоянно поддерживаемых при миксотрофии, культуры, акклимированные к автотрофии, характеризовались динамичными изменениями профиля экспрессии в процессе роста. В присутствии ацетата культуры, акклимированные к различным трофическим условиям, проявляли сходные изменения экспрессии генов интереса в процессе развития культуры. Как и в случае культур, постоянно растущих при миксотрофии, акклимированные к автотрофии клетки, имели сниженный уровень накопления продуктов экспрессии большей части генов при старении культуры. Сходство миксотрофных культур, независимо от предшествующих трофических условий, заключалось и в том, что большая часть генов имела максимум на вторые сутки после посева.

Различия профилей миксотрофных культур в зависимости от акклимации. Применение PCA показало, что профили группировались согласно акклимации только в пространстве PC2 и PC4 (рис. 18). Это указывает на сравнительно низкое влияние акклимации на формирование профиля экспрессии. Максимальные различия наблюдались между культурами только в начале экспоненциального роста.

Различия в начале экспоненциального роста. OPLS-DA показал, что с предиктивной компонентой, отражающей влияние трофической акклимации, связано около 69% дисперсии уровня экспрессии генов. В миксотрофных клетках, акклимированных к миксотрофии, в число генов с повышенной экспрессией и VIP>1 входят: *ACSI* и 2, *TRK1*, *CIS2*, *CHLREDRAFT_195672*, *CHLREDRAFT_137300*, *CHLREDRAFT_122970*, *TAL2*, *LCI20*, *PPT1*, *RBCS1*, *SBE3* *AMYB1*. В отличие от генов *HXK1*, *FBA3*, *BCC1*, *HXT1*, *MEX1*, *OMT1*, *CHLREDRAFT_111372*, имеющих более высокий уровень экспрессии в клетках акклимированных к автотрофии.

Сравнительный анализ различий профилей экспрессии миксотрофных культур, акклимированных к авто- и миксотрофии, и различий авто- и миксотрофных культур.

Было проведено сравнение нагрузок предиктивных компонент, полученных при OPLS-DA различий миксотрофных культур, акклимированных к авто- и миксотрофии, в начале роста и при анализе различий авто- и миксотрофных культур в период экспоненциального роста. Оказалось, что большая часть генов характеризовалась одинаковым знаком нагрузки в обеих моделях, следовательно, значительное число черт, характерных для автотрофных культур, сохранялось по времени даже после перехода к миксотрофии. Аналогичные тенденции наблюдали и при анализе метаболитных профилей.

Влияние акклимации на связь паттерна экспрессии генов с метаболомом

По результатам сравнения был построен график, где узлам соответствуют метаболиты и гены, а рёбрам соответствуют сильные ($|r|>0.7$) корреляционные связи (см. диссертацию). Большая часть генов собрана в одну плотную сеть, что резко отличает эту карту от таковых, построенных для постоянно автотрофных и миксотрофных культур, что согласуется с выявленным усилением корреляционных связей между концентрациями метаболитов.

Влияние акклимации на развитие культуры при автотрофном культивировании

Влияние акклимации на профили метаболитов автотрофных культур

Общее влияние акклимации. Как и в случае миксотрофных культур, снижение размерности показало, что метаболитные профили формировали большие кластеры, соответствующие трофическому статусу акклимации. При этом максимальные различия между клетками с различной акклимацией имели место в начале и середине фазы экспоненциального роста.

Различия в середине фазы роста. Моделирование с помощью OPLS-DA показало, что с предиктивной компонентой, отражающей влияние акклимации, связано около 31% дисперсии. Трофическая акклимация к автотрофии была связана с большим содержанием сахаров, тогда как большее содержание жирных кислот и др. липофильных соединений, а также ряда карбоновых кислот было показано при акклимации к миксотрофии.

Сравнительный анализ различий профилей метаболитов автотрофных культур, преадаптированных к авто- и миксотрофии, и различий между авто- и миксотрофными культурами свидетельствует о сохранении значительного числа черт метаболома, характерных для миксотрофных культур даже после перехода к автотрофии.

Влияние акклимации на профиль экспрессии автотрофных культур

Как и в случае миксотрофных культур, акклимация оказывала сравнительно слабое влияние на формирование профиля экспрессии по сравнению с текущими трофическими условиями или влиянием акклимации на метаболом. Кроме того, это влияние было выражено слабее по сравнению с миксотрофными культурами (31% дисперсии на начало роста). Особенности экспрессии указывали на сохранение черт миксотрофного метаболизма в регуляции синтеза липидов при автотрофных условиях после акклимации к миксотрофии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты доказывают, что периодическая культура хламидомонады представляет собой сложную динамически меняющуюся систему. В процессе роста культуры происходят значительные изменения условий среды, связанные с истощением нутриентов, затенением и изменением химического состава. Это, в свою очередь, порождает координированные ответные изменения уровня транскрипции генов и метаболома. Системным результатом этих изменений

является перераспределение углерода между путями катаболизма, ассимиляции, депонирования и деградации резервных соединений. На уровне клетки эти перестройки выражаются в изменении скорости пролиферации, активности дыхания и фотосинтеза. Течение этих процессов определяется, в том числе и трофическими факторами, поскольку наличие в среде утилизируемого субстрата, при лимитировании фотосинтеза, создает условия для роста физиологической активности, скорости роста и депонирования углерода. С другой стороны, механизмы ассимиляции авто- и гетеротрофных источников энергии и вещества требуют активации или репрессии определенных биохимических путей. Способность, механизмы и результат усвоения органического субстрата зависят от физиологического статуса клеток, определяемого акклимацией. При смене условий культивирования наблюдается сложная картина метаболических изменений, формирующаяся под влиянием предыдущего периода культивирования, формирования акклимации к новым условиям, и динамики среды, характерной для периодической культуры. В результате статус акклимации оказывает системное влияние на профиль транскрипции генов, метаболом и их взаимосвязь.

ВЫВОДЫ

1. Присутствие в среде ацетата и предварительное культивирование на среде, содержащей ацетат, стимулирует рост клеточной плотности, активность дыхания и фотосинтеза периодических суспензионных культур *C. reinhardtii* по сравнению с автотрофными условиями или акклимации к ним.
2. Развитие периодических суспензионных культур *C. reinhardtii* при различных трофических условиях сопровождается системными перестройками, выраженными на транскрипционном и метаболомном уровнях.
3. Трофические условия и акклимация к ним имеют большое значение в регуляции метаболизма клеток *C. reinhardtii*. Изменения метаболитных профилей преимущественно связаны с изменением содержания углеводов и липидов, что может отражать направленность депонирования метаболитов.
4. Выявлены значительные изменения профиля экспрессии генов, кодирующих ферменты и пластидные транспортеры, индуцированные изменением трофических условий в процессе роста периодических суспензионных культур *C. reinhardtii*.
5. Индуцированные трофическими условиями различия метаболитных и транскрипционные профили клеток хламидомонады выражены сильнее в фазу экспоненциального роста.
6. В ходе развития миксотрофной культуры происходит сдвиг в сторону автотрофного метаболизма, что выражается в соответствующих изменениях транскрипционного профиля и метаболома.
7. Влияние акклимации выражено сильнее при культивировании при миксотрофных условиях.
8. Показано существование корреляционных кластеров генов и метаболитов. При смене условий культивирования кластерная структура меняется, преимущественно в результате усиления корреляционных связей, отражающих координированные метаболические перестройки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Puzanskiy R.K., Shavarda A.L., Tarakhovskaya E.R., Shishova M.F. (2015). Analysis of metabolic profile of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated under autotrophic conditions. Applied Biochemistry and Microbiology. 51 (1). P. 83-94.
2. Пузанский Р.К., Шаварда А.Л., Шишова М.Ф. (2015). Динамика метаболома клеток автотрофной культуры *Chlamydomonas reinhardtii* в период экспоненциальной и стационарной фазы роста. Вестник Санкт-Петербургского Университета Сер. 3 Вып. 1. С. 104-121.
3. Puzanskiy, R., Tarakhovskaya, E., Shavarda, A., Shishova, M. (2018). Metabolomic and physiological changes of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae, Chlorophyta) during batch culture development. Journal of Applied Phycology. 30(2). P. 803-818.
4. Puzanskiy R., Romanyuk D., Shishova M. (2018). Coordinated alterations in gene expression and metabolomic profiles of *Chlamydomonas reinhardtii* during batch autotrophic culturing. Biological Communications. 63 (1). P. 87-99.

ДРУГИЕ ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. Пузанский Р.К., Емельянов В.В., Гавриленко Т.А., Шишова М.Ф. (2017). Перспективы метаболомных исследований растений картофеля. Вавиловский журнал генетики и селекции. 21(1). С. 112-123.
2. Пузанский Р.К., Емельянов В.В., Шишова М.Ф. (2018). Метаболомика - современный подход при изучении адаптации растений картофеля к биотическому и абиотическому стрессу. Сельскохозяйственная биология. 53(1). С. 15-28.
3. Puzanskiy R.K., Yemelyanov V.V., Shavarda A.L., Gavrilenko T.A., Shishova M.F. (2018). Age- and organ-specific differences of potato (*Solanum phureja*) plants metabolome. Russian Journal of Plant Physiology. 65(6). P. 813-823.
4. Котлова Е.Р., Виноградская М.А., Пузанский Р.К., Данчул Т.Ю., Шагова Л.И., Паутова И.А., Шаварда А.Л. (2018). Сравнительный метаболитный профайлинг тритерпеноидов и стероидов представителей рода *Agastache* (Lamiaceae). Растительные ресурсы. 54(1). С. 75-97.
5. Котлова Е.Р., Петрова Н.В., Медведева Н.А., Виноградская М.А., Пузанский Р.К., Сазанова К.В., Гельтман Д.В., Шаварда А.Л. (2018). Внутрипопуляционная изменчивость метаболома *Euphorbia* (Euphorbiaceae) в зависимости от фенологической фазы. Растительные ресурсы. 54(4). С. 558-585.
6. Puzanskiy R. K., Yemelyanov V. V., Kliukova M. S., Shavarda A. L., Shtark O. Yu., Yurkov A. P., Shishova M. F. (2018). Optimization of metabolite profiling for black medick (*Medicago lupulina*) and peas (*Pisum sativum*). Applied Biochemistry and Microbiology. 54(4). P. 442-448.
7. Shishova M., Puzanskiy R., Gavrilova O., Kurbanniazov Sh., Demchenko K., Yemelyanov V., Pendinen G., Shavarda A., Gavrilenko T. (2019). Metabolic alterations in male-sterile potato as compared to male-fertile. Metabolites. 9(2). 24.