

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА

УДК 577.121,57.041

Р. К. Пузанский, А. Л. Шаварда, М. Ф. Шишова

ДИНАМИКА МЕТАБОЛОМА КЛЕТОК АВТОТРОФНОЙ КУЛЬТУРЫ
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII В ПЕРИОД ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНОЙ
И СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЫ РОСТА*

Проанализировано развитие автотрофной культуры *Chlamydomonas reinhardtii* cc-124. Построена регрессионная модель изменения клеточной плотности на основе логистической функции. Методом ГХ-МС получены метаболитные профили. Методом МПК (РСА) показана связь метаболома с фазой роста культуры — временным интервалом после посева. Методом ОПЛС (OPLS) проведено последовательное попарное сравнение метаболомов, полученных через различные интервалы времени. Выявлено, что большая часть дисперсии содержания метаболитов в клетках связана со временем развития культуры. Анализ методом SUS-plots показал, что метаболитный профиль хламидомонады существенно меняется при переходе от первой половины экспоненциального роста ко второй и при переходе к стационарной фазе. Корреляционный анализ и картирование показали, что концентрации метаболитов демонстрируют сильные связи между собой и сгруппированы в 3 кластера. Библиогр. 33 назв. Ил. 5. Табл. 2.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, экспоненциальный рост, метаболомика, OPLS, РСА, стационарная фаза.

DYNAMICS OF AUTOTROPHIC *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* METABOLOME DURING
EXPONENTIAL AND STATIONARY PHASE

R. K. Puzanskiy, A. L. Shavarda, M. F. Shishova

St. Petersburg State University, 7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation; puzansky@yandex.ru, stachyopsis@gmail.com, mshishova@mail.ru

The growth of autotrophic culture of *Chlamydomonas reinhardtii* cc-124 was analyzed. Cell density shift was measured and regression model was developed on the basis of approximation by logistic function. For metabolomic analysis of *chlamydomonas* cells samples were collected at the different time points of culture growth and were analyzed with GC-MS techniques. PCA modeling of the obtained data revealed a correlation of the metabolome and the time of culturing. OPLS (point-by-point pair-wise) modeling of datasets was performed to estimate the links between the growth stage and *chlamydomonas* metabolome. It was found that the dispersion of metabolite content in cells was strongly related to the time point of cell culture development. SUS-plots visualization of developed models demonstrated

Р.К.Пузанский (puzansky@yandex.ru), А.Л.Шаварда (stachyopsis@gmail.com), М.Ф.Шишова (mshishova@mail.ru): Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9.

* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты № 12-04-01029, 13-04-00945 и 14-04-01795), Министерства образования и науки РФ (соглашение №8093 от 23.07.2012, проект 2012–1.2.1–12-000–1013-003), с использованием хроматографического оборудования ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

strong alteration of the metabolome profile during transition between the first part of exponential growth and the second and during the transition to stationary phase. Correlation analysis and mapping reveal that metabolites are interconnected and clustered in three groups. Refs 33. Figs 5. Tables 2.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, exponential growth, metabolomics, OPLS, PCA, stationary phase.

Введение

Развитие культуры клеток является удобной моделью для раскрытия механизмов фундаментальных биологических процессов, таких как регуляция пролиферации, метаболическая пластичность, регуляция экспрессии генов и адаптация. При этом рост культур микроводорослей не так подробно исследован по сравнению с бактериями и дрожжами. Известно, что он подчиняется общей закономерности роста культур микроорганизмов и подразделяется на три этапа. Первый — лаг-фаза, в течение которой происходит адаптация к изменившимся условиям окружающей среды и подготовка к экспоненциальному росту. Во время лаг-фазы осуществляется репарация повреждений, накопленных за время предыдущего цикла развития, или полученных в результате пересева. Этот процесс проявляется в изменениях метаболической активности и профиля экспрессии генов [1]. Следующий этап — фаза экспоненциального роста. Она характеризуется активной клеточной пролиферацией и накоплением биомассы. На этом этапе концентрации многих белков и метаболитов претерпевают значительные изменения. Например, метаболиты, связанные с циклом трикарбоновых кислот, имеют более высокую концентрацию в конце фазы роста по сравнению с ранней экспоненциальной или стационарной фазами [2]. Последний этап в развитии культуры клеток — стационарный, в ходе которого клеточная плотность стабильна и пролиферация остановлена в результате исчерпания ресурсов и накопления побочных продуктов метаболизма. Но, это не означает, что клетки метаболически малоактивны. Для адаптации клеток к новым, в данном случае неблагоприятным условиям требуется активация разнообразных физиологических и биохимических процессов [3–5].

Таким образом, развитие культуры микроводорослей представляет собой сложный многоступенчатый процесс, а характер метаболических перестроек во время перехода от одной фазы культурального цикла к другой остается не вполне ясным. Для их расшифровки целесообразно использовать в качестве модельного объекта зеленую микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii*. Хламидомонада много лет продуктивно используется в биологических исследованиях. Накоплены многочисленные данные об адаптации хламидомонады к изменению минерального питания [6, 7] и действию стрессовых факторов [8, 9]. Поскольку *C. reinhardtii* является оксигенным фототрофом, ее используют для расшифровки структуры и регуляции фотоассимиляционного аппарата [10, 11]. Цитологические исследования хламидомонады раскрывают детали организации цитоскелета [12–14] и клеточной оболочки [15–17]. Методы генетической трансформации и обширные коллекции линий (описание доступны по адресу www.chlamy.org) в сочетании с секвенированным геномом позволяют изучать молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе происходящих в клетке хламидомонады процессов, а также широкого биотехнологического использования этой водоросли.

Не так давно родилась новая дисциплина — системная биология, позволяющая рассматривать процессы, происходящие в организме на новом, прежде недоступном по масштабу уровне. Одной из составляющих этой дисциплины является метаболомика, основанная на методическом подходе, позволяющем максимально полно описать весь спектр метаболитов клетки [18]. Данные исследования стали возможны благодаря появлению современных физико-химических аналитических методов, таких как хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией, позволяющая анализировать сотни метаболитов в одном экстракте. Тем самым становится возможным комплексное сравнение метаболомов, а не анализ изменения концентрации отдельных метаболитов. Основу математической базы моделирования динамики метаболомов составляют методы мультивариантной статистики, такие как метод главных компонент (Principal Component Analysis, PCA) и проекций на латентные структуры (Projections on the Latent Structures, PLS и Orthogonal PLS, OPLS) [19]. Они позволяют сравнивать метаболомные матрицы, выявлять факторы, определяющие динамику концентраций метаболитов, идентифицировать биохимические маркеры состояния системы, анализировать динамику метаболитного профиля [20, 21]. Совокупность перечисленных методических подходов может позволить охарактеризовать метаболомические изменения, которые сопровождают или в ряде случаев инициируют изменение физиологического статуса клетки.

В связи с экологической и биотехнологической значимостью хламидомонады приоритетным становится метаболомный анализ клеток *C. reinhardtii*. Исследования, анализирующие динамику метаболомов в ходе развития культуры хламидомонады, фрагментарны. Они посвящены в первую очередь изменениям, происходящим в ответ на действие стрессовых факторов, таких как низкая концентрация CO₂ [22], аноксия [23], действие тяжелых металлов [24] и т. д. Другое направление исследований метаболизма хламидомонады представляет собой анализ динамики концентраций лишь характерных метаболитов. К их числу, например, можно отнести оценку динамики синтеза липидов в процессе роста культуры клеток хламидомонады [25]. Данные о связи времени развития культуры и состояния метаболома в литературе ограничиваются лишь единичными результатами, как правило, не связанными с основной темой исследования [2, 26].

Таким образом, существует необходимость системного биологического исследования клеток хламидомонады в ходе развития культуры, при автотрофном питании и отсутствии экзогенных стрессовых факторов. По этой причине данное исследование нацелено на анализ роста культуры *Chlamydomonas reinhardtii*, включая определение динамики клеточной плотности, а также на сравнение метаболомов клеток на различных этапах развития суспензионной культуры. Впервые для анализа метаболомических сдвигов в ходе развития автотрофной культуры хламидомонады будут применены методы метаболомного профайлинга и мультивариантной статистики.

Материалы и методы

Культивирование. Культура *Chlamydomonas reinhardtii* штамм cc-124 была получена из коллекции кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета. Культуру поддерживали аксенично при автотрофных условиях на жидкой среде ТМ (Tris Minimal), являющейся

безацетатной модификацией среды TAP (Tris Acetate Phosphate) (<http://chlamy.org/TAP.html>) [27]. Для выращивания использовали конические колбы объемом 500 мл, содержащие 250 мл среды. Культуры встряхивали вручную раз в сутки. Пересев производили раз в месяц, для этого в 250 мл среды вводили 2 мл культуры стационарной фазы развития плотностью $8 \cdot 10^6$ клеток/мл. Освещение осуществляли люминесцентными лампами холодного свечения интенсивностью 3000 лк. Клеточную плотность культуры определяли подсчетом клеток в камере Горяева.

Метаболомный анализ. Фиксация. Пробы отбирали на 6, 8, 9, 13, 15, 18, 20, 23, 27-е сутки после пересева. Суспензионную культуру, содержащую около 10^7 – 10^8 клеток *C. reinhardtii*, впрыскивали в охлажденный в жидком азоте 70%-ный раствор метанола. Далее клетки осаждали 2 мин в охлажденной до -5°C центрифуге при 10 000 g. Осадок замораживался в жидком азоте.

Экстракция. Осадок переносили в предварительно охлажденную ступку и растирали в 2 мл экстракционной холодной смеси, включающей метанол, хлороформ и воду в соотношении 10:3:1 [6]. При экстракции в пробу добавляли внутренний стандарт [28] — 10 мкл раствора трикозана (нормальный углеводород $\text{C}_{23}\text{H}_{48}$) в концентрации 1 мг/мл. Далее экстракт очищали от остатков клеток центрифугированием в охлажденной центрифуге при 12 000 g 10 мин. Супернатант отбирали и выпаривали в вакуумном испарителе.

Силилирование. Сухой остаток растворяли в 40 мкл пиридина. Силилирование проводили, прибавляя 40 мкл N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, BSTFA) с добавлением 1% триметилхлорсилана (Trimethylchlorosilane, TMCS), далее инкубировали 15 мин в термоблоке при 100°C .

Газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией. Для анализа использовали оборудование ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» производства Agilent Technologies, Inc (США): газовый хроматограф Agilent 6850 с масс-селективным детектором Agilent 5975С. Разделение проводили на капиллярной колонке J&W HP-5MS (5% дифенила, 95% диметилполиоксана, длина — 30 м, диаметр — 0,25 мм, толщина пленки неподвижной фазы 0,1 мкм). Газ-носитель — гелий, скорость потока 1 мл/мин, температура испарителя — 340°C при отношении деления потока 1:20, температурный режим термоста-та колонки: начальная температура 70°C , после начала хроматографирования сразу начинается линейное повышение температуры со скоростью $6^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 340°C . Регистрацию хроматограммы проводили в режиме записи полного ионного тока с частотой 2,5 скана в секунду. Ионизацию электронным ударом осуществляли при 70 В с температурой источника ионов 230°C . Запись хроматограммы начинали через 3 мин, необходимые для выхода растворителя, и продолжали 42 мин.

Идентификация метаболитов. Соединения идентифицировали по их масс-спектру и индексу удерживания (RI) с применением программы Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS, National Institute of Standards and Technology, США, <http://www.amdis.net>). Масс-спектр считали определенным при совпадении с библиотечным вариантом с индексом соответствия не менее 80. В ходе работы использовали библиотеки: NIST2010 (National Institute of Standards and Technology, США, <http://www.nist.gov>), Golm Metabolome Database (GMD, Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Германия, <http://gmd.mpimp-golm.mpg.de>), а также коллекции масс-спектров стандартных соединений Санкт-Петербургского уни-

верситета и Ботанического Института РАН. Кроме того, был использован онлайн-сервис обработки масс-спектрометрических данных «MassBank» (www.massbank.jp). Определение индексов удерживания проводили с использованием калибровки по стандартным предельным углеводородам. Количественную интерпретацию метаболитного профиля осуществляли по площадям пиков полного ионного тока методом внутреннего стандарта с помощью программы UniChrom (ООО «Новые Аналитические Системы», Беларусь, www.unichrom.com) без учета коэффициентов чувствительности. Далее количество метаболитов определяли в расчете на клетку.

Статистическая обработка. Анализ динамики клеточной плотности и регрессионный анализ проводили с помощью языка программирования для статистической обработки R 3.1.0 Spring Dance (The R Foundation for Statistical Computing Platform, США). Эксперименты осуществляли в четырех биологических повторностях. Мультивариантный анализ данных метаболомики проводили с использованием программы SIMCA-P + 13,0 (Umetrics, Швеция). Первоначально выявление структуры данных и исключение выпадающих значений были выполнены методом главных компонент. Для устранения выпадающих наблюдений были использованы тесты Hotelling и DModX. Далее находили доли вариации данных, относящейся к действию исследуемого фактора. Для этой цели использовали метод Orthogonal Partial Least Square (OPLS) [20, 21, 29].

Картирование метаболитов. Метаболиты картировали по корреляционным связям их концентраций. Для этого с помощью функции `cor` языка R 3.1.0 рассчитывали матрицу коэффициентов корреляции. Из результатов исключали пары с коэффициентом менее 0,8. Таблицу импортировали в программу построения графов Cytoscape (<http://cytoscape.org>). Сеть визуализировали, используя способ построения `organic layout` [30].

Результаты и обсуждение

Для развития культуры хламидомонады характерна нелинейная динамика роста клеточной плотности, описываемая уравнением

$$y = \frac{8,3}{1 + 10^{1,80 - 0,186x}},$$

где y — клеточная плотность, млн клеток/мл; x — время после посева, сутки (рис. 1). Данное уравнение было получено в результате регрессионного моделирования на основе логистической функции.

В начальный период после посева скорость роста невысока, что свидетельствует о наличии лаг-фазы. Она постепенно переходит в стадию экспоненциального роста, которая завершается последовательным снижением скорости роста клеточной плотности и переходом в стационарную фазу. Таким образом, культура хламидомонады демонстрирует динамику роста, сходную с описанной для других одноклеточных водорослей и бактерий [30].

Провести интегральный анализ различий метаболических систем и выявить механизмы их регуляции в процессе развития культуры можно с помощью методов метаболомики и последующего мультивариантного статистического анализа. Исполь-

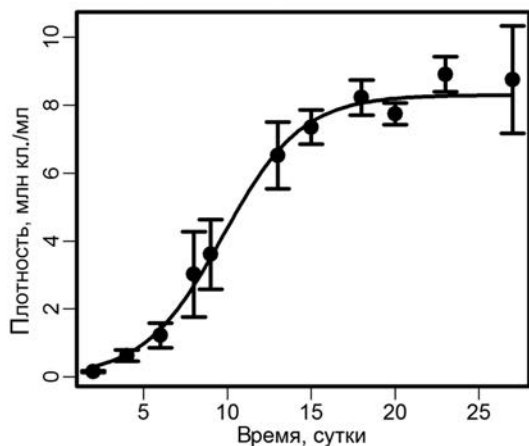


Рис. 1. Клеточная плотность (точки, интервалы — стандартные отклонения) и график логистической функции, к которой аппроксимирована ее динамика

данных информацию об изменениях метаболома в ходе развития культуры мы провели анализ методами мультивариантной статистики, которые позволяют оценить сходство метаболитных профилей и выявить компоненты, определяющие динамику концентраций метаболитов и идентифицировать характеристики, статистически связанные с состоянием системы [20, 21]. Метод главных компонент позволяет выявить как структуру полученных данных, так и выпадающие наблюдения. Полученная этим методом модель содержит 4 главные компоненты и объясняет 72% дисперсии. График матриц счетов (рис. 2) в пространстве главных компонент позволяет судить о сходстве и различиях метаболитных профилей по их расположению в пространстве. Можно видеть, что образцы группируются в зависимости от времени развития культуры. Это указывает на наличие существенной связи между временем (этапом) развития культуры и характером метаболитного спектра. Также нужно отметить, что на графике матрицы счетов первой и второй главных компонент (рис. 2, а) наблюдения, сделанные с 6-го по 13-й день, очень сильно различаются и удалены от более плотной группы наблюдений сделанных с 15-х по 27-е сутки. Согласно анализу динамики клеточной плотности на 15-е сутки начинается завершение роста и переход к стационарной фазе. Следовательно, можно сделать заключение, что в период роста метаболом изменяется наиболее динамично, а при прекращении роста — стабилизируется. Тем не менее рассмотрение графика счетов в пространстве второй и третьей главных компонент позволяет увидеть, что метаболитные профили клеток, отобранных после завершения роста культуры, различаются в зависимости от времени, что позволяет констатировать продолжение метаболомной динамики, пусть и в меньших масштабах.

Для выяснения доли вариабельности содержания клетками метаболитов, связанной с развитием культуры, было проведено OPLS моделирование (M0) (рис. 3). Полученная модель содержит одну предиктивную и 3 ортогональные компоненты, объясняющие 64,9% вариации концентрации метаболитов. Предиктивная компонента, отражающая влияние времени развития культуры, объясняет 18,9%

званные нами способы фиксации, экстракции и хроматографического анализа позволяют выявить на одной хроматограмме до четырехсот пиков, соответствующих отдельным химическим соединениям. При помощи доступных баз масс-спектрометрических данных нам удалось идентифицировать около 100 из них, в том числе жирные кислоты, сахара, аминокислоты, карбоновые кислоты, амиды и амины, спирты, терпены, фенольные соединения.

Содержание большей части метаболитов в расчете на клетку демонстрирует сильную и разнонаправленную нелинейную и немонокотонную динамику. Чтобы извлечь из полученных

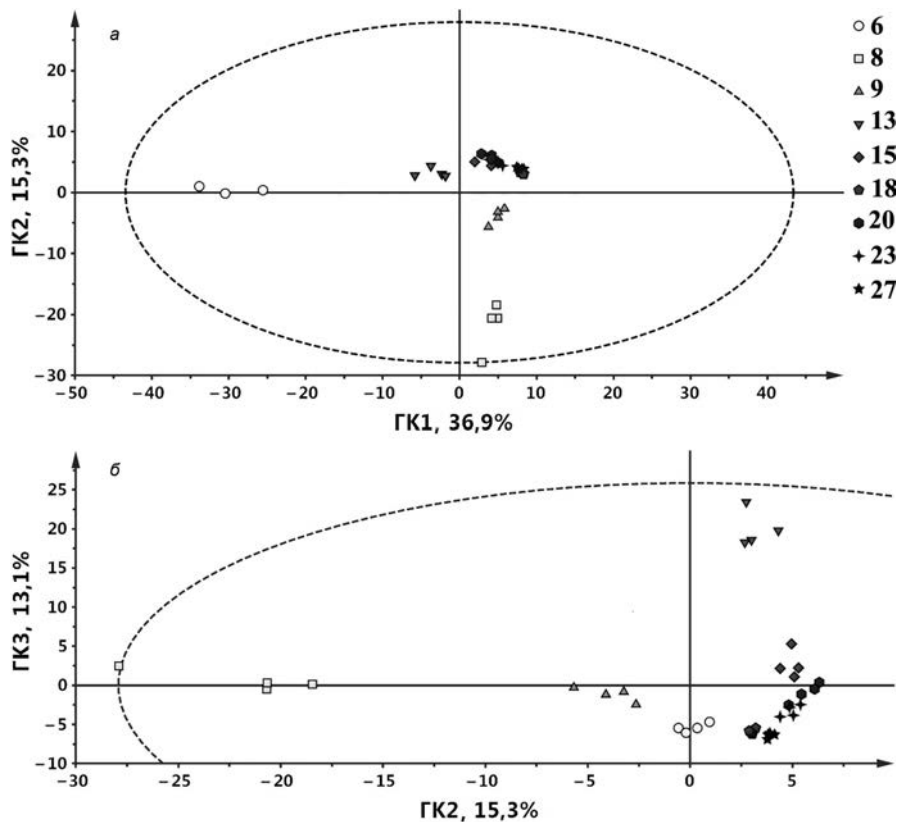


Рис. 2. Графики матрицы счетов в пространстве первой и второй (а), и второй и третьей (б) главных компонент (ГК), полученный в результате анализа метаболомных данных методом главных компонент, время развития культуры (сутки) обозначено различными символами. Пунктир ограничивает область теста Хотеллинга

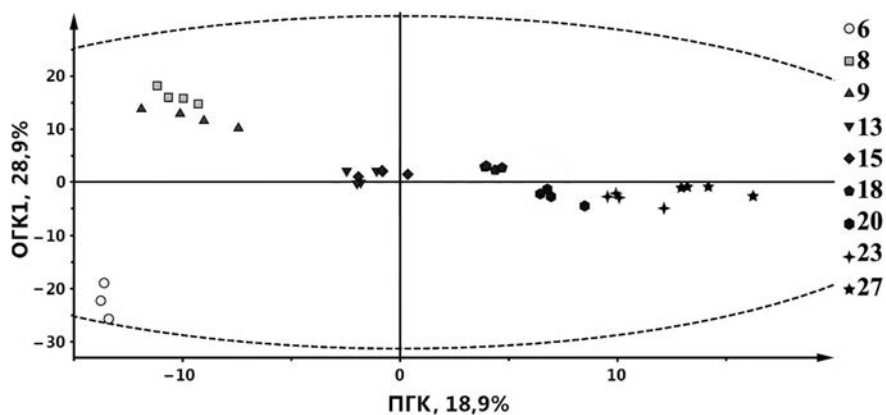


Рис. 3. График матриц счетов OPLS модели в пространстве предиктивной (ПГК) и первой ортогональной (ОГК1) главных компонент. Пунктир ограничивает область теста Хотеллинга

дисперсии концентрации метаболитов. Остальная доля объясненной дисперсии связана с тремя ортогональными компонентами (28,8; 9,2; 8%). Для того чтобы определить, какие именно метаболиты наибольшим образом связаны с предиктивной компонентой, рассмотрим табл. 1, содержащую значения факторных нагрузок с доверительными интервалами, полученными методом «складного ножа» (jackknife) [31]. Большая часть метаболитов имеет отрицательные нагрузки, что указывает на то, что содержание метаболитов в клетках преимущественно снижается в период экспоненциального роста и стационарной фазы. Тем не менее некоторые метаболиты демонстрируют положительную динамику или их факторные нагрузки близки к нулю — в основном это пентозы. Данное наблюдение, в сочетании с высокими отрицательными факторными нагрузками гексоз и олигосахаридов, может свидетельствовать о значительном уровне окисления продуктов фотоассимиляции в пентозо-фосфатном пути.

Таблица 1. Значения факторных нагрузок предиктивных компонент (значения умножены на 100)

Компоненты	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Сахара</i>									
гексоза 18.07*	-4,98	5,15	-5,67		-6,21			-6,76	-6
гексоза 18.20	-4,59	5,52	-6,13	-4,71	-6,52				
гексоза 18.83	-4,52	5,38	-5,98	-5,98			-4,28		
гексоза 18.98	-7,61	-5,01	-6,04		-5,03			7,11	-6,21
гексоза 19.46	-5,87	5,27	-4,28	-5,88	-5,88			5,32	-4,79
гексоза 20.43	-6,78	5,46		-5,85	-6,04				-5,81
гексоза 22.30	-5,31	-5,31	-5,75			5,24			
гексоза 23.32		5,7	6,01	5,52	-5,9			-6,02	-5,08
гексоза 25.93	-6,83	-4,82	-4,98		-6,06			7,43	-6,35
глюкоза	-6,04	5,23	-4,2	-5,91	-6,5			5,6	
глюконат-1-5- лактон	-9,37		-4,87		-5,49				-5,99
дигидроксиацетон	-4,29	-5,74	-6,01		-6,21	-6,3	6,6		5,45
мальтоза	-5,41	5,34	-5,48	-5,02	-6,15		6,39	7,08	-6,17
олигосахарид 30.37	-5,54	5,59	-5,65	-5,52	-6,15	5,05	4,59		-6,02
олигосахарид 31.30	-6,92	4,71	-5,82	5,13	-6,12				-5,96
олигосахарид 31.47	-5,81	4,56	-5,6	5,98	-6,58	-3,81	-3,84		-3,17
олигосахарид 32.20		4,95	-5,4	5,31	-3,37	-5,95	6,17	6,56	-6,26
олигосахарид 32.35	-8,07		-5,75	4,78	-6,03	-6,16	6,61	6,61	-5,73
олигосахарид 32.68	-5,91	-5,07		5,4	-6,1				-5,72
олигосахарид 32.74	-6,77	-4,71	-4,18	4,35	-5,15		-4,48	4,72	-6,02

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
олигосахарид 33.96	-5,64	-4,92	-5,67	5,14	-5,47				-6,09
олигосахарид 34.61	-5,34	-5,36		5,68	-6,21	5,05			-5,94
пентоза 14.99		-5,12	-6,09	4,73				4,94	-5,95
пентоза 15.25		-5,2	-5,12	4,55					-4,9
пентоза 15.44	3,75	-4,68	-5,73			5,61			-4,35
сахароза	-5,78	4,48			-5,24			5,98	
<i>Жирные кислоты и липиды</i>									
амид Ж. К. 18:1 Δ9	-5,57	-5,29	6,09		-4,3	-5,14	5,81		-5,49
ДАГ[16:0/0:0/16:0]	5,11	-4,12		5,8	-5,79		6,27	5,44	-5,24
ДАГ[16:0/16:0/0:0]		-4,95	5,06	5,68	-5,96	-5,28	6,27	5,3	-6,04
Ж. К. 12:0	-5,44	-5,24	-6,22	5,46		-5,71	6,31	-7,22	6,25
Ж. К. 14:0	-6,13	-5,3	6,09	-5,47	-5,18	-6,4	5,82	-4,73	-5,18
Ж. К. 15:0	-6,82	5,21	-6,06	4,79	-6,18	-6,28	6,27		-5,86
Ж. К. 16:0		-5,23	6,05	5,28	-4,57	-5,65	6,06		-6,09
Ж. К. 16:1 Δ9	-5,49	-4,92	-6,2	5,73	-6,04	-6,17	5,53		-6,21
Ж. К. 17:0	-6,61	-5,51		5,98	-6,45	6,15	5,58	6,64	-5,21
Ж. К. 18:0	-5,21	-5,57	-5,96	5,68	-5,54	-6,05	6,15		-5,48
Ж. К. 18:1 Δ11	-3,66	-5,3	6,15	5,56	-5,64	-6,5	6,31		-6,26
Ж. К. 18:2 Δ9, 12	-3,42	-5,41	-6,05	5,77	-4,34	-6,28	6,63	-7,29	-6,38
Ж. К. 18:3 Δ6, 9, 12	-2,44	-5,29	-6,11	5,79	-5,65	-6,31	6,28		-6,15
Ж. К. 20:0	-5,62	-5,6		5,64	-6,07	-6,35	6,26		-6,19
Ж. К. 22:0	-7,03				-5,1				
Ж. К. 24:0	-5,62	4,78	-5,6		-5,68	-6,14			
Ж. К. 9:0	-4,73	-5,41	-4,77	5,39	-5,18	-4,69	4,78		-4,75
Ж. К. 13:0	-5,62	-5,78	-3,99	5,77	-6,31	-6,33	6,68	5,36	-6,35
МАГ [16:0/0:0/0:0]		-4,01	5,8	4,81	-6,55			6,44	-5,15
МАГ[0:0/16:0/0:0]	-3,2			2,54	-5,94			6,69	-5,66
МАГ[18:0/0:0/0:0]	-5,09	-4,36	-5,24		-5,04		5,61	6,77	-5,43
Мет-ЖК 18:3	-7,91	-5,46	5,93	-4,39		-6,41	-6,7	-7,53	6,32
холестерол	-6,14	-4,43	-6,1	5,64	-6,37	4,81		-5,6	-4,48
эргостерол	-4,23	-4,83		5,98	-6,21	-5,87			-6,4
<i>Аминокислоты</i>									
аланин	-6,65	-3,72	6,09	-5,21	-6,51	-6,47		4,45	
валин	-4,18	-5,58	-5,59			6,45	6,26	-7,53	-5,76

Продолжение табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
глицин	-3,88	-4,77	-5,73	5,19	-5,94		6,75	-7,67	-6,62
глутамат	-5,83		-5,61	5,49	-4,32	-5,71	5,52		-5,33
лейцин	-6,72	5,57	-6,58	-5,7					
оксипролин	-6,31	-3,95	-5,19	5,51	-5,33	-5,03	-4,96	-4,93	4,86
серин	-4,64	-5,56		4,77	-5,78				
треонин	-4,39	-5,6		6,22	4,59	-6	4,8	-6,43	6,24
фенилаланин	-5,43	-5,47		5,32	-4,35	-3,48	-3,77		
<i>Карбоновые кислоты</i>									
бензоат	-4,88	-4,76	-5,52	-5,32			6,17		-5,03
2-гидроксипропионат	-3,12		-4,67		-5,01				
3-гидроксивалерат	-3,1	-5,77		-5,99	6,25		5,44	7,17	-6,37
3-гидроксипропионат		5,18		-5,03	4,93	-5,02	5,35		-5,16
глиоксилат	-4,86	-5,46		-5,7	6,16	6,11	-6,22	5,71	-5,93
лактат	-5,55	-5,16		5,12	-5,02	-6,43	6,09		3,46
малат		-4,7		5,46	-5,15	-4,47	4,4		
метилсукцинат	-5,47	-5,8	-6,54	6,18	6,39	-6,39		7,44	-6,41
никотинат	-3,31	-5,29	-6,48		6,21	-6,06	6,37	-6,27	5,97
пируват	-5,15	-5,7		4,54	4,37	-5,44	4,97		-5,39
сукцинат	-6,62	-4,59	-5,71	4,77	-4,59				
фталат	-4,94	-5,08	4,72	5,2	-4,3				-4,59
фумарат	-5,24	-5,49		5,33		-6,15	-6,33	-7,27	-4,84
<i>Спирты</i>									
α-токоферол	-3,37	-4,88	6,06	5,36	-5,38	-6,04			6,47
бензиловый спирт	-4,38	-4,49	-4,82	5,21	-5,62		4,49		-5,09
бутилглицоль		-4,21		5,81	-5,66	-4,16	5,16		
гидрохинон		5,5		5,99	-6,43			6,53	-6,31
миоинозитол	-4,67	-5,03	-6,43	5,94		-5,89	5,82		-5,9
пирагаллол		5,8		6,06	-6,33				
сорбитол			5,87	5,11	-5,79	-6,51	5,72	6,9	
спирт 14:0	-5,15	-5,1				-4,43	5,4	-7,03	6,16
спирт 16:0	-3,37	-5,1	-6,04	5,76	-6,23				
спирт 18:0	-6,55	-5,35	6,14	-5,84			6,27	6,87	-6,09
фенол	-4,46	5,61	-6,34	5,95	-6,37	-6,26	6,27	-6,32	5,23

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
фитол	-5,63	-5,59	6,2	-5,05		-4,17		-6,29	-5,99
эритритол	-2,51	-5,64	-6,29	5,31	-6,12	5,96			-6,22
<i>Глицерин и его производные</i>									
глицерат	-4,03	-5,22	5,71			-4,95			-5,71
глицерин	-5,76	5,21		-5	-6,58			-5,27	5,89
глицерин-2-фосфат	-6,03	-4,93	-6,2	5,55	-5,37				-6,29
глицерин-3-фосфат		-4,94	4,8	5,73	-5,72	-3,72	-3,81	-6,42	
<i>Азотосодержащие соединения</i>									
2-гидропиридин	-5,84	-4,93				-5,11			-4,76
3-гидропиридин	-6,03	-5,53		4,56		-6,18	5,06		-4,94
мочевина	-5,27	-5,27			6,14	-6,01			6,26
путресцин	6,09	5,83	-6,5	5,19				-5,35	
этаноламин	-5,13	-5,09	-6,18	5,63	5,66	-6,27	5,21	-6,42	
<i>Терпены</i>									
неофитодиен	-3,78	-5,21	-5,58	6,07	-6,15			-6,97	-6,41
сквален	-9,13	-4,48	5,71	-5,8	-4,31	-4,94	4,43	-5,63	
терпен 18.34	-5,24			6,11	-6,13			-5,37	
терпен 18.63	-7,56		-5,81		-5,94			-6,51	-6,05

Примечание. * — некоторые углеводы были определены только до класса, в таких случаях указан класс (пентозы, гексозы, олигосахариды и время выхода в минутах); МАГ — моноацилглицерол, ДАГ — диацилглицерол, в квадратных скобках — присоединенные жирные кислоты; Ж.К. — жирная кислота; Мет-ЖК — метиловый эфир жирной кислоты. Показаны только достоверные значения, чьи 95%-ные доверительные интервалы не включают 0.

Невысокая доля объясненной дисперсии может определяться тем, что метод OPLS основан на выявлении линейных зависимостей между предиктивной компонентой и концентрациями метаболитов. Поэтому в данном случае, когда содержание большей части метаболитов в клетках меняется нелинейно, целесообразно последовательно сравнить метаболомы, идентифицированные на разных временных точках роста культуры. В работе проведено сравнение метаболомов, полученных на 6-е и 8-е (модель М1), 8-е и 9-е (М2), 9-е и 13-е (М3), 13-е и 15-е (М4), 15-е и 18-е (М5), 18-е и 20-е (М6), 20-е и 23-е (М7), 23-е и 27-е (М8) сутки роста культуры. Данные моделирования представлены в таблице 2 (данные объясненной дисперсии) и в таблице 1 (значения нагрузок предиктивной компоненты). Доля дисперсии концентрации метаболитов, объясненная предиктивной компонентой, варьирует от 44 до 66,8% и в среднем составляет 58,7%. Таким образом, наибольшая доля влияния на дисперсию содержания метаболитов в клетках принадлежит времени развития культуры. Она максимальна для модели М1, относящейся к началу роста, и минимальна — в начале стационарной фазы.

Таблица 2. Параметры OPLS моделей

Модель	Объясненная дисперсия, %	Дисперсия, связанная с компонентами, %			
		с предиктивной	с ортогональными		
			с 1-й	со 2-й	с 3-й
M0	64,9	18,9	28,8	9,2	8
M1	85,9	66,8	10,9	4,6	3,6
M2	65,1	54,1	11	–	–
M3	70	62,2	7,8	–	–
M4	71,8	58,4	13,4	–	–
M5	78,1	63,3	14,8	–	–
M6	86,4	61,2	13,1	6,5	5,6
M7	72,6	44	19,5	9,1	
M8	82,8	59,9	14	8,9	

Для определения связи временной точки этапа роста культуры с вариациями концентраций метаболитов рассмотрим факторные нагрузки предиктивной компоненты, представленные в табл. 1. В моделях M1 и M2, относящихся к первой половине роста культуры, большая часть метаболитов имеет отрицательные факторные нагрузки. Положительными нагрузками обладает небольшое количество метаболитов. При этом основную часть соединений с положительными нагрузками в модели M1 составляют углеводы, а в модели M2 — липиды. Такая картина может свидетельствовать о расходовании ресурсов клетки, накопленных в ходе лаг-фазы, для обеспечения интенсивной пролиферации, с целью максимального использования сложившихся благоприятных условий среды. При этом углеводный и липидный обмен периодически активируются для поддержания достаточной интенсивности пролиферации.

Модель M3, в которой сравниваются метаболомы, охарактеризованные на 9-й и 13-й день развития культуры, кардинально отличается: большая часть метаболитов, включая жирные кислоты, аминокислоты, интермедиаты энергетических циклов и углеводы, обладает положительными факторными нагрузками предиктивной компоненты. Данная закономерность, возможно, обусловлена активацией синтетических процессов, необходимых для поддержания высокой скорости роста в сочетании с исчерпанием накопленных запасов.

Модели M4 и M5, описывающие завершение фазы экспоненциального роста, характеризуются тем, что большая часть метаболитов обладает отрицательными факторными нагрузками. В этот период интенсивность ассимиляции заметно снижена и, видимо, происходит расходование метаболитов, синтезированных в предыдущий отрезок времени. Тем не менее ряд сахаров и липидов демонстрируют положительные факторные нагрузки, что свидетельствует о поддержании, по крайней мере, части синтетических процессов на высоком уровне. В модели M6 снова большинство концентраций метаболитов характеризуется положительными факторными нагрузками. Это можно объяснить все еще высоким уровнем синтетических процессов на фоне быстрого торможения пролиферации. В этот период происходит накопление липидов, что согласуется с литературными данными. Недавно была предпринята попытка выделить дополнительную фазу развития культуры хламидомонады — фазу накопле-

ния липидов (LAP). Было доказано, что этот процесс наиболее интенсивно протекает в стационарной фазе и сопровождается значительными изменениями экспрессии генов [25]. В дальнейшем количество соединений с положительными факторными нагрузками снижается сначала до половины (M7), а затем и до одной шестой (M8). Характерной чертой завершающих этапов развития культуры являются высокие положительные факторные нагрузки лактата, что может являться признаком брожения, вызванного высокой плотностью культуры и, как следствие, дефицитом кислорода.

Для того чтобы визуализировать направленность изменений концентрации метаболитов при переходах суспензионной культурой от одной фазы развития к другой, был построен график общих и частных параметров (SUS-plot, SUS — Shared and Unique Structures). Он позволяет визуализировать общие и частные черты моделей путем построения графика в пространстве нагрузок их предиктивных компонент. На рис. 4 представлены графики SUS-plots, полученные из сравнения моделей M2 и M3 (переход от первой половины фазы экспоненциального роста ко второй), а также M5 и M6 (переход к стационарной фазе). Вдоль диагонали, выходящей из нижнего левого угла, расположены метаболиты, концентрации которых ведут себя сходным образом в обеих сравниваемых моделях и наоборот. Данный метод демонстрирует резкие различия динамики метаболизма при переходе от первой ко второй половине фазы экспоненциального роста культуры и от роста к стационарному состоянию.

Существенное изменение состояния метаболома в процессе развития культуры может свидетельствовать о том, что классическая схема, разделяющая на три этапа развитие клеточных культур исключительно по динамике биомассы, может не полно отражать весь спектр происходящих физиологических изменений.

Таким образом, наблюдается сильная и разнонаправленная динамика изменения метаболомов в процессе развития культуры. Чтобы выявить функционально связанные метаболитные блоки мы провели корреляционный и кластерный анализ. На рис. 5 представлен результат картирования идентифицированных метаболитов на основе корреляции их концентраций. Карта представляет собой граф, узлам которого соответствуют метаболиты, а ребрам — корреляция со значением коэффициента Пирсона более 0,8. Оказалось, что динамика метаболитов в клетках хламидомонады в процессе роста сильно синхронизирована. Большая часть метаболитов сосредоточена в одном большом корреляционном кластере (рис. 5, I). Он включает соединения с различной химической структурой и функциями. Синхронизация процессов синтеза и диссимиляция может быть одним из механизмов, обеспечивающих высокую эффективность утилизации питательных веществ и быстрый рост биомассы. Выявлены еще два кластера меньшего размера. Один кластер состоит преимущественно из углеводов: гексоз и дисахаридов (рис. 5, II). Мальтоза является продуктом распада крахмала и формой, в которой углерод транспортируется из хлоропласта в цитозоль [32]. Кроме того, в синтез и катаболизм полисахаридов вовлечены и другие дисахариды и гексозы [33]. Исходя из этого, можно предположить, что данный метаболитный блок отвечает за регуляцию баланса депонирования и диссимиляции углеводов. Другой корреляционный кластер объединяет преимущественно липофильные соединения, такие как ненасыщенные жирные кислоты, стеролы и терпены (рис. 5, III). Поскольку данные соединения играют важную роль в детерминации свойств мембран, и изменение их количества является важной составной частью разнообразных адаптивных ответов, надо полагать, что существование корегулируемого липидного

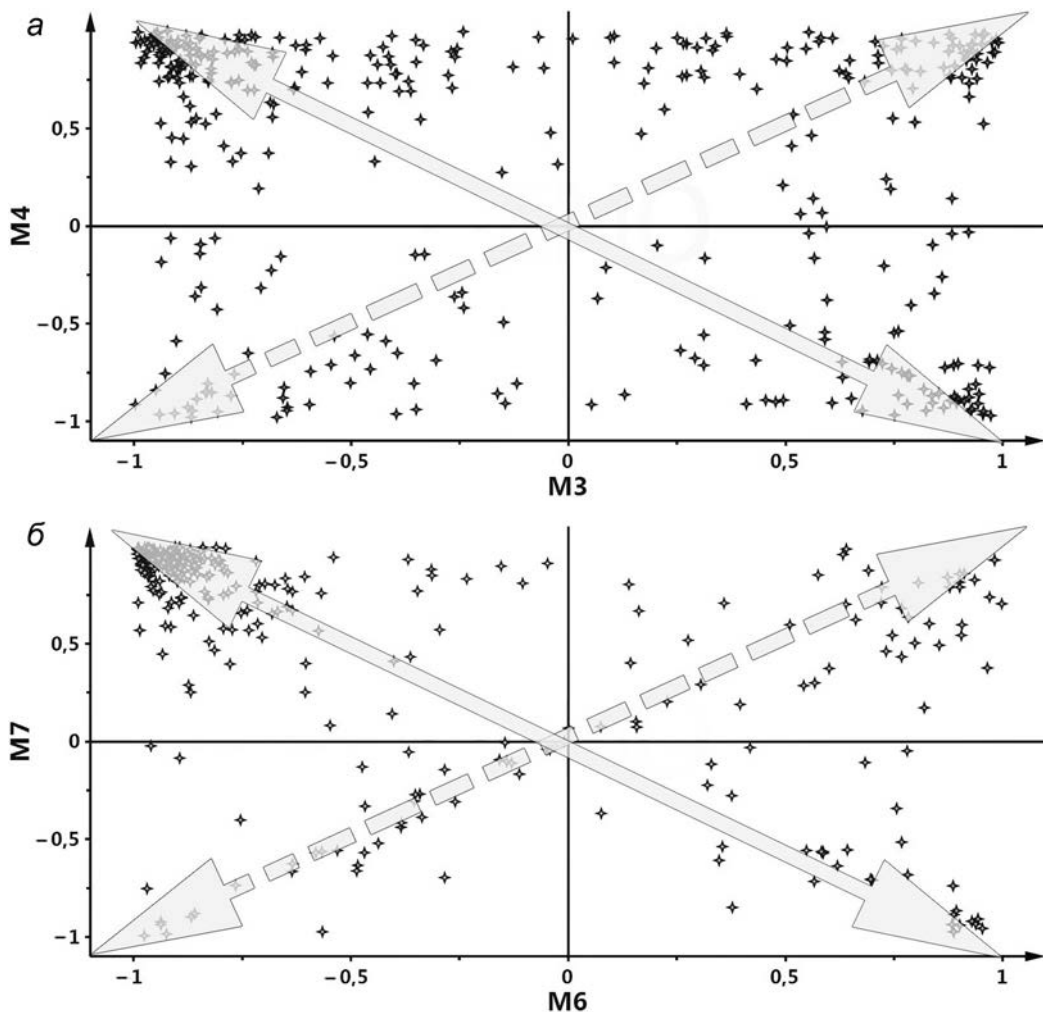


Рис. 4. Визуализация общих и частных параметров (SUS-plot) моделей M3 и M4 (а), а также моделей M6 и M7 (б)

Оси — значения факторной нагрузки предиктивных компонент в соответствующих моделях. Точкам соответствуют метаболиты. Соединения, расположенные вдоль пунктирной диагонали, имеют сходную динамику концентрации в обеих моделях, вдоль сплошной — противоположную.

кластера является механизмом оптимизации метаболизма хламидомонады в условиях развития культуры.

Таким образом, культура *C. reinhardtii* демонстрирует нелинейную динамику роста клеточной плотности, подчиняющуюся логистической функции. Использование методов математического мультивариантного моделирования показало, что метаболом хламидомонады непрерывно изменяется в ходе роста культуры, что соответствует изменению физиологического состояния клеток водоросли. Установлено, что динамика метаболитов координирована и метаболом организован в несколько корреляционных кластеров.

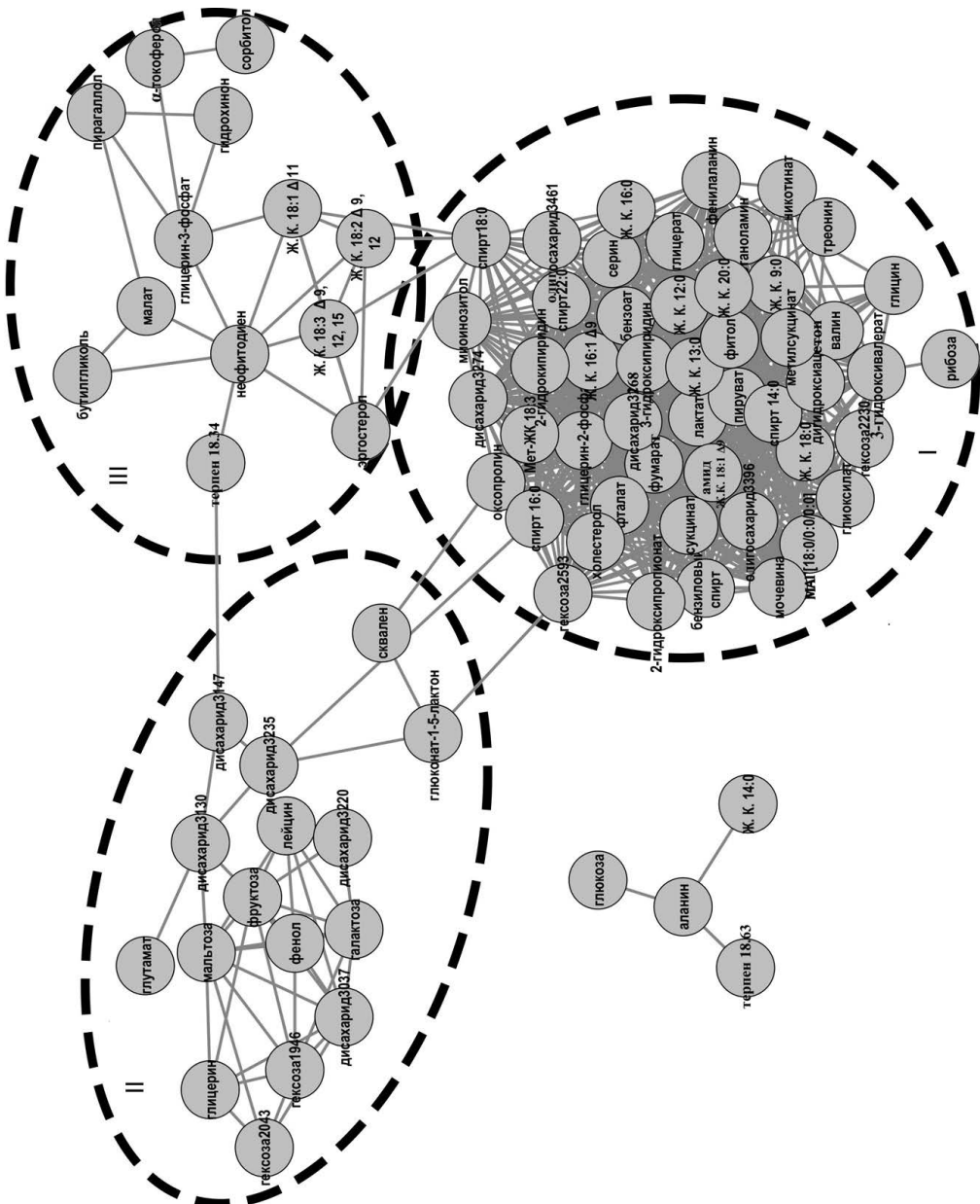


Рис. 5. Картирование метаболитов по корреляционным связям

Узлам соответствуют метаболиты, а ребрам — корреляционная связь со значением коэффициента Пирсона более 0,8. Обозначения соответствуют табл. 1. I, II и III — синхронизированные кластеры метаболитов (см. описание в тексте).

Литература

1. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation / Rolfe M.D., Rice C.J., Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A.D., Alston M., Stringer M.F., Betts R.P., Baranyi J., Peck M.W., Hinton J.C. // *J. Bacteriol.* 2012. Vol. 194, N 3. P.686–701.
2. Lee do Y., Park J.J., Barupal D.K., Fiehn O. System response of metabolic networks in *Chlamydomonas reinhardtii* to total available ammonium // *Mol. Cell Proteomics.* 2012. Vol. 11, N 10. P. 973–988.
3. Herman P.K. Stationary phase in yeast // *Curr. Opin. Microbiol.* 2002. Vol. 5, N 6. P.602–627.
4. Navarro L.J.M., Tormo A., Martínez-García E. Stationary phase in gram-negative bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. Vol. 34, N 4. P.476–495.
5. Berla B.M., Pakrasi H.B. Upregulation of plasmid genes during stationary phase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, a cyanobacterium // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. Vol. 78, N 15. P.5448–5451.
6. Boelling C., Fiehn O. Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation // *Plant Physiol.* 2005. Vol. 139, N 4. P.1995–2005.
7. Grossman A. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment // *Protist.* 2000. Vol. 151, N 3. P.201–224.
8. Dissecting the heat stress response in *Chlamydomonas* by pharmaceutical and RNAi approaches reveals conserved and novel aspects / Schmollinger S., Schulz-Raffelt M., Strenkert D., Veyel D., Vallon O., Schroda M. // *Mol. Plant.* 2013. Vol. 6, N 6. P.1795–1813.
9. Valledor L., Furuhashi T., Hanak A.M., Weckwerth W. Systemic cold stress adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Mol. Cell. Proteomics.* 2013. Vol. 12, N 8. P.2032–2047.
10. Grossman A.R., Lohr M., Im C.S. *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments // *Annu. Rev. Genet.* 2004. Vol. 38. P.119–173.
11. Rochaix J.D. *Chlamydomonas*, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 529, N 1. P.34–38.
12. Dutcher S.K. Elucidation of basal body and centriole functions in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Traffic.* 2003. Vol. 4, N 7. P.443–451.
13. Protein-protein interactions between intermediate chains and the docking complex of *Chlamydomonas* flagellar outer arm dynein / Ide T., Owa M., King S.M., Kamiya R., Wakabayashi K. // *FEBS Lett.* 2013. Vol. 587, N 14. P.2143–2149.
14. Lechtreck K.F. In vivo imaging of IFT in *Chlamydomonas* flagella // *Methods Enzymol.* 2013. Vol. 524. P.265–284.
15. Goodenough U.W., Heuser J.E. The *Chlamydomonas* cell wall and its constituent glycoproteins analyzed by the quick-freeze, deep-etch technique // *J. Cell Biol.* 1985. Vol. 101, N 4. P.1550–1568.
16. Imam S.H., Buchanan M.J., Shin H.C., Snell W.J. The *Chlamydomonas* cell wall: characterization of the wall framework // *J. Cell Biol.* 1985. Vol. 101, N 4. P.1599–1607.
17. Voigt J., Hinkelmann B., Harris E.H. Production of cell wall polypeptides by different cell wall mutants of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Microbiol. Res.* 1997. Vol. 152, N 2. P.189–198.
18. Fiehn O. Metabolomics — the link between genotypes and phenotypes // *Plant Mol. Biol.* 2002. Vol. 48, N 1–2. P.155–171.
19. Metabolomics of medicinal plants: the importance of multivariate analysis of analytical chemistry data / Okada T., Afendi F.M., Altaf U., Amin M., Takahashi H., Nakamura K., Kanaya S. // *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2010. Vol. 6, N 3. P.179–196.
20. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification / Bylesjö M., Rantalainen M., Cloarec O., Nicholson J.K., Holmes E., Trygg J. // *J. Chemometrics.* 2006. Vol. 20, N 8–10. P.341–351.
21. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models / Wiklund S., Johansson E., Sjöström L., Mellerowicz E.J., Edlund U., Shockcor J.P., Gottfries J., Moritz T., Trygg J. // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80, N 1. P.115–122.
22. Metabolomic approach to study major metabolite changes during acclimation to limiting CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii* / Renberg L., Johansson A.I., Shutova T., Stenlund H., Aksmann A., Raven J.A., Gardeström P., Moritz T., Samuelsson G.A. // *Plant Physiol.* 2010. Vol. 154, N 1. P.187–196.
23. Multiple facets of anoxic metabolism and hydrogen production in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* / Grossman A.R., Catalanotti C., Yang W., Dubini A., Magneschi L., Subramanian V., Posewitz M.C., Seibert M. // *New Phytol.* 2011. Vol. 190, N 2. P.279–288.
24. Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach / Jammers A., Blust R., De Coen W., Griffin J.L., Jones O.A. // *Biometals.* 2013. Vol. 26, N 5. P.731–740.

25. Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation / Lu H., Qu G., Qi X., Lu L., Tian C., Ma Y. // *Genomics* 2013. Vol. 101, N 4. P.229–237.
26. Lee D. Y., Fiehn O. High quality metabolomic data for *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Methods* 2008. Vol. 4, N 7.
27. Gorman D. S., Levine R. P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1965. Vol. 54, N 6. P.1665–1669.
28. Global profiling of ultraviolet-induced metabolic disruption in *Melissa officinalis* by using gas chromatography-mass spectrometry / Kim S., Yun E. J., Hossain M. A., Lee H., Kim K. H. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. Vol. 404, N 4. P.553–562.
29. Trygg J., Wold S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS) // *J. Chemom.* 2002. Vol. 16, N 3. P.119–128.
30. Lin J., Lee S.-M., Lee H.-J., Koo Y.-M. Modeling of typical microbial cell growth in batch culture // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2000. Vol. 5, N 5. P.382–385.
31. Efron B., Stein C. The jackknife estimate of variance // *The Annals of Statistics*. 1981. Vol. 9, N 3. P.586–596.
32. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves / Niittylä T., Messerli G., Trevisan M., Chen J., Smith A. M., Zeeman S. C. // *Science*. 2004. Vol. 303, N 2. P.87–89.
33. Johnson X., Alric J. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch // *Eukaryot Cell*. 2013. Vol. 12, N 6. P.776–93.

References

1. Rolfe M. D., Rice C. J., Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A. D., Alston M., Strinchairnameger M. F., Betts R. P., Baranyi J., Peck M. W., Hinton J. C. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *J. Bacteriol.* 2012, vol. 194, no. 3, pp.686–701.
2. Lee do Y., Park J. J., Barupal D. K., Fiehn O. System response of metabolic networks in *Chlamydomonas reinhardtii* to total available ammonium. *Mol. Cell Proteomics*. 2012, vol. 11, no. 10, pp. 973–988.
3. Herman P. K. Stationary phase in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2002, vol. 5, no. 6, pp. 602–627.
4. Navarro L. J. M., Tormo A., Martinez-Garcia E. Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010, vol. 34, no. 4, pp. 476–495.
5. Berla B. M., Pakrasi H. B. Upregulation of plasmid genes during stationary phase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803, a cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, vol. 78, no. 15, pp. 5448–5451.
6. Boelling C., Fiehn O. Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation. *Plant Physiol.* 2005, vol. 139, no. 4, pp. 1995–2005.
7. Grossman A. Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to its nutrient environment. *Protist.* 2000, vol. 151, no. 3, pp. 201–224.
8. Schmollinger S., Schulz-Raffelt M., Strenkert D., Veyel D., Vallon O., Schroda M. Dissecting the heat stress response in *Chlamydomonas* by pharmaceutical and RNAi approaches reveals conserved and novel aspects. *Mol. Plant.* 2013, vol. 6, no. 6, pp. 1795–1813.
9. Valledor L., Furuhashi T., Hanak A. M., Weckwerth W. Systemic cold stress adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Cell. Proteomics*. 2013, vol. 12, no. 8, pp. 2032–2047.
10. Grossman A. R., Lohr M., Im C. S. *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments. *Annu. Rev. Genet.* 2004, vol. 38, pp. 119–173.
11. Rochaix J. D. *Chlamydomonas*, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes. *FEBS Lett.* 2002, vol. 529, no. 1, pp. 34–38.
12. Dutcher S. K. Elucidation of basal body and centriole functions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic*. 2003, vol. 4, no. 7, pp. 443–451.
13. Ide T., Owa M., King S. M., Kamiya R., Wakabayashi K. Protein-protein interactions between intermediate chains and the docking complex of *Chlamydomonas* flagellar outer arm dynein. *FEBS Lett.* 2013, vol. 587, no. 14, pp. 2143–2149.
14. Lechtreck K. F. In vivo imaging of IFT in *Chlamydomonas* flagella. *Methods Enzymol.* 2013, vol. 524, pp. 265–284.
15. Goodenough U. W., Heuser J. E. The *Chlamydomonas* cell wall and its constituent glycoproteins analyzed by the quick-freeze, deep-etch technique. *J. Cell Biol.* 1985, vol. 101, no. 4, pp. 1550–1568.

16. Imam S. H., Buchanan M. J., Shin H. C., Snell W. J. The Chlamydomonas cell wall: characterization of the wall framework. *J. Cell Biol.* 1985, vol. 101, no. 4, pp. 1599–1607.
17. Voigt J., Hinkelmann B., Harris E. H. Production of cell wall polypeptides by different cell wall mutants of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiol. Res.* 1997, vol. 152, no. 2, pp. 189–198.
18. Fiehn O. Metabolomics — the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 2002, vol. 48, no. 1–2, pp. 155–171.
19. Okada T., Afendi F. M., Altaf U., Amin M., Takahashi H., Nakamura K., Kanaya S. Metabolomics of medicinal plants: the importance of multivariate analysis of analytical chemistry data. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2010, vol. 6, no. 3, pp. 179–196.
20. Bylesjo M., Rantalainen M., Cloarec O., Nicholson J. K., Holmes E., Trygg J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J. Chemometrics.* 2006, vol. 20, no. 8–10, pp. 341–351.
21. Wiklund S., Johansson E., Jostrom L., Mellerowicz E. J., Edlund U., Shockcor J. P., Gottfries J., Moritz T., Trygg J. Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal. Chem.* 2008, vol. 80, no. 1, pp. 115–122.
22. Renberg L., Johansson A. I., Shutova T., Stenlund H., Aksmann A., Raven J. A., Gardestrom P., Moritz T., Samuelsson G. A. Metabolomic approach to study major metabolite changes during acclimation to limiting CO₂ in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 2010, vol. 154, no. 1, pp. 187–196.
23. Grossman A. R., Catalanotti C., Yang W., Dubini A., Magneschi L., Subramanian V., Posewitz M. C., Seibert M. Multiple facets of anoxic metabolism and hydrogen production in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *New Phytol.* 2011, vol. 190, no. 2, pp. 279–288.
24. Jammers A., Blust R., De Coen W., Griffin J. L., Jones O. A. Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *Biometals.* 2013, vol. 26, no. 5, pp. 731–740.
25. Lu H., Qu G., Qi X., Lu L., Tian C., Ma Y. Transcriptome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* during the process of lipid accumulation. *Genomics.* 2013, vol. 101, no. 4, pp. 229–237.
26. Lee D. Y., Fiehn O. High quality metabolomic data for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Methods.* 2008, vol. 4, no. 7.
27. Gorman D. S., Levine R. P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1965, vol. 54, no. 6, pp. 1665–1669.
28. Kim S., Yun E. J., Hossain M. A., Lee H., Kim K. H. Global profiling of ultraviolet-induced metabolic disruption in *Melissa officinalis* by using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, vol. 404, no. 4, pp. 553–562.
29. Trygg J., Wold S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemom.* 2002, vol. 16, no. 3, pp. 119–128.
30. Lin J., Lee S.-M., Lee H.-J., Koo Y.-M. Modeling of typical microbial cell growth in batch culture. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2000, vol. 5, no. 5, pp. 382–385.
31. Efron B., Stein C. The jackknife estimate of variance. *The Annals of Statistics.* 1981, vol. 9, no. 3, pp. 586–596.
32. Niittyla T., Messerli G., Trevisan M., Chen J., Smith A. M., Zeeman S. C. A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science.* 2004, vol. 303, no. 2, pp. 87–89.
33. Johnson X., Alric J. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryot Cell.* 2013, vol. 12, no. 6, pp. 776–93.

Статья поступила в редакцию 23 июня 2014 г., принята в печать 30 ноября 2014 г.

Сведения об авторах:

Пузанский Роман Константинович — младший научный сотрудник
 Шаварда Алексей Леонидович — кандидат биологических наук, доцент
 Шишова Мария Фёдоровна — доктор биологических наук, профессор

Puzanskiy Roman K. — Junior researcher
 Shavarda Alexey L. — Ph.D., Associate Professor
 Shishova Maria F. — Doctor of Biology, Professor