Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Análise integrativa de proteômica, metabolômica e lipidômica para estudo da
acumulação de lipídios neutros na microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Lais Albuquerque Girdi

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Bioenergia

Piracicaba
2021

Lais Albuquerque Giraldi
Licenciada em Ciências Biológicas

Análise integrativa de proteômica, metabolômica e lipidômica para estudo da acumulação de lipídios neutros na microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

Orientadora:
Profa. Dra. **FLAVIA VISCHI WINCK**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Bioenergia

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Giraldi, Lais Albuquerque

Análise integrativa de proteômica, metabolômica e lipidômica para estudo da acumulação de lipídios neutros na microalga *Chlamydomonas reinhardtii* / Lais Albuquerque Giraldi. - - Piracicaba, 2021.

109 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade Estadual de Campinas. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho

1. Biologia de sistemas 2. Triacilglicerol 3. Dados ômicos 4. Microalgas
I. Título

AGRADECIMENTOS

Início agradecendo a Profa. Flavia Vischi Winck pela orientação, apoio e confiança depositada em mim para o desenvolvimento desta pesquisa. Obrigada por todos os conselhos, ensinamentos e palavras de motivação, eles foram essenciais para a realização desta pesquisa e para minha formação como pesquisadora. Agradeço imensamente por todo aprendizado e exemplo de pesquisadora, professora e grande mulher.

À agência de fomento FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelos recursos disponibilizados através da bolsa de doutorado no Brasil, bolsa de doutorado no exterior (BEPE - Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior) e reserva técnica (Processos 2016/19152-3, 2018/14042-0). Além de outros recursos disponibilizados pelo projeto jovem pesquisador da Profa. Flavia Vischi Winck. À agência de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa nos primeiros meses do meu doutorado.

À equipe do Laboratório de Biologia de Sistemas Regulatórios (LABIS), o qual inicialmente era composto apenas por mim e pela Profa. Flavia, mas que ao longo destes 5 anos muitos estudantes fizeram e ainda fazem parte do grupo. Agradeço imensamente a todos que pude conviver, mesmo os que convivi por pouco tempo, aprendi muito e fiz grandes amigos. Agradecimento especial para as técnicas Denise Yamamoto, Sirlei Mendes de Oliveira e Cassia Mayara Carvalho Cabral, aos pesquisadores/estudantes Rodrigo, Danielle, Larissa, Lucca, Fabio, Alexandre, Giovanna, Pedro, Douglas, Rafael, Adriana, Ícaro, Adriele, Filipe, Milena, Leticia e Flora. Obrigada por todo apoio, confraternizações e risadas.

À Delaram Taghavi, uma grande amiga que tive o prazer de conhecer durante o doutorado e que com certeza vou levar para toda a vida. Thank you Dela for the support and friendship all these years.

Ao Prof. Diego Mauricio Riaño-Pachón pela amizade e ensinamentos sobre bioinformática, análise de dados e redes.

Ao Instituto de Química da USP – São Paulo, principalmente o departamento de Bioquímica, local onde desenvolvi maior parte desta pesquisa e onde pude “respirar” ciência em todos os corredores e todos os blocos do instituto. Muitos professores, técnicos, estudantes e equipe da faxina me ajudaram imensamente durante esses anos, por isso agradeço por toda infraestrutura concedida, momentos de lazer e amizade. Este local foi onde conheci pessoas incríveis que se tornaram grandes referências de pessoas, pesquisadores e professores. Agradecimento especial à toda equipe da Profa. Glaucia Mendes Souza, suas técnicas Erica, Carol e Alessandra e pesquisadores Dani, Maryke, Augusto e Felipe. À equipe do Prof. Pio Colepicolo, seus técnicos Leonardo, Ed e Sandra e pesquisadores Aline, Cicero, Erika, Eliezer e Luiza. Aos colegas Douglas, Ana e Antonio pelo apoio. Às técnicas Elaine Palmezan, Priscilla Avila, Sandra Fernandes, Doris, Layla e Bianca. À equipe da Profa. Flavia Meotti, Profa. Regina Baldini, Prof. Alexandre Bruni Cardoso, Profa. Grazilla Ronsein, Prof. Pedro Vidinha e Profa. Sayuri Miyamoto. À Profa. Marisa Medeiros e Profa. Alicia Kowaltowski pela oportunidade em ser monitora (PAE) da disciplina ministrada por vocês.

À Dra. Camila Caldana, pesquisadora do Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular de Plantas, Potsdam, Alemanha. Agradeço a oportunidade de poder desenvolver parte desta pesquisa em seu laboratório, agradeço por todo ensinamento sobre metabolômica e análise de dados, por toda estrutura concedida e

amizade. À sua equipe e às pessoas com quem convivi esse período em Potsdam que fizeram meus dias mais felizes nos períodos de frio e escuridão como Carolina e Luís, Anthony e Marion, Bárbara, Umarah, Reynel, Andrea, Patricia e Michel, Leticia, Marcus, Jojo, Mike, Cici, Gudrum, Änne, David, Laise, Leo, Michael, Mona e Daamuhn. Thank you to be my friends and my family in Germany. Danke schön! Agradeço também à Dra. Marina Soldi pela ajuda com a extração dos metabólitos.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e à Central Analítica do Instituto de Química pelas análises de espectrometria de massa do proteoma.

À equipe do Prof. Thiago Olitta Basso da Escola Politécnica da USP (POLI) pelo apoio e ensinamentos sobre cultivo de microrganismos em biorreatores. Agradecimento especial ao Bruno e Dielle.

À Profa. Telma Teixeira Franco por ceder seu laboratório na Unicamp no início do meu doutorado e por ter me apresentado a Profa. Flavia. Aos amigos que fiz no período em que frequentei a Unicamp no início do meu doutorado Maria Paula, Walter, Isabel, Felipe, Daniel e Guilherme, obrigada pelo apoio nas disciplinas e pelos momentos de confraternização.

À secretaria de pós graduação do Programa Integrado em Bioenergia na ESALQ, pelo auxílio técnico e administrativo.

Aos professores Carlos Labate, Rafael Silva-Rocha e Marli Fiori pelas críticas e recomendações na qualificação. Aos professores Ana Teresa Lombardi, Danilo Daloso e novamente ao Prof. Rafael Silva-Rocha por aceitarem participar da minha banca de defesa.

Aos amigos de São Paulo que fizeram meus dias mais felizes na conhecida cidade da garoa ou selva de pedras. Aos amigos e família de Capivari, pela compreensão da minha ausência, pelo carinho, atenção e descontração nos momentos difíceis.

Aos meus pais Carlos e Cíntia, por sempre me incentivarem a estudar e realizar minhas vontades profissionais, por me ajudarem com muito amor a passar pelos momentos difíceis durante meu doutorado. Ao meu irmão Enzo e cunhada Rafaela por todo o carinho ao longo dessa jornada.

Ao meu marido Antonio Carlos Travaoli Junior por motivar e respeitar minhas decisões profissionais, por ser meu companheiro de aventuras nessa vida e por ser meu apoio e amigo nos momentos difíceis. Obrigada pelo carinho e amor todos os dias, mesmo quando estamos distantes fisicamente e por entender minha ausência física e mental em vários momentos durante o doutorado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. As microalgas e seu potencial biotecnológico.....	9
1.2. O acúmulo de TAGs na microalga <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> e estratégias para potencializar este fenótipo.....	10
1.3. Análises ômica, biologia de sistemas e os desafios de análises integrativas	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Definição dos cultivos de <i>C. reinhardtii</i> e condições experimentais.....	17
3.2. Caracterização da biomassa e análises bioquímicas do meio de cultura	19
3.3. Determinação do proteoma total e nuclear.....	20
3.4. Determinação dos metabólitos primários e lipídios	21
3.4.1. Determinação dos metabólitos primários.....	21
3.4.2. Determinação dos metabólitos apolares	23
3.5. Análise de dados e estatística	25
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Resposta fenotípica de <i>C. reinhardtii</i> sob privação de Nitrogênio.....	29
4.2. Efeito da privação do N no proteoma de <i>C. reinhardtii</i>	32
4.3. Efeito da privação de N no proteoma nuclear de <i>C. reinhardtii</i>	38
4.4. Efeito da limitação de N no metaboloma e lipidoma de <i>C. reinhardtii</i>	42
4.4.1. Metabolômica.....	42
4.4.2. Lipidômica.....	47
4.5. Integração dos dados “omicos” através de aprendizagem de Manifold	50
4.6. Meta-análise de transcritos do metabolismo de Arg em <i>C. reinhardtii</i>	58
4.7. Validações fenotípicas de <i>C. reinhardtii</i> à suplementação de arginina e mutante fator de transcrição <i>Tubby-like</i>	60
5. DISCUSSÃO.....	63

5.1. Metabolismo Central de Carbono – Redirecionamento para acúmulo de amido, biossíntese de acetil CoA , 2-oxalacetato e poder redutor (NADPH)	64
5.2. Metabolismo de Amido e Lipídios – Acúmulo de TAGs e remodelamento de lipídios de membrana.....	66
5.3. Metabolismo de Nitrogênio – ativação de vias envolvidas com metabolismo de Arg	69
5.4. Fotossíntese, Respiração e Estresse oxidativo	72
5.5. Proteoma nuclear revela fator de transcrição com possível aplicação biotecnológica	73
6. CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXOS	85

RESUMO

Análise integrativa de proteômica, metabolômica e lipidômica para estudo da acumulação de lipídios neutros na microalga *Chlamydomonas reinhardtii*

As microalgas, graças à sua rica composição química com alto teor de óleos, proteínas, carboidratos, pigmentos, minerais e vitaminas, apresentam grande potencial como matéria-prima para a produção sustentável em diversos setores comerciais como por exemplo, biocombustíveis, fármacos, agrícola, alimentação e pigmentos. Devido à busca por redução das emissões dos gases do efeito estufa e à alta capacidade de acumular lipídios neutros, as microalgas têm conquistado um grande interesse na última década no setor de bioenergia para produção de biodiesel. Entretanto, em geral, as altas concentrações de lipídios neutros e a alta produtividade de biomassa são inversamente correlacionados, portanto, melhorias genéticas e de etapas de bioprocessos são necessários para tornar o uso da biomassa microalgal viável e comercialmente competitivo. A condição ambiental que mais contribui para um aumento de lipídios neutros, tais como triacilgliceróis (TAGs), é a privação do nitrogênio (N). Nesta condição, as células são induzidas a uma fase de quiescência celular onde as divisões celulares são interrompidas e os níveis de TAGs aumentam dentro das células. Além de estudos de otimização de cultivos, estudos anteriores utilizaram estratégia de superexpressão e inativação de genes específicos de vias metabólicas da biossíntese de TAGs e de amido visando o aumento da produção TAGs. Entretanto, estes estudos demonstraram que as estratégias de otimização ainda são caras e que, o aumento de TAGs obtidos pela mutação de um ou poucos genes não levou a produtividade de TAGs esperada de forma sustentável. Diante deste cenário, uma abordagem de biologia de sistemas usando dados "ômicos" é essencial para gerar informações e compreender os mecanismos envolvidos com a acumulação de TAGs nas microalgas. Portanto, o objetivo do estudo foi investigar através de uma abordagem integrativa de dados ômicos, o acúmulo de TAGs em resposta à privação de N em condição fotoautotrófica em *Chlamydomonas reinhardtii*. Experimentos em séries temporais (com 10 pontos de tempo) foram realizados a fim de detectar alterações no proteoma, metaboloma e lipidoma. Além disso, o proteoma nuclear foi investigado à procura de proteínas regulatórias. Através da análise sistemática e integrativa dos dados "ômicos", juntamente com as observações fisiológicas, verificou-se que, nas condições testadas, o acúmulo de TAGs é resultado da regulação de diversas vias em conjunto. As vias metabólicas de gluconeogênese, processo de geração de ATP, reação de luz na fotossíntese e processo biossintético de Arg mostraram-se ser centralizadoras na resposta à privação de N. Ademais, verificou-se que a maior contribuição para o acúmulo de TAGs nas condições testadas foi, provavelmente, o remodelamento de lipídios de membrana. Os resultados do proteoma nuclear revelaram que uma proteína fator de transcrição (*Tubby-like protein*) pode ser um regulador negativo de proliferação celular. Além disso, sugeriu-se, a partir de uma metanálise com dados de transcriptoma de outros estudos, que a alteração na via de Arg aparentemente não é exclusiva da limitação de N, sendo também regulada positivamente sob outros tipos de estresse. Portanto, pudemos concluir que os objetivos do presente estudo foram alcançados e seus achados expandiram o atual conhecimento sobre os mecanismos moleculares que levam ao acúmulo de TAGs em *C. reinhardtii* em condição fotoautotrófica.

Palavras-chave: Biologia de sistemas, Triacilglicerol, Dados ômicos, Microalgas

ABSTRACT

Integrative analysis of proteomics, metabolomics and lipidomics to study the accumulation of neutral lipids in the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*

As microalgae have a rich chemical composition, with a high content of oils, proteins, carbohydrates, pigments, minerals and vitamins, they have a high potential as raw material for sustainable production in various commercial sectors such as biofuels, pharmaceuticals, agriculture, food and pigments. Due to the greenhouse gas emissions reduction goes and the high capacity to accumulate neutral lipids, microalgae have gained interest by the bioenergy sector in the last decade, in order to produce biodiesel. However, in general, high neutral lipid concentrations and high biomass productivity are inversely correlated, therefore, genetic and bioprocess improvements are needed to make the microalgal biomass usage viable and commercially competitive. The environmental condition that most contributes to an increase in neutral lipids, such as triacylglycerols (TAGs), is the nitrogen (N) starvation. In this condition, cells are induced into a cell quiescence phase which cell divisions are stopped and TAGs levels increase inside the cells. In addition to cultivation optimization studies, previous studies also used the strategy of gene overexpression and inactivation involved in TAGs and starch biosynthesis aiming to increase the TAGs production in the cells. However, these studies demonstrated that optimization strategies are still expensive and, the alteration of one or a few genes did not lead to the expected TAG productivity in a sustainable way. Given this scenario, a systems biology approach using "omics" data is essential to generate information and understand the mechanisms involved with the accumulation of TAGs in microalgae. Therefore, the aim of the study was to investigate, through an omics data integrative approach, the accumulation of TAGs in response to N starvation in photoautotrophic condition in *Chlamydomonas reinhardtii*. Time series experiments (with 10 time points) were performed to detect alterations in the proteome, metabolome and lipidome. Furthermore, the nuclear proteome was investigated looking for regulatory proteins. Through the systematic and integrative analysis of the "omics" data, together with the physiological observations, it was found that, under the conditions tested, the TAGs accumulation is a result of several pathways regulation together. The metabolic pathways of gluconeogenesis, ATP generation process, light reaction in photosynthesis and Arg biosynthetic process were shown to be central in the response to N starvation. Furthermore, it was found that, under the tested conditions, the higher contribution to TAGs accumulation was probably membrane lipid remodeling. The nuclear proteome results revealed that a transcription factor protein (Tubby-like protein) may be a negative regulator of cell proliferation. In addition, based on the meta-analysis performed using transcriptomes data from other studies, it was suggested that the alteration in the Arg pathway apparently is not exclusive of the N starvation response, being also upregulated under other types of stress. Therefore, we could conclude that the objectives of the present study were achieved, and its findings expanded the current knowledge about the molecular mechanisms that lead to the accumulation of TAGs in *C. reinhardtii* under photoautotrophic condition.

Keywords: System biology, Triacylglycerol, Omics data, Microalgas

1. INTRODUÇÃO

1.1. As microalgas e seu potencial biotecnológico

O uso das microalgas como fonte potencial para produção de combustíveis renováveis, alimentação animal e fármacos é reconhecido e explorado a décadas, e graças à sua rica composição química com alto teor de óleos, proteínas, carboidratos, pigmentos, minerais e vitaminas, as torna adequada para diversos setores comerciais (Pulz and Gross 2004; Yen et al. 2013). As microalgas apresentam relevância no setor agrícola funcionando como fertilizantes e bioestimulantes no solo e também no setor da saúde como *super foods* e suplementos alimentares sendo fonte de antioxidantes e ácidos graxos, por exemplo (Pulz and Gross 2004; Yen et al. 2013). Além disso, as microalgas apresentam grande potencial biotecnológico inclusive para produção de proteínas recombinantes, como hormônios, anticorpos, vacinas, enzimas e imunotoxinas (Almaraz-Delgado et al. 2014; Rasala and Mayfield 2015). Em comparação com as plantas terrestres, as microalgas apresentam maior eficiência fotossintética, apresentam altas taxas de produção de biomassa (devido a capacidade de canalizar a maior parte de sua energia para a divisão celular) e algumas espécies oleaginosas são capazes de acumular até 60 % de lipídios neutros (na forma de triacilgliceróis; TAGs) por grama de peso seco (Gouveia and Oliveira 2009; Sayre 2010). Além disso, o gás de combustão industrial pode ser utilizado como fonte de carbono (Wang et al. 2008), seu cultivo não compromete terras férteis e elas podem ser cultivadas em sistemas de esgoto e água salgada não competindo diretamente com os recursos necessários para a produção agrícola e também contribuindo com o desenvolvimento integrado dos processos de produção de biomassa e de biorremediação (Chisti 2007; Scott et al. 2010; Cai et al. 2013; Winck et al. 2013).

A alta demanda por energia e o alto consumo de combustíveis fósseis estão intimamente associados com o aumento dos níveis dos gases do efeito estufa na atmosfera, os quais podem causar alterações climáticas que afetam a biodiversidade de espécies a nível global (Chiari and Zecca 2011). Devido a este cenário, acordos mundiais para redução da emissão de gases do efeito estufa foram realizados e este problema contempla os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODSs) da ONU. Nesse contexto, as microalgas têm conquistado um grande interesse no setor de bioenergia com o objetivo de reduzir as emissões de gases do efeito estufa, sendo matéria-prima para produção de biosiesel, biotanol, biogás e biohidrogênio (Chisti 2007; Jones and Mayfield 2012; Vargas et al. 2018). A estratégia alternativa mais utilizada atualmente para produção de biocombustíveis líquidos é a biomassa de plantas, cujo uso apresenta algumas desvantagem quando comparado com a biomassa microalgal, como por exemplo a necessidade de uso de grandes quantidades de fertilizantes e a possível competição por terras férteis em algumas regiões geográficas do globo, que poderiam ser utilizadas para a produção de alimentos (Cherubini and Strømman 2011; Merchant et al. 2012).

No entanto, muito estudo e investimento ainda são necessários para tornar as microalgas uma opção comercialmente competitiva no setor de energia sustentável, pois algumas barreiras no cultivo destes organismos são encontradas como fotoinibição, penetração limitada de luz, contaminação por outros organismos e alto custos associados ao cultivo, extração e processamento da biomassa (Chisti 2007; Hannon et al. 2010; Scott et al. 2010; Jones and Mayfield 2012). Além disso, alguns dos compostos de interesse como ácidos graxos,

carboidratos, antioxidantes, pigmentos e TAGs apresentam uma relação inversa do seu acúmulo nas células com o crescimento celular, pois tais compostos geralmente são acumulados após exposição das células à uma condição de estresse que reduz as divisões celulares, como altas intensidade de luz, altas concentrações salinas, privação de enxofre e privação de nitrogênio (N), por exemplo (Merchant et al. 2012; Guarnieri et al. 2013; Cheng and He 2014; Minhas et al. 2016). Portanto, o desenvolvimento de cepas que produzam altas quantidades de lipídios e mantenham ao mesmo tempo alta taxa de crescimento é um desafio para a comunidade científica e para o setor produtivo.

1.2. O acúmulo de TAGs na microalga *Chlamydomonas reinhardtii* e estratégias para potencializar este fenótipo

Grande parte do conhecimento que temos hoje sobre as vias de biossíntese de ácidos graxos e TAGs e o armazenamento destes nas células de microalgas é baseado principalmente em anotações genômicas e em genes ortólogos de enzimas com função conhecida em animais, leveduras e principalmente em plantas com sementes (Fan et al. 2011). No entanto, estudos realizados na última década, principalmente com a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, mostraram evidências de que a síntese de ácidos graxos e TAGs nestes organismos apresenta várias características distintas das plantas terrestres (Boyle et al. 2012; Zienkiewicz et al. 2016). Uma diferença é que, por ser unicelular, a biossíntese de TAGs em microalgas ocorre em células que são fotossintéticas, diferentemente das plantas onde a biossíntese lipídica ocorre em maior abundância em células especializadas como sementes, frutas e grãos de pólen. Esta divergência indica que a regulação da partição do carbono dentro de uma única célula provavelmente acontece de forma diferenciada ao que atualmente é conhecido em plantas terrestres (Hu et al. 2008; Zienkiewicz et al. 2016).

Sabe-se que a privação de N induz a fase de quiescência nas células de microalgas. Tal momento aparece como um estado reversível do ciclo celular, onde as divisões celulares são temporariamente interrompidas e o metabolismo celular é reprogramado para permitir a sobrevivência celular em condição desfavorável (Merchant et al. 2012; Liu et al. 2013). Esta resposta é acompanhada pela degradação do cloroplasto, reorganização das estruturas de membrana e do acúmulo de TAGs dentro do cloroplasto e no citosol na forma de corpos lipídicos (Hu et al. 2008; Fan et al. 2011). Levando-se em conta a complexidade da relação entre a resposta de estresse à privação de N e o armazenamento de lipídios, acredita-se que a resposta de acúmulo de lipídios nas células seja multifatorial (Johnson and Alric 2013a).

Formas de otimizar o cultivo de microalgas com objetivo de maior acúmulo de TAGs e maior crescimento foi amplamente estudado, como por exemplo a estratégia de cultivo em dois estágios, onde as células são submetidas ao estresse após um período de acúmulo de biomassa, mas este método ainda apresenta alto custo devido ao longo tempo do processo e à complexidade de monitoramento e otimização da produção (Singh et al. 2016). Outra estratégia estudada é a engenharia genética de microalgas, com objetivo de alterar os níveis de expressão de genes envolvidas no metabolismo lipídico. Um exemplo foi a superexpressão do gene que codifica Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase (DGAT) em *C. reinhardtii* cultivada sob privação de N, o qual não resultou

em alteração no perfil dos lipídios e nem na produtividade de TAG (La Russa et al. 2012), mesmo existindo alguns estudos com plantas terrestres demonstrando resultados positivos para o aumento de TAGs em sementes utilizando estratégias semelhantes (Zheng et al. 2008). Outros estudos demonstraram o incremento do conteúdo de TAGs em mutantes de *C. reinhardtii* deficientes no acúmulo de amido, em que os genes das enzimas ADPglicose pirofosforilase e Isoamilase foram bloqueados (Zabawinski et al. 2001; Posewitz 2004; Li et al. 2010; Goodson et al. 2011). No entanto, além destes mutantes apresentarem baixo crescimento e serem dependentes de fonte de carbono (C) orgânico (acetato) para o acúmulo de TAGs, um estudo com múltiplas cepas destes mutantes contradisse os estudos anteriores (Siaut et al. 2011) revelando que não há aumento significativo no acúmulo de TAGs nestes mutantes quando comparado com a cepa de referência (*wild type*). Abordagens de engenharia genética em genes codificantes de proteínas regulatórias, envolvidas com a regulação da biossíntese de TAGs, podem apresentar resultados mais consistentes no maior acúmulo de TAGs sem afetar o crescimento nas microalgas. Como por exemplo a cepa transgênica de *C. reinhardtii* com superexpressão do fator de transcrição (TF) *Dof-type* em condições mixotróficas (Salas-Montantes et al. 2018).

Diante dos resultados desses estudos anteriores, conclui-se que a superexpressão ou mutação de um ou poucos genes da via de biossíntese de ácidos graxos ou de TAGs não promove um incremento sustentável na produção de biomassa rica em TAGs, sendo em sua maioria dependentes de fonte de C orgânico e ausentes de caracterização em condições fotoautotróficas. Por isso, destaca-se a importância dos estudos utilizando abordagem de biologia de sistemas através da integração dos dados “ômicos”, os quais contribuem com o avanço do conhecimento dos mecanismos de regulação e sinalização do acúmulo de TAGs e biomassa nas microalgas, possibilitando assim, a descoberta de genes candidatos com maior chance de sucesso (Winck et al. 2013; Melo et al. 2014). Diversos estudos anteriores utilizaram a abordagem “ômica” para melhor entender os mecanismos envolvidos com o acúmulo de TAGs em *C. reinhardtii* sob limitação de N, através do estudo do transcriptoma, proteoma, lipidoma e metaboloma, no entanto, em sua maioria foram estudos em condição mixotrófica (Boyle et al. 2012; Schmollinger et al. 2014; Valledor et al. 2014; Wase et al. 2014a; Gargouri et al. 2015; Park et al. 2015a) e nenhum deles foi realizado em condições experimentais que permitissem a avaliação profunda dos efeitos da privação de N na alteração de proteínas regulatórias, como TFs e reguladores transcricionais (TRs), em condições fotoautotróficas (Msanne et al. 2012; Juergens et al. 2016b).

Dentro deste cenário, a microalga *C. reinhardtii* nos parece como um modelo biológico apropriado para estudos de fisiologia molecular da acumulação de lipídios. A disponibilidade de informação genômica (Merchant et al. 2007) e a disponibilidade de protocolos e ferramentas de genética molecular contribuíram para que esta microalga seja o modelo atual mais utilizado para estudos da fisiologia molecular de microalgas. Estudos de *C. reinhardtii* usando abordagens “ômicas” permitiram a caracterização sistêmica de respostas celulares dessa espécie através do estudo do seu transcriptoma (Miller et al. 2010; Boyle et al. 2012), proteoma e metaboloma (Bölling and Fiehn 2005; Lee et al. 2012; Guarnieri et al. 2013; Mettler et al. 2014; Schmollinger et al. 2014). A partir desses estudos, diversas alterações morfológicas e genes relacionados ao processo de acumulação de lipídios frente a privação de N foram identificados (Fan et al. 2011; Siaut et al. 2011). O sequenciamento do genoma de *C. reinhardtii* também permitiu a anotação de genes que codificam proteínas FTs e RTs (Riaño-Pachón

et al. 2008). No entanto, a informação sobre o papel regulatório destas proteínas em diferentes condições é limitada (Winck et al. 2012; Valledor et al. 2014; Gargouri et al. 2015).

1.3. Análises ômica, biologia de sistemas e os desafios de análises integrativas

Devido ao aprimoramento das ferramentas analíticas e técnicas de alto rendimento (*highthroughput*) nos últimos anos, assim como o desenvolvimento da genômica funcional e da bioinformática, foi possível a determinação simultânea de milhares de genes, transcritos, proteínas e metabólitos, permitindo assim, o avanço na compreensão dos processos biológicos (Sheth and Thaker 2014). No entanto, uma abordagem “ômica” única pode ser insuficiente para caracterizar a complexidade dos sistemas biológicos como um todo (Gygi et al. 1999), por isso, a função principal da biologia de sistemas é coletar informações de cada um dos níveis (genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma), integrá-los e, em última análise, criar modelos matemáticos que descrevam a estrutura do sistema e sua resposta à diversas perturbações externas (ambientais) e/ou internas (genética) (Ideker et al. 2001) (**Figura 1**).

Figura 1. Níveis de interação dos sistemas biológicos. Imagem modificada de Holčapek et al. (2018)

A análise da sequência do DNA não prevê a forma ativa de uma proteína e o RNA mensageiro (RNA_m) nem sempre é traduzido em proteína, portanto, as informações da sequência do gene e o seu padrão de atividade não fornecem um perfil completo e preciso da abundância de proteínas em uma célula. A identificação e quantificação do conteúdo de proteínas, a chamada proteômica, é uma das metodologias mais significativas para compreender a função do gene e o estado fisiológico do organismo (Aslam et al. 2017). Os métodos robustos de espectrometria de massa acoplados à métodos de cromatografia líquida permitiram a identificação e medição da maioria das proteínas de forma confiável e com reprodutibilidade (Aebersold and Mann 2016). A partir da abordagem de proteômica *top-down* as proteínas são estudadas de forma intacta por espectrometria de massa, no entanto, a abordagem *bottom-up*, na qual os peptídeos são gerados por digestão enzimática, é a abordagem mais difundida e mais padronizada experimentalmente e computacionalmente. Dentro da abordagem *bottom-up*, a utilizada no presente trabalho foi a proteômica da descoberta (*shotgun*), a qual tem como objetivo alcançar cobertura completa e imparcial do proteoma (Aebersold and Mann 2016).

A metabolômica, considerada a última etapa da cascata das “ômicas” (**Figura 1**) e a que configura o fenótipo, envolve a medição de pequenas moléculas que são produtos e substratos de reações químicas nos sistemas biológicos, fornecendo informações essenciais sobre o estado biológico do sistema em questão (Lee and Fiehn 2013; Liu and Locasale 2017). Devido a grande diversidade das propriedades químicas dos metabólitos (metabólitos primários, secundários e lipídios, por exemplo), os métodos não-direcionados (*untargeted*) podem não oferecer a melhor sensibilidade para todos os metabólitos, por isso, os métodos direcionados e semi-direcionados (*targeted* e *semitargeted*) são ideais quando a hipótese do estudo é mais específica (Liu and Locasale 2017). Os métodos mais utilizados, assim como em proteômica, é a espectrofotometria de massa acoplada a cromatografia gasosa ou líquida. O lipidoma é um subgrupo do metaboloma, o qual contém moléculas com características apolar e anfipática, cujo acesso era tradicionalmente através da cromatografia em camada delgada ou através de cromatografia gasosa. Hoje a espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida de alta performance é considerado o padrão “ouro” para a identificação e quantificação destas moléculas (Yang et al. 2015; Holčapek et al. 2018).

A integração bem-sucedida de dados “ômicos” dependerá de um experimento bem desenhado, destacando-se os experimentos realizados em séries temporais, os quais são importantes para avaliar a dinâmica da resposta do sistema biológico, melhor avaliar eventos regulatórios e identificar modulação de respostas em etapas (Greene and Troyanskaya 2010; Sheth and Thaker 2014). Além disso, para a análise abrangente dos estudos “ômicos”, o uso de ferramentas de bioinformática é inevitável para gerenciar vários tipos de conjuntos de dados em grande escala de forma eficiente. Nos últimos anos, surgiram diversos pacotes de softwares, que incluem ferramentas para visualização de rede, ambientes de modelagem, construção de vias e ferramentas de visualização, como por exemplo alguns dos utilizados no presente estudo: o PhycoMine, o qual contém os dados gerados no presente estudo e foi desenvolvido pelo grupo da Profa. Flavia Vischi Winck (<https://phycomine.iq.usp.br/>) e o MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). A melhoria dessa análise integrativa é a chave para fazer descobertas biológicas, que, por sua vez, levam à formação de novos modelos, novas previsões e novos experimentos para testá-los (Sheth and Thaker 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo foi investigar, através de uma abordagem integrativa de dados ômicos, o acúmulo de lipídios neutros em resposta à privação de nitrogênio em condição fotoautotrófica em *Chlamydomonas reinhardtii*.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterização do crescimento e da composição da biomassa de *Chlamydomonas reinhardtii* em fotoautotrofia e sob privação de nitrogênio com resolução temporal;
- Determinação do perfil proteômico total e do proteoma nuclear das células sob privação de nitrogênio em séries temporais;
- Identificação do metaboloma primário e lipidoma das células sob privação de nitrogênio em séries temporais;
- Anotação funcional, interpretação biológica e análise integrativa dos dados ômicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Definição dos cultivos de *C. reinhardtii* e condições experimentais

O cultivo da microalga *C. reinhardtii* foi estabelecido com cepas de *Chlamydomonas reinhardtii* CC-503 cw92 mt+ doadas gentilmente pelo Professor Dr. Pio Colepicolo do Instituto de Química – USP, obtidas no Chlamydomonas Resource Center (University of Minnesota), as quais são unialgais e isentas de outros organismos. As células foram mantidas em meio de cultura TAP (Tris–acetate–phosphate) (Gorman and Levine, 1965) e em meio de cultura HSM (high-salt medium) (Sueoka, 1960), em condições controladas de crescimento e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sob iluminação contínua de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($100\mu\text{E}$). O controle da axenia dos cultivos de manutenção foi realizado por microscopia ótica regularmente e por cultivo paralelo em meio sólido LB (Luria Bertani) (Figura 2).

Figura 2. Cultivos de manutenção e controle de axenia.

(A) Cultivos em meio sólido e líquido em estufa com temperatura e luz controladas; (B) Controle da axenia dos cultivos por cultivo paralelo em meio sólido LB; (C) Microscopia ótica de uma célula de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Os experimentos em condições de fotoautotrofia em séries temporais foram realizados em batelada simples em frascos de 2L com aeração, os quais foram adaptados para amostragem similar à de um biorreator (Figura 3). As amostragens foram realizadas de forma unidirecional, evitando assim a contaminação do cultivo. As células foram cultivadas em 1.5 L de meio HSM (high-salt medium) (Sueoka, 1960), sob aeração contínua de 0.5 vvm (0.5 L.min^{-1}) de ar comprimido estéril ($0.04\% \text{ CO}_2$), iluminação contínua de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ($100\mu\text{E}$) e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e concentração inicial de 5×10^5 células. mL^{-1} . A fonte de nitrogênio (N) utilizada na condição controle (N+) foi o cloreto de amônio (NH_4Cl) na concentração descrita por Sueoka (1960) no meio HSM, igual a $9.35 \text{ mmol. L}^{-1}$. Na condição de limitação de N, chamada de tratamento (N-), o NH_4Cl não foi adicionado ao meio de cultura.

Figura 3. Sistema de cultivo de *C. reinhardtii* fotoautotrófico em batelada simples.

(A) Sistema de cultivo montado e operando; (B) Desenho esquemático do frasco lavador de gás; (1) Válvula de entrada de ar comprimido estéril; (2) Filtro de ar PTFE 0.22 μm ; (3) Conector em Y; (4) Tampa modificada (lavador de gás); (5) Tubo de vidro para entrada de ar no cultivo de microalga; (6) Local de saída de ar; (7) Mangueira de saída de ar; (8) Presilha (Pinça de Mohr); (9) Seringa para amostragem.

Após o cultivo alcançar fase exponencial tardia (com aproximadamente $2\text{--}3 \times 10^6$ células. mL^{-1}) em condição repleta de N (N+), as células passaram pelo processo de centrifugação (5000g, 5 minutos, 20 °C) e lavagem por 3 vezes. Após lavagem as células foram ressuspensas em 1.5 L de meio de cultura, sendo a condição controle em meio HSM+N (com fonte de N) e o tratamento em meio HSM-N (sem fonte de N). As amostragens foram realizadas antes e depois da mudança do meio de cultura, totalizando 10 pontos de tempo (Figura 4).

Figura 4. Diagrama dos experimentos em séries temporais com indicação dos pontos de amostragem.

Em todos os pontos de amostragem foram realizadas a caracterização da biomassa microalgal e a identificação do proteoma total, metaboloma e lipidoma. Exceto pelos pontos identificados em azul, os quais foram amostragens extras apenas para medição do metaboloma e lipidoma. As diferentes condições foram realizadas em triplicata em frascos com 1.5L de cultivo sob aeração contínua de 0.5 vvm ($0.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$) de ar comprimido estéril (0.04% CO_2), iluminação contínua de $100 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ($100 \mu\text{E}$) e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Em cada ponto de tempo foram coletadas amostras de 4 mL para caracterização da biomassa (concentração celular, lipídios neutros e concentração de amônio e fosfato no sobrenadante), 2mL para identificação do proteoma total e 10 mL para identificação do metaboloma e lipidoma, como descrito em Winck et al. (2013) e Mubeen et al. (2019). Os mesmos parâmetros e procedimentos foram utilizados para verificar o efeito da privação de N no proteoma nuclear após 1 hora. Neste caso, após 1 hora, 250 mL de amostra foi coletada para permitir o enriquecimento dos núcleos e posterior extração das proteínas. Todos os experimentos descritos foram realizados em triplicata biológica, assim como suas respectivas análises.

Em paralelo, verificou-se o efeito da suplementação do aminoácido arginina (Arg) sob condição repleta e limitante de N. Estes testes foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL com volume de cultivo de 300 mL sob agitação de 100 rpm, iluminação contínua de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (100 μE) e temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$. Após centrifugação, lavagem e ressuspensão das células nas condições repleta e limitante de N, a Arg foi adicionada na concentração de 2mM nos frascos do tratamento e, o mesmo volume de água foi adicionado nos frascos controle como ilustrado na **Figura 5**. Foram realizados 4 pontos de coleta (0, 24, 48 e 72h) onde monitorou-se multiplicação celular e acúmulo de lipídios neutros em triplicata biológica.

Figura 5. Diagrama de experimento de suplementação de arginina (Arg) sob condição repleta de N (N+) e de privação (N-).

3.2. Caracterização da biomassa e análises bioquímicas do meio de cultura

A determinação do crescimento celular foi realizada pelo monitoramento da concentração de células (células. mL^{-1}) através da contagem de células em equipamento Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific), previamente confirmado com contagem em câmara de Neubauer. Os parâmetros cinéticos calculados a partir dos dados experimentais foram: velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e tempo de duplicação (T_d) como previamente descrito (Vidotti et al. 2020).

Os lipídios neutros foram determinados por sua fluorescência em interação com o pigmento vermelho do Nilo. O método de Kou et al. (2013) foi adaptado para nossas condições experimentais e estruturais. Brevemente, adicionou-se 1% de DMSO em 1.5mL de suspensão celular na concentração de 1 a 3×10^6 células. mL⁻¹. Após 5 minutos adicionou-se vermelho do Nilo na concentração final de 1µg. mL⁻¹ e armazenou-se a amostra no escuro por 10 minutos. Numa placa de 96 poços (Costar 96 Black Opaque) transferiu-se 0.3 mL da amostra em cada poço (no mínimo 5 réplicas técnicas), juntamente com o branco. A leitura foi realizada em leitora de placa de fluorescência (Biotek/Synergy H1, Biotek, USA) na faixa de excitação/emissão de 530/580.

Para observação dos corpos lipídicos em microscópio de fluorescência (Biotek/Synergy H1, Biotek, USA), 10 µL da suspensão de células coradas com vermelho do Nilo foram fixadas com Prolong Gold com DAPI (Thermo Fisher Scientific) na proporção 1:1 em lâmina de vidro e mantida no escuro por 24 horas, já com a lamínula. Após 24 horas as células foram observadas sob os filtros do microscópio de fluorescência *Rodamin* e *DAPI*.

As proteínas totais foram quantificadas pelo método espectrofotométrico Bradford (1976) logo após extração proteica de pellet de 2mL de amostra (Winck et al. 2013). O consumo de amônio no meio de cultura foi verificado através da quantificação pelo método espectrofotométrico azul indofenol descrito em APHA (2005).

3.3. Determinação do proteoma total e nuclear

As análises do proteoma total celular e do proteoma nuclear foram realizadas pelo método *shotgun* usando-se *Label-free quantification* (Cox et al. 2014) através da identificação de proteínas por Espectrometria de Massas, que foi realizada na Central Analítica do Instituto de Química – USP (São Paulo, SP).

A extração e digestão das proteínas totais e nucleares foram realizadas seguindo protocolo descrito por (Winck et al. 2012) e para dessalinização utilizou-se Stage tips com coluna C18 como previamente descrito (Rappsilber et al. 2003; Winck et al. 2012, 2016). Os peptídeos foram eluídos em 0.1% ácido fórmico e analisados no Espectrômetro de massas Q-ToF Maxis 3G (Brucker Daltonics, USA) acoplado com um instrumento Nano LC Acquity (Waters, USA). A fonte CaptiveSpray de íons usada na espectrometria e a voltagem do electrospray foi ajustada para 2 kV, com temperatura da fonte em 150 °C.

A separação dos peptídeos foi realizada em dois passos, com acumulação de peptídeos em coluna nanoAcquity UPLC® 2G-V/MTrap Symmetry® C18 (180 µm x 20 mm, 5µm) por 3min a um fluxo de 7 µL/min em 0.1% ácido fórmico, seguido de uma separação analítica usando-se nanoAcquity UPLC® BEH130 (100 µm x 100 mm, 1.7µm), com gradiente de acetonitrila em 0.1% ácido fórmico como fase móvel em gradiente entre 2–85% em 0.1% ácido fórmico em fluxo de 0,3µL/min por 85min.

Para a análise do proteoma nuclear, foi realizado o enriquecimento de núcleos utilizando-se o kit Cellytic PN (Sigma-Aldrich, USA) como previamente descrito por Wink et al. (2011). Amostras de células e fração nuclear obtidos antes e após o procedimento de enriquecimento de núcleos foram fixadas com Prolong Gold com DAPI (Thermo Fisher Scientific) com o propósito de visualizar os núcleos isolados por microscopia de fluorescência. Após a etapa de enriquecimento de núcleos, realizou-se a extração e digestão das proteínas e dessalinização dos peptídeos como previamente (Rappsilber et al. 2003; Winck et al. 2012, 2016).

As proteínas foram identificadas com uso da plataforma computacional MaxQuant v.1.6.0.16 (Cox et al., 2014), contra o banco de dados de proteoma de referência de *C. reinhardtii* depositado no repositório de proteomas do Joint Genome Institute (JGI) (*Chlamydomonas reinhardtii* 281, v5.5; 17.741 proteínas). Erro máximo de 6ppm foi aceito para busca de íons precursores (MS search), 0.5Da para busca de fragmentos (MS/MS search) e máximo de 2 clivagens perdidas, com limite máximo de 1% para razão de falsos positivos (FDR) para identificação de peptídeos e proteínas.

A análise e interpretação de dados do proteoma foram feitos usando-se códigos em R desenvolvidos em nosso grupo juntamente com o Prof. Diego M. Riaño-Pachón (CENA-USP), a plataforma Perseus (Tyanova et al. 2016) e plataforma Cytoscape (www.cytoscape.org) que permitem a realização de análises estatísticas e de bioinformática para anotação e interpretação de dados biológicos ômicos, como previamente sugerido em (Carnielli et al. 2015). Para auxiliar a interpretação biológica dos dados foi utilizado o aplicativo BINGO do software Cytoscape que realiza análise de enriquecimento dos termos de anotação de Ontologia de Genes (Gene Ontology; www.geneontology.org).

Além disso, também foram realizadas análise de enriquecimento de vias metabólicas utilizando-se anotação da Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (KEGG; www.genome.jp/kegg/) e ferramenta Pathview para visualização das vias metabólicas enriquecidas comparando-se as condições.

3.4. Determinação dos metabólitos primários e lipídios

O protocolo de extração dos metabólitos e lipídios foi baseado em Caldana et al. (2013), Jüppner et al. (2017) e Mubeen et al. (2019). Resumidamente, *pellets* de células de *C. reinhardtii* após centrifugação (4000 x g, 5 minutos, 4 °C) de 10 mL de suspensão celular contendo entre 10 a 15 x10⁶ células foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C. Com os tubos encostados em gelo seco ressuspendeu-se os pellets congelados com 1 mL de tampão gelado de MTBE (Metanol: Methyl-Tertiar-Butyl-Ether, 1:3, v/v, UPLC-grade, Sigma Aldrich) através de vórtex até homogeneizar. Após transferir para tubo de 2 mL sonicou-se em ciclo de 20 segundos por 2 vezes com amplitude de 30% e incubou-se as amostras em agitador orbital à 4°C durante 1 hora. Foi adicionado 500 µL de tampão de metanol: água (1:3, v/v, UPLC-grade, Sigma Aldrich), homogeneizado com vórtex por 30 segundos e em seguida, centrifugou-se a 17000 x g por 10 minutos à 4 °C. As duas fases formadas foram aliquotadas em tubos diferentes, secos em concentrador a vácuo (*speedvac*) e armazenados em freezer -80°C. A fase superior refere-se aos metabólitos apolares (lipídios e clorofila), a fase inferior refere-se aos metabólitos polares e semi-polares (metabólitos primários) e o pellet contém proteínas e amido.

3.4.1. Determinação dos metabólitos primários

Os pellets secos dos metabólitos polares e semi-polares foram derivatizados usando método descrito em Caldana et al. (2013) e em seguida injetados em GC-TOF-MS (cromatografia gasosa acoplada à

espectrometria de massa em tempo de voo - LECO) conforme descrito anteriormente (Krall et al. 2009; Caldana et al. 2013; Salem et al. 2016; Jüppner et al. 2017).

Os dados do GC-TOF-MS foram processados usando o software ChromaTOF e o pacote TargetSearch em R. A qualidade dos picos nos cromatogramas foi verificada observando o perfil de um padrão de FAMES (ésteres metílicos de ácidos graxos) e o TIC (Quantidade total de íons) no software ChromaTOF. Foram verificadas tanto a sobreposição dos FAMES entre as amostras quanto a diferença do TIC entre as amostras. Em seguida, para prosseguir para a correção do tempo de retenção (RT), os valores de RT inferior e superior dos FAMES (**Figura 6**) foram utilizados como um dos inputs no pacote Target Search do R. Essas informações de cada pico dos FAMES foram utilizadas para o alinhamento dos cromatogramas.

Figura 6. Cromatogramas dos padrões FAMES.

Seleção do tempo de retenção (RT) de cada FAME no software ChromaTOF. O RT de todos os 13 picos foi anotado e usado como entrada no pacote Target Search do R.

Além da correção dos FAMES, outro input no pacote Target Search do R é a biblioteca de metabólitos, que contém informações sobre cada metabólito, como o índice de retenção (IR), a massa do metabólito e a massa de fragmentação. A validação dos cromatogramas foi o próximo passo, realizado no ChromaTOF após a deconvolução dos picos. Cada pico de metabólito foi verificado com a massa/carga correspondente no espectrograma MS (**Figura 7**).

Figura 7. Exemplo de cromatograma para metabólito analisado e espectrogramas usados na validação de identificações de metabólitos utilizando o software ChromaTOF

Após a identificação, quantificação e validação de cromatogramas, os valores quantitativos de todos os metabólitos foram normalizados pelo número de células de cada amostra e pela média da quantidade total de íons (TIC). Com esses dados normalizados, o próximo passo foi realizar a análise de dados usando visualização de dados e análise estatística.

3.4.2. Determinação dos metabólitos apolares

Para análise de lipídios, os pellets secos dos metabólitos apolares foram ressuspensos em uma mistura de acetonitrila:isopropanol (7:3) e processadas conforme descrito anteriormente (Hummel et al. 2011; Jüppner et al. 2017). A detecção de diferentes classes de lipídios foi realizada utilizando-se UPLC-MS (Cromatografia Líquida de Ultra-Desempenho, acoplada à espectrometria de massa de tempo de voo - THERMO).

Os dados da UPLC-MS foram processados usando o software Thermo Xcalibur, ToxID e R. Resumidamente, o software Thermo Xcalibur foi usado em um primeiro momento para validar manualmente a anotação lipídica, verificando a massa de cada pico do cromatograma e comparando com uma biblioteca lipídica desenvolvido pelo Instituto Max Planck de Fisiologia Molecular de PLantas (MPIMP) (**Figuras 8 e 9**). As classes lipídicas identificadas e verificadas foram: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI), monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG), TAG, 1,2 diacilgliceril-3-O-4'- (N, N, N-trimetil) -homoserina (DGTS).

Outra etapa de validação foi realizada, conforme descrito por Hummel et al. (2011). A massa e o tempo de retenção de cada classe lipídica foram plotados, em um gráfico de dispersão, para verificar se uma série diagonal aparece nas plotagens. Isso ocorre porque os lipídios geralmente variam pouco entre as diferentes espécies de uma classe lipídica (extensão da cadeia de ácidos graxos ou grau de saturação). Portanto, eles podem ter um comportamento sistemático de massa e tempo de retenção, como pode-se observar na **Figura 10**.

Figura 8. Cromatogramas de íons totais de lipídios.

Exemplos de um cromatograma de íons totais no modo de íon positivo de uma amostra repleta de N (A) e uma amostra de privação de N (B). Os cromatogramas indicam o perfil característico do tempo de retenção dos lipídios TAGs, como referido em Hummel et al. (2011).

Figura 9. Exemplo de um espectro de massas típico de lipídios da classe DGTS.

O espectro de massa de diferentes espécies lipídicas está plotado, onde cada linha da imagem se refere a uma espécie lipídica da classe DGTS32. As informações no lado direito são a massa de referência para cada espécie lipídica. O grau de saturação em cada espécie causa a diferença nos tempos de massa e retenção observados.

Figura 10. Gráficos de dispersão dos perfis lipídicos.

Gráfico de dispersão de todos os lipídios anotados como triacilgliceróis (TAG), sulfoquinovosildialilglicerol (SQDG), fosfatidilcolina (PC) e digalactosildialilglicerol (DGDG) como exemplo da validação.

O próximo passo foi utilizar o software ToxID para realizar a identificação dos lipídios e a quantificação relativa em todas as amostras, utilizando as informações da massa de espécies lipídicas e do tempo de retenção. Finalmente, todos os dados foram normalizados por número de células e média de TIC.

3.5. Análise de dados e estatística

Numa primeira etapa os dados foram analisados de forma independente como indicado na **Figura 11**, assim como a interpretação dos resultados. As análises dos dados do proteoma foram realizadas utilizando códigos de R, softwares Perseus (Tyanova et al., 2016) e Cytoscape (www.cytoscape.org) que permitem a realização de análises estatísticas e de bioinformática para a anotação e interpretação biológica, conforme previamente sugerido em Carnielli et al. (2015). Após o teste de hipóteses de múltiplas amostras ANOVA (Análise de Variância, $p\text{-value} < 0.05$) a análise de enriquecimento dos termos de anotação do Gene Ontology (Gene Ontology; www.geneontology.org) foi realizada usando o aplicativo BINGO no software Cytoscape. Para comparar dados ômicos com outros estudos e identificar redes de coexpressão, foi utilizada a plataforma Phycomine (<https://phycomine.iq.usp.br/>).

Para metabólitos e lipídios, a normalização e a análise estatística foram feitas usando scripts em R (<https://www.r-project.org/>) e ferramentas disponíveis online na plataforma MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) conforme exemplificado no fluxo de trabalho de análise de dados (**Figura 11**).

Figura 11. Etapas das análises de dados. A maior parte da análise de dados foi feita em R e MetaboAnalyst. Dados de proteômica, metabólitos primários e lipídios foram analisados separadamente.

Numa segunda etapa os dados foram analisados e interpretados de forma integrativa utilizando o método computacional ManiNet Cluster (Nguyen et al. 2019), o qual é baseado em aprendizado de variedade (*manifold learning*). Estas análises foram realizadas em colaboração com o pesquisador Dr Alexandre V. Fassio. Um dos diferenciais deste método é a capacidade de reduzir a dimensionalidade dos dados de forma não linear, o que consequentemente facilita a visualização dos dados. Além disso, a interpretação dos dados pode ser mais próxima do que ocorre nas células, pois geralmente, as moléculas de uma rede biológica interagem com outras de forma não linear (Nguyen et al., 2019). Outra funcionalidade do método é a capacidade de comparar dados de séries temporais e redes geradas de diferentes condições experimentais de forma não supervisionada, evitando, por exemplo, perder relações funcionais desconhecidas (Nguyen et al., 2019). As moléculas (proteínas, metabólitos e lipídios) foram conectadas pelo seu nível de abundância através da construção de uma rede de co-expressão para cada tratamento e posteriormente, os dois conjuntos de dados (controle e tratamento) foram agrupados, assim como os 3 dados ômicos. Na sequência, medidas de centralidade foram calculadas baseadas na estrutura das redes de co-expressão construídas. As análises de centralidade de uma rede biológica têm como objetivo principal identificar moléculas chaves do sistema biológico e suas interações (Nguyen et al., 2019). Foram calculadas a centralidade de grau (*degree centrality*), a proximidade (*closeness centrality*) e a

intermediação (*betweenness centrality*). Novas redes foram construídas com o intuito de se visualizar a localização das componentes com maior e menor centralidade.

4. RESULTADOS

4.1. Resposta fenotípica de *C. reinhardtii* sob privação de Nitrogênio

Para acompanhar as respostas fisiológicas da microalga em privação de N e traçar um paralelo com os dados ômicos foram obtidos os valores de concentração celular, concentração de proteínas, fluorescência dos lipídeos neutros e o consumo de amônio (NH_4^+).

Verificou-se que, mesmo após a privação de N (-N), o crescimento de *C. reinhardtii* continuou por até 48h, provavelmente as custas de N armazenado nas macromoléculas como proteínas e ácidos nucleicos. Nesta condição (-N), a limitação do crescimento foi verificada apenas após 48 horas (**Figura 12, B**).

Figura 12. Resposta fenotípica de *C. reinhardtii* em condição controle (A) e sob privação de nitrogênio (B). Perfil de crescimento (verde), produção de lipídios neutros (amarelo) e concentração de proteína por célula (cinza) em *C. reinhardtii*. Gráfico com coloração cinza indica período antes da troca do meio (condição padrão de cultivo) e coloração branca período após mudança do meio de cultura. As barras indicam desvio padrão (n=3).

Em contrapartida, na condição controle (+N), a qual apresentou suficiente concentração de NH_4^+ durante as 72 horas de experimento (**Figura 12**), não se observou limitação de crescimento, este manteve-se em fase exponencial (**Figura 12, A**).

A condição -N apresentou decaimento da concentração proteica em 1.2, 2.1, 2.8 e 3.1 vezes após 6h, 24h, 48h e 72h de privação de N, respectivamente, em relação ao ponto de tempo -24h (**Figura 12, A**). Este resultado confirma uma das respostas conhecidas à privação de N que é a degradação e *turnover* de proteínas (**Figura 12, B**). Diferentemente, na condição +N, a concentração de proteína por célula manteve-se constante até 72h (**Figura 13, A**).

Figura 13. Consumo de amônio por *C. reinhardtii* ao longo do tempo nas condições de privação de N (-N) e controle (+N). Gráfico com coloração cinza indica período antes da troca do meio (condição padrão de cultivo) e coloração branca período após mudança do meio de cultura. As barras indicam desvio padrão (n=3).

Com relação a produção de lipídeos neutros, enquanto na condição +N as fluorescências medidas foram constantes das 6 h às 72h após mudança do meio de cultura, a condição -N apresentou aumento na fluorescência de 1.6, 2.4 e 4.5 vezes após 24h, 48h e 72h de privação de N, respectivamente, em relação ao ponto de tempo -24h. Aparentemente, o maior acúmulo de lipídeos neutros ocorreu quando a concentração celular atingiu o ponto de estabilização, após 48 horas de privação de nitrogênio. Esta acumulação dos lipídios neutros foi confirmada pelo aumento de corpos lipídicos dentro das células expostas à privação de N através da observação das micrografias de fluorescência (**Figuras 14 e 15**).

Figura 14. Microscopia de fluorescência de células sob privação de N coradas com Nile Red e DAPI. Micrografias sem nenhum filtro (*Bright field*) na esquerda e com filtros Rhodamina e DAPI sobrepostos à direita, permitindo observar o núcleo (em azul) e os corpos lipídicos (círculos vermelhos dentro das células). Barra de escala: 4.39 μm .

Figura 15. Microscopia de fluorescência de células em condição controle coradas com Nile Red e DAPI. Micrografias sem nenhum filtro (*Bright field*) na esquerda e com filtros Rhodamina e DAPI sobrepostos à direita, permitindo observar o núcleo (em azul) e os corpos lipídicos (círculos vermelhos dentro das células). Barra de escala: 4.39 μm .

4.2. Efeito da privação do N no proteoma de *C. reinhardtii*

Foram identificadas 954 proteínas após pré-processamento dos dados proteômicos no software Perseus (1.6.2.2) e filtragem das proteínas pela quantidade de números válidos utilizando script do R desenvolvido no laboratório. Para a determinação das proteínas válidas, estabeleceu-se que uma dada proteína deveria ser detectada em pelo menos um dos pontos de tempo amostrados e obrigatoriamente em 2 réplicas biológicas. As proteínas não caracterizadas nesta condição foram desconsideradas nas análises subsequentes.

As triplicatas biológicas apresentaram alta correlação de Pearson, indicando que são bastante similares, enquanto a correlação entre as condições controle (+N) e privação de N (-N) foi baixa (**Figura 16**). Interessantemente, na condição -N houve baixa correlação entre os pontos de tempo iniciais (-24h, 1h e 2h) e pontos de tempo tardios (24h, 48h e 72h), indicando alteração no proteoma ao longo do tempo nesta condição. Este efeito não foi observado em +N, indicando menor variação ao longo do tempo.

Figura 16. Correlação de Pearson entre os conjuntos de dados proteômicos indicados em mapa de calor. As amostras representadas são das condições controle (+N) e privação de N (-N) em cada ponto de tempo: -24h (24 horas antes da mudança do meio), 1h, 2h, 4h, 6h, 24h, 48 e 72h após a mudança do meio. Os números _1, _2 e _3 indicam as triplicatas biológicas de cada ponto de tempo.

A Análise de Componente Principal (PCA) indicou uma clara separação entre as condições +N e -N, (**Figura 17**), provavelmente causado pela privação de N, que pode ter sido responsável por 37.2% da variação no Componente Principal (PC) 1. Já o PC2, contribuiu com 14.2% da variação e pode estar relacionado com o efeito do tempo.

Figura 17. Análise de Componente Principal (PCA) da média da concentração relativa do proteoma nas duas condições estudadas, controle (preto) e privação de N (cinza). PC1 (Principal Component 1) e PC2 (Principal Component 2) contribuíram com 37.2% e 14.2% da variação do proteoma, respectivamente.

Verificou-se que a abundância relativa das proteínas foi alterada, tanto comparando as diferentes condições, quanto a comparação entre os diferentes pontos de tempo, sendo mais proeminente a alteração na condição -N, com proteínas que aumentaram sua abundância após 24h, enquanto outras diminuíram (**Figura 18**). Para identificar proteínas com diferenças significativas estatisticamente em sua abundância, foi realizado o teste de hipóteses de múltiplas amostras ANOVA (Análise de Variância, p-value <0.05) para cada condição testada (+N e -N).

Figura 18. Mapa de calor com a mediana da variação da abundância relativa das proteínas identificadas. Análise de agrupamento hierárquico da abundância média relativa de 954 proteínas em ambas as condições experimentais (privação de N e controle) para os pontos de tempo -24h, 1h, 2h, 4h, 6h, 24h, 48h, 72h em condição de fotoautotrofia.

Das 954 proteínas identificadas, 72 foram da condição +N, 458 exclusivas da condição -N e 292 tiveram alteração significativa em sua abundância comparando as duas condições (**Figura 19**). As análises de enriquecimento dos termos do Gene Ontology (GO), na condição de -N, revelaram proteínas alteradas envolvidas com processo glicolítico ($p\text{-valor} = 4,33 \times 10^{-4}$), processo metabólico de arginina ($p\text{-valor} = 1,61 \times 10^{-3}$), síntese de ATP acoplado ao transporte de prótons ($p\text{-valor} = 5,15 \times 10^{-3}$), iniciação da tradução ($p\text{-valor} = 3,33 \times 10^{-2}$), biossíntese de aminoácidos aromáticos ($p\text{-valor} = 3,33 \times 10^{-2}$), processo metabólico de glicose ($p\text{-valor} = 3,33 \times 10^{-2}$) e regulação da tradução ($p\text{-valor} = 3,33 \times 10^{-2}$). Na condição controle a análise de enriquecimento indicou proteínas de aminoacilação da valina no RNA transportador (tRNA) ($p\text{-valor} = 1,34 \times 10^{-2}$), enquanto para ambas as condições foram alteradas proteínas de detoxificação celular ($p\text{-valor} = 9,84 \times 10^{-5}$), resposta ao estresse oxidativo ($p\text{-valor} = 3,77 \times 10^{-3}$), fotossíntese ($p\text{-valor} = 2,43 \times 10^{-2}$) e aminoacilação do Seril-tRNA ($p\text{-valor} = 4,31 \times 10^{-2}$).

Figura 19. Proteínas significativamente alteradas ao longo do tempo (ANOVA, $p < 0,05$), compartilhadas entre as duas condições (controle e privação de N) e exclusivas de cada condição. Os termos funcionais enriquecidos do Gene Ontology (GO) estão indicados.

Com o objetivo de identificar proteínas que apresentaram perfis de abundância similares ao longo do tempo e identificar respostas iniciais e tardias, foi utilizado o pacote do R *mclust* para realização da análise de agrupamento para as proteínas que foram estatisticamente alteradas nas duas condições (-N e +N). Para a condição controle, 28 *clusters* foram identificados (**Figura 20**), enquanto para a condição de privação de N foram 35 *clusters* (**Figura 21**), os quais foram separados de acordo com o tipo de alteração na abundância das proteínas como: resposta inicial (1-6 horas) ou tardia (24-72 horas), *up* ou *down regulated*, alteração contínua ao longo do tempo ou alteração em um período específico no tempo (**Figuras 20 e 21**).

Figura 20. Clusterização do proteoma total na condição controle (+N) de acordo com o perfil de expressão. 28 clusters foram gerados pelo pacote do R Mclust (Scrucca et al., 2016).

Para verificar os processos biológicos e moleculares nestes diferentes grupos de proteínas foi realizada a análise de enriquecimento dos termos de anotação do GO. Na condição +N, verificou-se nos primeiros pontos de tempo (entre 1 e 4 horas após a mudança de meio) picos de redução da abundância de 95 proteínas relacionadas à geração de metabólitos precursores e energia ($p\text{-valor} = 3,25 \times 10^{-2}$) e fotossíntese ($p\text{-valor} = 4,28 \times 10^{-2}$), as quais retornaram à concentração inicial entre 6 e 72 horas (**Figura 20, A**). Já 68 proteínas enriquecidas com a anotação de tradução ($p\text{-valor} = 3,62 \times 10^{-6}$) apresentaram picos de aumento da concentração entre 1 e 6 horas após a transferência para o novo meio (**Figura 20, A**). 49 proteínas relacionadas ao processo biossintético de compostos organonitrogenados ($p\text{-valor} = 2,56 \times 10^{-2}$) tiveram picos de redução após 24 horas (**Figura 20, B**). Devido à grande variação da abundância das proteínas entre os pontos de amostragem, 137 proteínas foram classificadas como “alteradas repetidamente ao longo do tempo” (**Figura 20, C**), principalmente

nos pontos iniciais (1 a 6 horas). Este grupo de proteínas foi enriquecido nos termos de fotossíntese (captação de luz) (p-valor = $3,67 \times 10^{-2}$) e detoxificação celular (p-valor = $3,67 \times 10^{-2}$) da anotação do GO.

Na condição de privação de N também se agrupou as proteínas significativamente alteradas, de acordo com o perfil dos clusters gerados. Após a mudança para o meio de cultura sem N, a abundância de algumas proteínas foi alterada logo no início da contagem do tempo (entre 1 e 6 horas) (**Figura 21, A**), enquanto outras tiveram uma resposta tardia à privação de N (após 24 horas) (**Figura 21, D**).

Figura 21. Clusterização do proteoma total na condição de privação de N (-N) de acordo com o perfil de expressão. 35 clusters foram gerados pelo pacote do R Mclust.

A análise de enriquecimento dos termos de anotação do GO indicou que 118 proteínas relacionadas à transporte transmembrana de prótons (p-valor = $3,0 \times 10^{-4}$), processo metabólico de ácido carboxílico (p-valor = $3,75 \times 10^{-3}$), processo metabólico do ATP (p-valor = $1,29 \times 10^{-3}$) e transporte de elétrons na cadeia respiratória (p-valor = $1,74 \times 10^{-3}$) aumentaram a concentração relativa de forma contínua de 1 a 72 horas após a mudança para a condição de privação de N (**Figura 21, A**). Diferentemente, 119 proteínas envolvidas com tradução (p-valor = $2,55 \times 10^{-18}$) e captação da luz na fotossíntese (p-valor = $1,93 \times 10^{-2}$) diminuíram sua abundância continuamente

após a privação de N (**Figura 21, A**). Das proteínas que tiveram uma alteração adiantada em sua abundância, entre 1 e 6 horas, e retornaram à concentração inicial (**Figura 21, B**), 79 foram mais expressas e enriquecidas com termos de anotação do GO de aminoacilação de fenilalanil no tRNA (p-valor = $5,36 \times 10^{-3}$) e ligação de proteínas desdobradas (p-valor = $1,31 \times 10^{-3}$). Enquanto as 109 proteínas *down regulated* entre 1 e 6 horas apresentaram enriquecimento dos termos de aminoacilação de seril no tRNA (p-valor = $1,83 \times 10^{-2}$) e remoção de radicais superóxidos ($2,81 \times 10^{-2}$) (**Figura 21, B**).

Resultados semelhantes de enriquecimento dos termos de anotação do GO foram observados na resposta tardia à privação de N (**Figura 21, D**), mas com adição de novos termos além dos observados na resposta adiantada. 106 proteínas com função de biossíntese de arginina (p-valor = $7,33 \times 10^{-5}$), transporte transmembrana de prótons (p-valor = $9,93 \times 10^{-5}$), respiração celular (p-valor = $2,95 \times 10^{-3}$), detoxificação oxidante celular (p-valor = $5,82 \times 10^{-3}$), biossíntese de compostos que contém purina (p-valor = $1,11 \times 10^{-2}$) e cadeia de transporte de elétrons (p-valor = $2,32 \times 10^{-2}$) aumentaram sua abundância após 24 horas. Enquanto 182 proteínas relacionadas à tradução (p-valor = $2,97 \times 10^{-40}$), constituinte estrutural do ribossomo (p-valor = $1,68 \times 10^{-38}$), processo biossintético da clorofila (p-valor = $1,84 \times 10^{-2}$), processo metabólico de composto que contém pteridina (p-valor = $2,87 \times 10^{-2}$), aminoacilação do tRNA (p-valor = $2,87 \times 10^{-2}$) e processo metabólico de metionina (p-valor = $3,4 \times 10^{-2}$) diminuíram sua abundância após 24 horas (**Figura 20, D**).

4.3. Efeito da privação de N no proteoma nuclear de *C. reinhardtii*

Paralelamente ao proteoma total, também foram estudadas as possíveis proteínas reguladoras envolvidas com a resposta adiantada à privação de N em *C. reinhardtii*. Para tanto, foram comparadas as proteínas nucleares após 1 hora sob privação de N (-N) *versus* condição repleta de N (+N). Os experimentos foram conduzidos nas mesmas condições do proteoma total (fotoautotrofia, aeração de ar atmosférico, iluminação contínua de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$).

O enriquecimento nuclear foi monitorado por microscopia de fluorescência pelo marcador DAPI das amostras antes e após o procedimento de enriquecimento dos núcleos. Observou-se células intactas antes do enriquecimento, com os núcleos corados em azul dentro das células (**Figura 22, A e B**), e núcleos isolados após o enriquecimento, sem visualização de contaminação por cloroplasto ou outros plastídios (**Figura 22, C e D**).

Figura 22. Micrografias antes (A e B) e após enriquecimento de núcleos (C e D). Micrografias de fluorescência com núcleos celulares azuis corados com o marcador DAPI (A e C). Micrografias em *bright field* (B e D).

Foram identificadas 660 proteínas extraídas das amostras enriquecidas com núcleos, sendo 149 com abundância significativamente diferente ($p < 0,05$) sob privação de N. Esta lista foi ainda mais reduzida com uma previsão baseada em homologia de localização subcelular, resultando em 77 proteínas diferencialmente abundantes com localização nuclear prevista (**Tabela 1**). O *fold change* foi calculado relativo às amostras da condição controle (+N) e foi verificado se houve aumento (*up regulated*) ou diminuição (*down regulated*) da abundância, comparando com o controle. Também se verificou se estas proteínas foram identificadas no proteoma total.

Utilizou-se o banco de dados SUBA4 (Subcellular Localization DataBase for Arabidopsis Proteins, <https://suba.live>) para predição da sublocalização celular das proteínas encontradas por homologia de sequência (BLASTP) em *Arabidopsis thaliana* (Arias et al., 2020) (**Figura 23**). A comparação da localização subcelular das proteínas identificadas no proteoma total e nuclear revelou maior porção de proteínas nucleares (41%) no proteoma nuclear do que no proteoma total (6%), enquanto a quantidade de proteínas preditas em plastídios, citosol e mitocôndria foi maior no proteoma total (47%, 30% e 11%, respectivamente) do que no proteoma nuclear (30%, 20%, 5%, respectivamente) (**Figura 23**).

Tabela 1. Proteínas significativamente alteradas na condição de privação de N com localização nuclear predita. (1) Identificador da proteína no genoma de *Chlamydomonas reinhardtii* v5.5, Phytozome v12, Joint Genome Institution; (2) Descrição da proteína; (3) Proteínas identificada no proteoma total, onde N.D. significa não detectado.

Protein ID (1)	Description (2)	Fold Change	Expression	p-val	Sample (3)
<i>Transcription Related and mRNA processing</i>					
Cre17.g705550.t1.2	THO complex subunit 5	-	Upregulated	8.62E-07	N.D.
Cre03.g208000.t1.1	Uncharacterized; Putative nucleic acid binding protein	-	Upregulated	3.85E-06	N.D.
Cre09.g398650.t1.2	Putative CACTIN-like protein	-	Upregulated	3.23E-05	N.D.
Cre01.g036600.t1.2	RNA exonuclease EXN3	-	Upregulated	4.74E-05	N.D.
Cre02.g073550.t1.2	Nucleosome assembly protein-like (NAP1L)	-	Upregulated	7.06E-05	Detected
Cre06.g259800.t1.2	Pre-mRNA splicing factor CWC22	-	Upregulated	0.000783974	N.D.
Cre06.g285401.t1.1	Putative Bacterial DNA-binding/histone-like protein	-	Upregulated	0.000462761	Detected
Cre03.g177053.t1.1	TATA-binding protein interacting (TIP120)	0.377360823	Upregulated	0.019623593	N.D.
Cre12.g520650.t1.2	Tubby-like protein (TLP1)	0.22045803	Upregulated	0.021973625	Downregulated
Cre11.g477850.t1.1	Transcriptional coactivator-like protein (TXC1)	0.521546363	Upregulated	0.040277031	Upregulated
Cre17.g702650.t1.1	Uncharacterized; HMG-box containing	-	Downregulated	1.38E-06	Detected
Cre09.g404400.t1.2	Histone deacetylase complex subunit SAP18	-	Downregulated	3.36E-06	N.D.
Cre01.g038650.t1.2	Serine-arginine-rich splicing factor SRS2	-	Downregulated	1.61E-05	N.D.
Cre16.g695300.t1.1	THO complex subunit 1	-	Downregulated	2.49E-05	N.D.
Cre06.g278128.t1.1	Putative Histone acetyltransferase	-	Downregulated	2.74E-05	N.D.
Cre17.g719000.t1.2	UAP56 DEAD/DEAH box helicase homolog, Exon junction complex component	-	Downregulated	6.26E-05	Detected
Cre04.g226450.t1.1	Nuclear pre-mRNA splicing factor 17 (PRP17)	-	Downregulated	6.87E-05	N.D.
Cre10.g427150.t1.2	Pre-mRNA-splicing factor ISY1 (SPL16)	-	Downregulated	0.000296624	N.D.
Cre05.g241300.t1.2	Small nuclear ribonucleoprotein SmF	-	Downregulated	0.000331059	N.D.
Cre12.g540076.t1.1	Putative FACT complex subunit CDC68-like	-	Downregulated	0.000412576	N.D.
<i>Translation Related</i>					
Cre11.g480150.t1.2	Ribosomal protein S14	-	Upregulated	5.89E-08	Detected
Cre01.g015600.t1.1	Translational Activator GCN1	-	Upregulated	2.32E-05	N.D.
Cre07.g352800.t1.2	Putative Translation elongation factor EF-1a	-	Upregulated	2.84E-05	N.D.
Cre02.g145231.t1.2	MAK16-like protein	-	Upregulated	5.78E-05	N.D.
Cre10.g417700.t1.2	Ribosomal protein L3	-	Upregulated	0.00011315	Detected
Cre07.g351750.t1.2	rRNA-processing protein EBP2	-	Upregulated	0.000176402	N.D.
Cre08.g360900.t1.2	Ribosomal protein S15	-	Upregulated	0.000188463	Upregulated
Cre10.g429100.t1.2	Putative Bifunctional Glutamate/Proline tRNA ligase	-	Upregulated	0.000236594	Detected
Cre11.g467578.t1.1	Ribosomal protein L28e	-	Upregulated	0.001078577	Detected
Cre12.g528750.t1.2	Ribosomal protein L12	-	Upregulated	0.002735679	Detected
Cre13.g573351.t1.2	Ribosomal protein S16e	0.45964877	Upregulated	0.041975897	Detected
Cre10.g432800.t1.2	Ribosomal protein Sa	-	Downregulated	8.76E-06	Detected
Cre11.g467547.t1.1	Glutamyl/glutaminyl-tRNA synthetase GTS1	-	Downregulated	1.84E-05	Detected
Cre12.g529400.t1.2	Ribosomal protein S27e isoform 1	-	Downregulated	2.66E-05	Detected
Cre16.g676314.t1.1	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit H (EIF3H)	-	Downregulated	4.07E-05	Downregulated
Cre06.g267100.t1.2	Subunit of the Signal Recognition Particle (SRP68)	-	Downregulated	5.19E-05	N.D.
Cre04.g218850.t1.2	Ribosome production factor 1 (RPF1)	-	Downregulated	0.000401628	N.D.
Cre14.g617900.t1.2	Ribosomal protein L35	-	Downregulated	0.000731998	Detected
Cre09.g400650.t1.2	Ribosomal protein S6	-0.876200993	Downregulated	0.016829402	Detected
Cre17.g697450.t1.2	Translation initiation factor 3, subunit L (EIF3L)	-0.628339767	Downregulated	0.038177539	N.D.
<i>Nucleolus related</i>					
Cre11.g480800.t1.2	U3 small nucleolar RNA-associated protein 23 (UTP23)	-	Downregulated	6.02E-06	N.D.
Cre09.g391652.t1.1	Nucleolar complex protein 2 (NOC2)	-	Downregulated	7.07E-06	N.D.
Cre13.g573050.t1.2	U3 small nucleolar RNA-associated protein 11 (UTP11)	-	Downregulated	0.000119487	N.D.
Cre01.g068377.t1.1	U3 small nucleolar RNA-associated protein 19 (UTP19)	-	Downregulated	0.000370155	N.D.
Cre06.g275100.t1.2	Nucleolin (NCL)	-	Downregulated	0.001741549	Detected
<i>Cell structure and mobility</i>					
Cre05.g242350.t1.2	Calcium Transporting ATPase 1	-	Upregulated	6.71E-05	N.D.
Cre16.g672200.t1.1	Putative Centrosome-associated protein 350	-	Upregulated	0.000142959	N.D.
Cre06.g283550.t1.1	Centrin-2 (CRC2)	-	Upregulated	0.000270959	N.D.
Cre12.g553050.t1.2	Putative nuclear pore complex protein Nup53	-	Upregulated	0.000807215	N.D.
Cre03.g177950.t1.1	Mucin 14A	-	Downregulated	3.07E-07	N.D.
Cre13.g591900.t1.2	Putative Mitochondrial cardiolipin hydrolase (PLD6)	-	Downregulated	1.15E-06	N.D.
Cre11.g468356.t2.1	Nucleoprotein TPR	-	Downregulated	3.56E-06	N.D.
Cre12.g521750.t1.2	Putative Nup133 N terminal like	-	Downregulated	3.74E-06	N.D.
Cre05.g232600.t1.1	Gametolysin	-0.69048977	Downregulated	0.044785632	N.D.
<i>Cell maintenance</i>					
Cre10.g432000.t1.2	UV-damaged DNA binding complex subunit 1 protein (DDB1)	-	Upregulated	1.25E-05	N.D.
Cre09.g416750.t1.2	T-complex protein 1, beta subunit (CCT2)	-	Upregulated	0.000128364	Downregulated
Cre12.g546650.t1.2	Ubiquitin-conjugating enzyme UBC23	-	Upregulated	0.000169179	N.D.
Cre10.g439100.t1.2	T-complex protein 1, alpha subunit (CCT1)	-	Upregulated	0.00031328	Detected
Cre12.g528000.t1.2	Putative AMP-Activated Protein Kinase, Gamma Subunit	0.495469413	Upregulated	0.040017297	Detected
Cre03.g178600.t1.1	DNA topoisomerase I (TOP1)	-	Downregulated	4.20E-07	N.D.
Cre12.g508500.t1.2	Putative Gly-Xaa carboxypeptidase	-	Downregulated	6.94E-05	N.D.
Cre14.g629300.t1.1	Putative ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	-	Downregulated	8.72E-05	N.D.
Cre17.g708300.t1.2	26S proteasome regulatory complex, subunit RPN12	-	Downregulated	0.000308289	Detected
Cre09.g414050.t1.2	RuvB-like protein 1	-0.184057237	Downregulated	0.025991477	N.D.
Cre01.g040250.t1.2	DnaJ-like protein DNJ9	-0.36046791	Downregulated	0.010664879	N.D.
<i>Uncharacterized</i>					
Cre01.g002861.t1.1	Uncharacterized	-	Upregulated	3.35E-06	N.D.
Cre12.g553100.t2.1	Uncharacterized	-	Upregulated	3.20E-05	N.D.
Cre06.g257700.t1.1	Uncharacterized	-	Downregulated	5.89E-07	N.D.
Cre09.g398200.t2.1	Uncharacterized; Kelch repeat containing	-	Downregulated	4.35E-07	N.D.
Cre09.g403145.t1.1	Uncharacterized	-	Downregulated	7.48E-05	N.D.
Cre10.g452200.t1.1	Uncharacterized	-	Downregulated	3.71E-05	N.D.
Cre07.g352650.t1.2	Uncharacterized	-	Downregulated	1.07E-05	N.D.
Cre02.g111800.t1.2	Uncharacterized	-	Downregulated	0.000438607	Detected
Cre03.g176050.t1.2	Uncharacterized	-	Downregulated	0.000418578	N.D.
Cre12.g518300.t1.2	Uncharacterized; Coiled-Coil Domain containing	-	Downregulated	0.000132137	N.D.
Cre16.g682750.t1.2	Uncharacterized	-	Downregulated	0.001068592	N.D.
Cre03.g152750.t1.1	Uncharacterized; BAG-domain containing family	-1.19231844	Downregulated	0.015704825	Downregulated

O enriquecimento dos termos do Gene Ontology (GO) foi realizado para as proteínas com diferença significativa em sua abundância (149 proteínas) em resposta à privação de N, sendo os 3 termos mais significativos: tradução (p-valor = $9,55 \times 10^{-9}$), processo biosintético de peptídeo (p-valor = $9,55 \times 10^{-9}$) e processo metabólico de peptídeo (p-valor = $9,55 \times 10^{-9}$).

Figura 23. Localização subcelular das proteínas identificadas no proteoma nuclear e no proteoma total. A partir das proteínas identificadas em *C. reinhardtii*, homólogos de *A. thaliana* foram identificados com BLASTP e suas localizações subcelulares foram identificadas no banco de dados SUBA4. "Other" inclui localizações com representação menor que 1% como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vacúolo.

As proteínas fatores de transcrição (TF) e reguladores transcricionais (TR) encontradas nas amostras enriquecidas com núcleos celulares após 1 hora em condição +N e -N, foram reanotadas através da base de dados PlnTFDB (Plant Transcription Factor Database, <http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/>) com a versão mais atualizada do genoma de *C. reinhardtii* v5.6 (Joint Genome Institution, <https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), resultando em 16 TFs e 7 TRs (**Tabela 2**). Uma proteína TF (Cre12.g520650.t1.2, Tubby-like protein) e uma TR (Cre17.g702650.t1.1, HMG-box containing) tiveram diferença significativa em sua abundância comparando as condições +N e -N, sendo a primeira *up regulated* em -N e a segunda foi indetectada apenas em +N. Estas proteínas também foram identificadas no proteoma total, sendo o TF (Cre12.g520650.t1.2, Tubby-like protein) exclusivo em -N no ponto de tempo de 1h e o TR (Cre17.g702650.t1.1, HMG-box containing) não foi detectado no ponto de tempo de 1h do proteoma total, mas foi identificado em outros pontos de tempo (**Tabela 2**).

Tabela 2. Fatores de transcrição (TFs) e reguladores transcricionais (TRs) identificados no proteoma nuclear. (1) Identificador da proteína no genoma de *Chlamydomonas reinhardtii* v5.5, Phytozome v12, Joint Genome Institution; (2) Descrição da proteína; (3) Famílias de TF/TR: anotação de PlnTFDB v3.0 atualizada para genoma de *C. reinhardtii* v5.6. (4) Proteínas identificadas no proteoma total, onde N.D. significa não detectado. Proteínas com p-valor < 0,05 estão indicadas (*).

Protein ID (1)	Description (2)	Family (3)	Type	Fold Change	p-val	Whole-cell Sample (4)
<i>Transcription Factors</i>						
Cre12.g520650.t1.2	Tubby-like protein (TLP1)	TUB	TFF	0.220	2.20E-02 *	Detected
Cre02.g073650.t2.1	Pre-mRNA splicing factor 19 (PRP19)	Top	TFF	-0.327	3.01E-01	Detected
Cre07.g318702.t1.1	DDB1- and CUL4-associated factor 13 (DCAF13)	Top	TFF	0.103	3.72E-01	N.D.
Cre10.g466250.t1.2	U3 small nucleolar RNA-associated protein 21 (UTP21)	Top	TFF	0.088	7.50E-01	N.D.
Cre02.g115250.t1.1	Centriolar protein POC1	Top	TFF	0.042	9.26E-01	N.D.
Cre07.g344050.t1.1	U3 small nucleolar RNA-associated protein 13 (UTP13)	Top	TFF	-0.021	9.50E-01	N.D.
Cre10.g446900.t1.2	Pleiotropic regulator 1 (PRL1)	Top	TFF	-0.013	9.83E-01	N.D.
Cre06.g250950.t1.2	Splicing factor U2AF, 35 kDa subunit (U2AF1)	C3H	TFF	0.535	3.26E-01	N.D.
Cre03.g152150.t1.2	Uncharacterized	C2H2	TFF	0.361	5.09E-01	Detected
Cre07.g340450.t1.1	Pickled Eggs, Isoform A	TIG	TFF	0.565	3.68E-01	Detected
Cre15.g635650.t2.1	Uncharacterized; SAP domain containing	SAP	TFF	0.233	5.31E-01	Detected
Cre03.g197350.t1.2	Pre-mRNA splicing factor CDC5/CEF1	MYB	TFF	-0.164	5.97E-01	N.D.
Cre03.g204950.t1.2	Uncharacterized; RNSP1-SAP18 binding (RSB) motif con	SAP	TFF	-0.483	4.11E-01	N.D.
Cre06.g268600.t1.2	Nucleic acid binding protein (NAB1)	CSD	TFF	-0.023	9.65E-01	Detected
Cre13.g591200.t1.2	Histone H2B	CCAAT	TFF	0.065	8.83E-01	N.D.
Cre17.g714500.t1.2	Histone H2A	CCAAT	TFF	0.047	9.47E-01	N.D.
<i>Transcription Regulators</i>						
Cre17.g702650.t1.1	Uncharacterized; HMG-box containing	HMG	OTR	Control only	1.38E-06 *	Detected
Cre16.g672300.t1.2	Uncharacterized; HMG-box containing	HMG	OTR	0.353	1.59E-01	Downregulated
Cre08.g380151.t1.1	PHD-finger-, WHIM2 domain- and WHIM3 domain-contai	PHD	OTR	-0.106	3.15E-01	N.D.
Cre16.g664000.t1.2	Uncharacterized; SET and MYND domain containing	SET	OTR	0.243	3.68E-01	N.D.
Cre05.g247000.t1.2	Uncharacterized; Bromodomain, PHD-finger and DDT do	DDT	OTR	0.118	4.86E-01	N.D.
Cre12.g508150.t1.2	SNF2-related DNA/RNA helicase SRH21	SNF2	OTR	-0.278	5.46E-01	Downregulated
Cre03.g164650.t1.2	Putative methyltransferase MOT1	SET	OTR	0.155	5.70E-01	N.D.

4.4. Efeito da limitação de N no metaboloma e lipidoma de *C. reinhardtii*

De forma a complementar nossos estudos, análises do metaboloma e do lipidoma celular das mesmas condições analisadas por proteômica total foi realizado usando-se espectrometria de massas acoplado a cromatografia. Após pré-processamento de dados, foram identificados 52 metabólitos primários e 310 espécies de lipídios. Como mencionado anteriormente, os dados metabolômicos foram normalizados pelo número de células e pelo TIC médio. Além desta normalização, todos os dados passaram por etapas de pré-processamento utilizando scripts em R (<https://www.r-project.org/>) e ferramentas disponíveis on-line na plataforma MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>), como exemplificado no fluxograma da **Figura 11**.

4.4.1. Metabolômica

Os resultados da Análise de Componentes Principais (PCA) dos dados de análise metabolômica indicaram uma separação clara entre as condições analisadas, como mostra a **Figura 24 (A)**, provavelmente causada pela privação de N, que pode ser responsável por 70,9% da variação, como observado no PC1. Enquanto o PC2, com uma porcentagem de 8,8%, pode explicar o efeito do tempo (**Figura 24, A**). A **Figura 24 (B)** mostra os loadings correspondentes do PCA e identifica os metabólitos responsáveis pela separação observada entre as condições.

(B).

Por exemplo, os metabólitos Ketoglutarato, Putrescina, Agmatina e Glicerol contribuíram mais para a variação entre as diferentes condições experimentais (+N *versus* -N) e, além disso, a quantidade relativa desses metabólitos aumentou significativamente sob -N e diminuiu em +N (**Figura 25**). Outros exemplos são os metabólitos adenina, AMP, glicose, malato, succinato, citrato, gliceraldeído-3-fosfato, fumarato, glicose-6-fosfato e a maioria dos aminoácidos que mostraram um claro aumento da concentração após 4 horas da mudança para meio repleto de N (+N) (**Figuras 24 e 25**).

Observamos alterações na concentração relativa dos metabólitos em diversos momentos da série temporal, com variações de resposta ao longo do tempo, ou seja, alguns metabólitos alteraram sua abundância logo após a mudança para o novo meio, sem nitrogênio, enquanto outros metabólitos sofreram alterações em sua abundância em pontos tardios da resposta celular analisada em série temporal, como é mostrado na **Figura 25** e nos gráficos de vulcão (**Figura 26**). Para identificar essa diferença na dinâmica dos metabólitos ao longo do tempo, foi realizado um teste t-Student entre os dados de cada ponto no tempo e verificou-se se há metabólitos que apresentaram diferença significativa na concentração relativa entre as condições controle e de privação de N. Os resultados deste teste de hipótese estão representados nos gráficos de vulcão, onde os metabólitos de cor vermelha indicam os significativamente diferentes (valor de $p < 0,05$). Percebeu-se que a maioria dos metabólitos foram afetados 4 horas após a mudança para o novo meio, conforme indicado na **Figura 26- E**.

Figura 25. Mapa de calor da abundância relativa dos metabólitos primários. É mostrada uma análise hierárquica por agrupamento da concentração média relativa de 52 metabólitos em ambas as condições experimentais (controle e privação de N).

A maioria desses metabólitos teve uma abundância aumentada na condição +N nos tempos 4, 6 e 8h e estão envolvidos com a biossíntese de nucleotídeos e ATP (como Adenina, Ribose e AMP), metabolismo central do carbono (como glicose, malato, succinato, citrato, gliceraldeído-3-fosfato, fumarato, glicose-6-fosfato) e biossíntese de aminoácidos e outros compostos contendo nitrogênio (como fenilalanina, leucina, norleucina, triptofano, cisteína, metionina, alanina, tirosina, glutamato, Aspartato, Serina, Ornitina, Histidina e Glutamina) (**Figuras 26 e 27**). Essas respostas podem indicar divisão celular e síntese de energia, pois as células estavam em uma condição com reposição de nutrientes no experimento controle (Foyer et al. 2003; Wase et al. 2014a).

O contrário foi observado com os metabólitos ornitina, arginina (Arg), agmatina, putrescins e 2-oxoglutarato (ou cetoglutarato), que diminuíram sua abundância na condição +N acumularam em -N entre 0.5 e 48 horas (**Figura 27**). O glicerol também aumentou na privação de N, no entanto, foi uma resposta tardia, após 24 horas (**Figura 26**).

Figura 26. Análise comparativa dos metabólitos mais afetados em resposta à disponibilidade de nitrogênio em série temporal. Gráficos de vulcão mostram alterações em abundância significativas comparando as condições controle e privação de N para cada ponto no tempo. Os metabólitos vermelhos indicam valor $p < 0,05$ e os metabólitos cinza representam valor $p > 0,05$.

Figura 27. Resposta adiada de aminoácidos e compostos contendo nitrogênio (0,5 a 8 horas após a alteração do meio). (A) As caixas azuis representam metabólitos que diminuiriam a concentração relativa sob privação de N e as caixas vermelhas as que aumentaram a concentração; (B) Intensidades relativas dos metabólitos individuais (eixos y) entre 0,5 a 8 horas após a início da privação de nitrogênio. Os eixos x representam o tempo de amostragem em horas. Linha preta representa o controle e linha tracejada preta representa privação de N. As amostras estão representadas como média $\pm$ erro padrão (n = 3). O metabólito cetogluturato é representado como 2-oxogluturato na figura.

4.4.2. Lipidômica

Nos ensaios de análise da lipidômica para as mesmas condições analisadas da proteômica total, foram identificadas 310 espécies de lipídios, que pertencem a 10 classes lipídicas diferentes, incluindo: Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidiletanolamina (PE), Fosfatidilglicerol (PG), Fosfatidilinositol (PI), Monogalactosil diacilglicerol (MGDG), Digalactosil diacilglicerol (DGDG), Sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG), Diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG) e 1,2 diacilgliceril-3-O-4'-(N,N,N-trimetil)-homoserina (DGTS). Sendo 10 espécies de DAGs, 23 de DGDGs, 65 de DGTSs, 21 de MGDGs, 34 de PCs, 9 de PEs, 5 de PGs, 2 de PIs, 18 de SQDG e 123 de TAGs. Esses lipídios têm funções diferentes na célula. As classes DGDG, DGTS, MGDG, SQDG e PG são lipídios de membrana plastídica, enquanto as classes de PC, PI e PE são lipídios de membrana extraplasmática. A classe DAG é de moléculas precursoras dos TAGs e podem atuar também como moléculas de sinalização (Merchant et al., 2012). Os TAGs são geralmente classificados como uma classe de lipídios de armazenamento de energia (Merchant et al., 2012).

A análise de PCA foi realizada para todos os dados de lipidômica, em ambas as condições (+N e -N), e observamos uma clara separação entre as condições analisadas, como mostra a **Figura 28 (A)**. Uma variação de 49,1% no PC1 pode se referir ao efeito da condição -N, enquanto o PC2, com uma porcentagem de 18,6%, pode ser explicado como um efeito do tempo (**Figura 28, A**). Através do gráfico dos loadings correspondentes do PCA (**Figura 28, B**) pôde-se identificar os lipídios responsáveis pela separação observada entre as duas condições experimentais. A maioria dos lipídios localizados no lado direito do gráfico da **Figura 28 B** são espécies de TAGs, enquanto no lado esquerdo são lipídios pertencentes à classe DAG e às classes de lipídios plastídicos e de membrana, como DGDG, DGTS, MGDG, SQDG, PG, PC e PI.

Figura 28. Análise de componentes principais (PCA) da concentração relativa média de lipídios em ambas as condições (controle e privação de N). As variações dos PCs são mostradas entre parênteses (A). Gráfico de *loadings* para os PCs 1 e 2 (B).

Para identificar os lipídios que apresentaram diferenças estatísticas, foi realizado o teste de hipóteses de múltiplas amostras ANOVA (Análise de Variância, p-value <0.05). Dos 310 lipídios, 197 foram considerados com diferença estatística (valor de $p < 0,05$) entre as condições +N e -N ao longo do tempo (**Figuras 29 e 30**). Diferentemente dos metabólitos primários e similar ao comportamento das proteínas, os lipídios apresentaram grandes alterações em sua abundância nos pontos de tempo 24, 48 e 72 horas após a mudança para a condição -N (**Figura 29**). Os resultados revelaram que 72% dos lipídios, que aumentaram após 24 horas sob privação de N, pertenciam à classe TAG (indicada em vermelho no mapa de calor e no gráfico de pizza - **Figura 29**). Por outro lado, 72% dos lipídios que tiveram sua abundância reduzida após 24 horas, sob privação de N, pertenciam a lipídios de membrana plastidial (7% DGDG, 31% DGTS, 6% MGDG, 6% SQDG e 1% PG) e lipídios de membrana extracloroplastidial (2% PI, 6% PE e 13% PC) (indicado em azul no mapa de calor e no gráfico de pizza - **Figura 29**). Neste caso, os TAGs representaram apenas 20%.

Diferentemente das outras classes de lipídios de membrana, o fosfoglicerolipídeo de plastídeo PG aumentou sua abundância relativa nas primeiras 24 horas da limitação de N (**Figura 30**). Esse aumento pode ter ocorrido para compensar a perda de outros glicolipídeos no cloroplasto (MGDG, DGDG e SQDG), mantendo assim a integridade estrutural do cloroplasto e a atividade fotossintética por mais tempo após a privação de N.

Dentre as espécies de TAGs, 74% dos TAGs polinsaturados (entre 3 e 9 insaturações) aumentaram sua abundância ao longo do tempo após a privação de N e apenas 20% diminuíram (**Anexo A**). Diferentemente, os TAGs saturados ou moinsaturados em sua maioria (55%) diminuíram sua abundância ao longo do tempo e apenas 18% deste grupo de TAGs foram positivamente regulados (**Anexo B**) após a privação de N.

Figura 29. Mapa de calor de análise de agrupamento hierárquico da concentração relativa média de 197 lipídios em ambas as condições (controle e privação de N). As classes lipídicas dos lipídios destacados no mapa de calor (retângulos tracejados) estão indicadas nos gráficos de pizza com sua respectiva contribuição percentual.

Figura 30. Perfil temporal de abundância de classes de lipídios Eixos y representam a intensidade relativa das classes de lipídios e os eixos x representam os pontos no tempo em horas. Linha preta representa controle e linha tracejada preta representa privação de N. As amostras são representadas como média $\pm$ erro padrão ($n = 3$).

4.5. Integração dos dados “ômicos” através de aprendizagem de Manifold

Após vasta interpretação dos dados “ômicos” de forma independente (proteômica, metabolômica e lipidômica), estes foram integrados pelo método ManiNetCluster (Nguyen et al. 2019), o qual é baseado em aprendizado de máquina *Manifold*. Este método reduziu a dimensionalidade dos dados de forma não linear, o que proporcionou melhor visualização dos dados, e interpretação mais próxima do que ocorre nas células, pois geralmente, as moléculas de uma rede biológica interagem com outras de forma não linear (Nguyen et al., 2019). Outra funcionalidade do método é a capacidade de comparar dados de séries temporais e redes geradas de diferentes condições experimentais de forma não supervisionada, evitando, por exemplo, perder relações funcionais desconhecidas (Nguyen et al., 2019).

Primeiramente, os dados de abundância das moléculas (proteínas, metabólitos e lipídios) de cada condição analisada foram usados para se gerar redes de co-expressão onde cada variável (molécula) estivesse conectada pelo seu nível de co-expressão com os *top 5* nós vizinhos mais próximos ($k=5$). Na sequência, estas redes de co-expressão foram alinhadas por alinhamento *manifold* a fim de combinar suas estruturas múltiplas, levando em consideração sua ocorrência no tempo, gerando as redes biológicas da **Figura 31**.

Figura 31. Redes de coexpressão dos dados “ômicos” integrados nas condições controle (A) e privação de N (B) construídas por kNNGraph (*k*-nearest neighbor graphs). As cores indicam os diferentes módulos gerados pelo método ManiNetCluster.

Posteriormente, os dois conjuntos de dados, controle (+N) e privação de N (-N), foram agrupados e obteve-se 15 módulos de co-expressão (*clusters*) integrativos ou fusionados (**Figura 32, A**), os quais, dependendo das moléculas contidas em cada um, podem ser classificados como específicos para -N, específico para +N ou compartilhados entre as duas condições (**Figura 32, B**).

Figura 32. Distribuição dos dados e identificação da composição de cada módulo gerado pelo método ManiNetCluster.

Para a caracterização das proteínas presentes em cada módulo foi realizada análise de enriquecimento dos termos de anotação do Gene Ontology (GO) e posteriormente comparou-se os termos entre as duas condições (**Figura 33; Anexo C**).

De modo geral, a maioria dos módulos apresentaram termos enriquecidos de maior relevância (baixo p-value) e compartilhados entre as duas condições (+N e -N) relacionados à tradução e/ou processos biosintéticos de composto organonitrogenados. Enquanto termos relacionados à fotossíntese (módulos 2, 6 e 7), respiração celular (módulo 12), processo biossintético de ácidos dicarboxílico (módulos 12 e 8) e resposta celular à superóxido (módulo 15) foram significativos em módulos específicos (**Anexo C**).

Figura 33. Módulos de componentes co-expressos. Número de termos do Gene Ontology (GO) enriquecidos compartilhados e exclusivos de cada condição (controle e tratamento) em cada módulo. Descrição dos termos em cada módulo está presente no **Anexo A**.

Destes módulos, destacaram-se os módulos 11, 12, 14 e 15 por terem maior co-expressão com espécies de TAGs na condição de -N. Além disso, foram nestes módulos que as espécies de TAGs aumentaram sua quantidade relativa após 6 horas de privação de N (**Figura 34**).

Os termos do GO exclusivos no módulo 11 estavam relacionados à via de biossíntese de compostos com pirimidina e purina na condição +N (CRE11.G467550.T1.2, CRE01.G048950.T1.2, CRE09.G406050.T1.2, CRE07.G325734.T1.1, CRE03.G204601.T1.1, CRE02.G092900.T1.2, CRE12.G503300.T1.2 e CRE13.G565450.T1.2) e fator de iniciação da tradução eucariótica na condição -N (CRE05.G242300.T1.2, CRE04.G217550.T1.1, CRE03.G199900.T1.2 e CRE03.G190100.T1.1). No módulo 12, o termo de processo biossintético de ácidos dicarboxílico foi exclusivo em -N, contendo as proteínas glutamato sintase-NAPH (CRE13.G592200.T1.2) e quinolinate sintase (CRE06.G251450.T1.1) os quais estão envolvidos com assimilação de NH_4^+ e síntese de nicotinamida adenosina dinucleotídeo (NAD), respectivamente. Neste módulo, além de estarem co-expressos espécies de TAGs, metabólitos como glutamina e citrulina também foram observados.

O módulo 14 se caracterizou por termos exclusivos para a condição -N relacionados à processo biossintético de ribonucleotídeos (CRE03.G204601.T1.1, CRE02.G092900.T1.2, CRE02.G093450.T1.2, CRE12.G503300.T1.2, CRE13.G565450.T1.2, CRE16.G680000.T1.2, CRE07.G325734.T1.1, CRE01.G006950.T2.1, CRE11.G467550.T1.2, CRE01.G048950.T1.2 e CRE09.G406050.T1.2), indicando uma provável degradação do RNA e remobilização das moléculas de amônia (Park et al. 2015b; Melino et al. 2018). Além da coexpressão com espécies de TAGs, metabólitos como frutose, shikimate e fumarato também estavam coexpressos na condição -N.

Por fim, o módulo 15 foi o módulo onde termos do GO relacionados à estresse oxidativo foram enriquecidos exclusivamente na condição -N com a proteína Mn superóxido dismutase (CRE02.G096150.T1.2 e CRE13.G605150.T1.2), a qual apresentou aumento contínuo de sua abundância após 2 horas da privação de N. Também foi enriquecido o termo de processo biossintético de lipídeo A (UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase - CRE16.G653350.T1.2) o qual é um glicolípido fosforilado comumente encontrado em bactérias, mas que em plantas parecem ser componentes estruturais da membrana da mitocôndria e/ou cloroplasto (Li et al. 2011). A abundância desta enzima foi reduzida na condição -N ao longo do tempo. Além disso, este módulo foi o que apresentou maior número de espécies de TAGs cujo aumento foi verificado na condição -N (**Figura 34**). Interessantemente, os metabólitos ornitina, ketoglutarato, arginina e mio-inositol foram coexpressos neste módulo.

Figura 34. Abundância relativa de espécies de TAGs coexpressas nos módulos 11, 12, 14 e 15 na condição de privação de nitrogênio.

Com relação à rede de coexpressão, considerando que as duas redes biológicas (+N e -N) apresentam o mesmo número de moléculas (representadas pelos nodos), observou-se que na condição +N as moléculas apresentaram um menor distanciamento entre elas, indicando uma maior similaridade na co-expressão destas

moléculas da rede biológica +N do que na condição -N (**Figura 31**). Com o objetivo de identificar essas principais moléculas e os processos biológicos alterados representados nas redes, foram calculadas as centralidades de rede *degree* (grau), *closeness* (proximidade) e *betweenness* (intermediação). Novas redes foram construídas com o intuito de se visualizar a localização dos componentes com maior centralidade (**Figura 35**). Foram selecionadas as *top* 100 proteínas (**Anexo D**), *top* 50 espécies de lipídios (**Figura 36**) e *top* 10 metabólitos (**Figura 36**) com maiores valores de centralidade de cada método de centralidade, com isso, pôde-se identificar as moléculas com maior importância topológica para a rede biológica tanto na condição +N, quanto na -N.

A comparação do enriquecimento dos termos do GO das *top* 100 proteínas com maior centralidade de rede (*degree*, *closeness* e *betweenness*) revelou maior variedade de termos exclusivos na condição de privação de N, indicando que as células, quando sob estresse alteram as interações entre os componentes celulares, confirmando alterações nas interrelações entre os nós das redes, o que representa que a célula está utilizando conjuntos de proteínas que não eram necessárias quando em condições não estressantes (**Figura 35; Anexo E**).

Figura 35. Redes de co-expressão dos dados “ômicos” integrados (proteoma, metaboloma e lipidoma) com cores indicativas dos diferentes métodos de análise de centralidade de rede (A- *Degree centrality*, B - *Closeness centrality* e C - *Betweenness centrality*). Tonalidades mais escuras indicam valores maiores de centralidade e cores mais claras indicam menores valores.

Figura 36. Número de termos do Gene Ontology (GO) enriquecidos para as top 100 proteínas com maior centralidade de rede (*Degree*, *closeness* e *betweenness*) comparando a condições de privação de N com a condição controle.

As proteínas com maior centralidade *degree* exclusivas na condição de privação de N estavam relacionadas à processo metabólico de ATP ($p = 6,16 \times 10^{-6}$), processo glicolítico ($p = 9,59 \times 10^{-4}$), processo metabólico de arginina ($p = 2,03 \times 10^{-3}$) e processo metabólico de ornitina ($p = 2,82 \times 10^{-2}$). Enquanto na condição controle termos como processo metabólico de tRNA ($p = 2,22 \times 10^{-2}$) e processo biossintético de AMP ($p = 4,50 \times 10^{-2}$) foram enriquecidos exclusivamente nesta condição. Termos como tradução ($p_{\text{controle}} = 1,48 \times 10^{-11}$ e $p_{\text{privaçãoN}} = 5,68 \times 10^{-12}$), expressão do gene ($p_{\text{controle}} = 4,80 \times 10^{-8}$ e $p_{\text{privaçãoN}} = 7,63 \times 10^{-8}$), processo metabólico de purina do nucleotídeo ($p_{\text{controle}} = 3,24 \times 10^{-2}$ e $p_{\text{privaçãoN}} = 1,61 \times 10^{-2}$), processo catabólico de carboidrato ($p_{\text{controle}} = 3,24 \times 10^{-2}$ e $p_{\text{privaçãoN}} = 2,03 \times 10^{-3}$) e processo biossintético de ribonucleotídeo ($p_{\text{controle}} = 4,28 \times 10^{-2}$ e $p_{\text{privaçãoN}} = 3,65 \times 10^{-3}$) foram termos enriquecidos em ambas as condições (**Anexo E**).

As proteínas com maior centralidade *closeness*, em ambas as condições (privação de N e controle) estão envolvidas com respostas ao estresse oxidativo com os termos do GO enriquecidos para detoxificação oxidante celular ($p_{\text{controle}} = 2,05 \times 10^{-6}$ e $p_{\text{privaçãoN}} = 9,09 \times 10^{-3}$) e atividade antioxidante ($p_{\text{controle}} = 2,55 \times 10^{-6}$ e $p_{\text{privaçãoN}} = 6,04 \times 10^{-4}$). Esta alta centralidade *closeness* em termos relacionados ao estresse oxidativo evidenciou a importância deste processo em ter o mínimo de passos para alcançar as moléculas (nodos) pois, uma alta centralidade *closeness* significa que estas moléculas apresentam curtos caminhos de comunicação entre as outras moléculas da rede (**Figura 34 B e 35; Anexo E**). Algumas dessas proteínas classificadas nos termos de detoxificação oxidante celular e atividade antioxidante são exclusivas da privação de N como: produção de isoprenoide (lipídio precursor de clorofila, carotenóides e esteróis - Cre12.g546050.t1.2), via de shikmate (Cre08.g380201.t1.1), metabolismo de glutatona (Cre01.g014350.t1.2), fase oxidativa da via de pentose fosfato (Cre12.g526800.t1.2) e citocromo-c peroxidase (Cre09.g401886.t1.1). Enquanto outras proteínas são exclusivas do controle como: proteínas envolvidas com metabolismo de glutatona (Cre02.g087700.t1.2; Cre05.g233900.t1.2), peroxirredoxina (Cre17.g743897.t1.1; Cre10.g449550.t1.2) e citocromo c oxidase (Cre01.g049500.t1.2). Além destes termos, outros foram enriquecidos exclusivamente nas proteínas de maior centralidade *closeness* na condição de privação de N como: gluconeogênese ($p = 7,07 \times 10^{-4}$), processo metabólico de ATP ($p = 1,83 \times 10^{-3}$), reação de luz na fotossíntese ($p = 3,42 \times 10^{-3}$) e processo biossintético de arginina via

ornitina ($p = 4,04 \times 10^{-2}$). Interessantemente, dentre os 10 metabólitos identificados com maior centralidade *closeness*, os metabólitos shikmate, arginina, ornitina e ketoglutarato foram exclusivos na privação de N, corroborando com os dados da proteômica e indicando a importância central destas vias em resposta à privação de N (**Figura 36**).

As proteínas com maior centralidade de rede *betweenness* (interpretada como nodos com função de “ponte” entre as sub-redes) também apresentaram enriquecimento do termo do GO para detoxificação celular ($p_{\text{controle}} = 1,34 \times 10^{-2}$ e $p_{\text{privação N}} = 3,39 \times 10^{-2}$) em ambas as condições, sendo identificadas proteínas antioxidantes como manganês superóxido dismutase (Mn-SOD; CRE02.G096150.T1.2 e CRE13.G605150.T1.2) e S-formilglutamina hidrolase (CRE03.G158800.T3.1) na privação de N e, peroxirredoxinas (CRE17.G743897.T1.1 e CRE17.G715500.T1.2) no controle (**Anexo E**). Além destes termos compartilhados, outros foram identificados como exclusivos da condição de privação de N como: processo biossintético de compostos celulares nitrogenados ($p = 9,89 \times 10^{-3}$), processo biossintético de tetrapirrol ($p = 2,08 \times 10^{-2}$) e montagem ou desmontagem da cromatina ($p = 2,93 \times 10^{-2}$) (**Anexo E**). A alta centralidade *betweenness* nestas proteínas é um indicativo de que, sob privação de N, são elas que controlam o fluxo de informação e comunicação entre as sub-redes, funcionando como reguladoras ou sinalizadoras (**Figura 35, C**). As proteínas nucleares histonas H1 identificadas enriquecidas no termo de “montagem e desmontagem da cromatina” com maior *betweenness* em -N (CRE13.G567450.T1.2 e CRE06.G275900.T1.2) estão envolvidas não apenas com a compactação e ligação com a cromatina, mas também estão relacionadas com a redução da transpiração e fotossíntese em *Arabidopsis* e tomate em resposta à seca (Scippa et al. 2004).

Com relação aos metabólitos centralizadores, observou-se pouco compartilhamento entre as condições (**Figura 37**), indicando uma alteração mais dinâmica das interações neste nível do sistema biológico. Porém, a Arg e seus precursores como ketoglutarato, glutamato, glutamina e ornitina, foram identificados como metabólitos centralizadores na maioria das análises de centralidade da rede biológica (*degree*, *closeness* e *betweenness*) (**Figura 37**). O que confirma nossa hipótese desta via metabólica ser importante para respostas às condições de estresse, como a privação de N.

Os lipídios com altos valores de centralidade apresentaram maior variação das espécies de TAGs, tanto na condição +N, quanto na -N, como observado nas análises de *degree*, *closeness* e *betweenness* (**Figura 37**). Ao que parece, os TAGs têm papel central na resposta à limitação de N, com alta centralidade *closeness*, sendo um lipídio de alta coexpressão com outras moléculas, e também alta centralidade *betweenness*, funcionando como “ponte” de comunicação entre as sub-redes, após a limitação de N (**Figura 37**). Os lipídios de membrana plastidial DGTS e DGDG mostraram-se com alta centralidade *degree* tanto na condição +N quanto na -N, indicando alta correlação com os elementos da rede (**Figura 37**). Interessantemente, o lipídio de membrana SQDG apresentou uma alta centralidade apenas na condição +N, o qual é o principal constituinte da membrana dos tilacóides nas microalgas e apresenta uma alta interação com as proteínas fotossintéticas (**Figura 37**) (Boudière et al. 2014).

Figura 37. Grau de centralidade das redes biológicas identificadas. Top 50 lipídios e top 10 metabólitos com maiores e menores centralidade (*Degree*, *closeness* e *betweenness*) na rede de coexpressão. Lipídios indicados pelas porcentagens de suas classes em cada condição (controle e privação de N) e os metabólitos estão organizados como exclusivos ou compartilhados pelas condições.

4.6. Meta-análise de transcritos do metabolismo de Arg em *C. reinhardtii*

Com o objetivo de avaliar a especificidade do aumento dos níveis de proteínas envolvidas com o metabolismo de Arg em resposta à privação de N, foi realizada uma meta-análise utilizando dados de transcriptoma de estudos anteriores de *C. reinhardtii* localizados na plataforma Phycomine (<https://phycomine.iq.usp.br/>) desenvolvida em nosso grupo de pesquisa (**Figura 38**).

Identificou-se que o baixo pH (4.1) (Albee et al. 2013), exposição à metilmercúrio (0.05 e 0.5 nM) (Beauvais-flu et al. 2016), alteração da concentração de Fe (20, 0.01 e 0 µM) (Urzica et al. 2012b; Gallaher et al. 2018) e exposição à peróxido de hidrogênio (Urzica et al. 2012a) aumentaram os níveis dos transcritos das enzimas envolvidas com o metabolismo de Arg de forma similar ao observado nos nossos resultados de

proteômica em limitação de N, assim como em estudos anteriores nesta mesma condição (Boyle et al. 2012; Blaby et al. 2013; Schmollinger et al. 2014; Valledor et al. 2014; Park et al. 2015a). Este resultado indica que, possivelmente, as alterações na via de Arg não ocorrem somente na condição de privação de N, sendo também recorrentes em resposta a outros estressores abióticos.

Figura 38. Expressão de transcritos envolvidos com o metabolismo de Arg em resposta a diferentes condições de estresse abiótico em *C. reinhardtii*.

Resultado da meta-análise realizada na plataforma on-line Phycomine (<https://phycomine.iq.usp.br/>). Condições dos estudos foram: pH 4.1 (Albee et al., 2013); 2 horas de exposição à metilmercúrio (0.05 e 0.5 nM) (Beauvais-Flush et al., 2016); Fase clara e escura e exposição à Cu (2 e 0.01 μ M) e Fe (20 e 0.01 μ M) (Gallaher et al., 2018); Exposição à peróxido de hidrogênio nos pontos de tempo 0, 0.5 e 1 hora (Urzica et al., 2012); Privação de Fe em séries temporais (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 e 48 horas) (Urzica et al., 2012a).

4.7. Validações fenotípicas de *C. reinhardtii* à suplementação de arginina e mutante fator de transcrição *Tubby-like*

Os resultados das análises “ômicas” da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* em privação N, tanto independentes quando integradas, evidenciaram alterações nas vias metabólicas de arginina (Arg). Portanto, com o objetivo de validar o possível efeito no acúmulo de lipídios neutros e no crescimento, foram realizados experimentos com suplementação de Arg na concentração de 2 mM em fotoautotrofia (utilizando meio de cultura HSM). A suplementação de Arg foi verificada em condição repleta de N e na privação de N, além das condições controle sem a suplementação de Arg (**Figura 39 e 40**).

Os resultados revelaram que não houve alteração significativa no crescimento e nem no acúmulo de lipídios neutros nas condições com suplementação de Arg quando comparada com seu respectivo controle (sem suplementação de Arg) (**Figuras 39 e 40**). Com exceção do acúmulo de lipídios neutros na condição de privação de N (-N), que como já esperado, apresentou aumento significativo dos lipídios neutros após 48 horas de privação de N (**Figura 39, B**). Destaca-se a dificuldade de averiguar o efeito de Arg sob limitação de N, pois este pode ser utilizado pela célula como fonte de N para sobreviver.

Figura 39. Crescimento celular e produção de lipídios neutros. (A) Crescimento celular; (B) Acúmulo de lipídios neutros à privação de nitrogênio e suplementação de arginina em cultivo fotoautotrófico de *C. reinhardtii*. Meio de cultura HSM sem nitrogênio indicado com -N, meio de cultura HSM comum indicado com +N e suplementação de Arg indicado por +Arg. As barras indicam desvio padrão (n=3) e “*” indica diferença estatística (ANOVA, p≤0.05).

Figura 40. Cultivos de *C. reinhardtii* com suplementação de Arg sob condições repletas e privação de N nos pontos de tempo 0, 24, 48 e 72 horas.

Um mutante de *C. reinhardtii*, adquirido pela Chlamydomonas Library Project (CLiP), com deleção do gene Cre12.g520650, o qual codifica o fator de transcrição *Tubby-like*, foi testado em fotoautotrofia em condição de privação de N, juntamente com a cepa não mutante cc-4533 (WT - *Wild Type*). Este gene foi selecionado devido aos resultados do proteoma nuclear, onde este fator de transcrição foi verificado *up regulated* após 1 hora de privação de N (**Tabela 2**)

Verificou-se, através de micrografias, que a ausência do TF *Tubby-like protein* no mutante ocasionou um aumento no número de células-filhas conectadas comparado a célula WT (**Figura 41**). Este fenótipo pode indicar que o TF *Tubby-like protein* pode estar envolvido com a diminuição da divisão celular nas células WT, portanto, *Tubby-like protein* seria um repressor natural de proliferação celular.

Figura 41. Células de *C. reinhardtii* cultivadas sob privação de N durante 48, 72 e 96 horas. Cepa de *C. reinhardtii* wild type (à esquerda) e mutante com deleção no gene que codifica o fator de transcrição *Tubby-like protein* (à direita).

5. DISCUSSÃO

Além dos lipídios neutros (mais especificamente os triacilgliceróis - TAGs), que foi o objeto de estudo do presente trabalho, outros compostos de interesse comercial como açúcares e compostos antioxidantes, por exemplo, podem ser acumulados na microalga *Chlamydomonas reinhardtii* sob estresse abiótico, sendo a privação de N uma das condições mais estudadas. Nestas condições de estresse, as células entram em quiescência após 24 e 48 horas e o crescimento é reduzido sendo, portanto, um desafio a produção de microalgas com alto rendimento destes compostos (Msanne et al. 2012; Takeuchi and Benning 2019).

Com relação aos TAGs, muitos estudos anteriores investigaram diferentes formas de otimizar sua produção em microalgas e também métodos mais eficientes em extrair estes lipídios, no entanto ainda não é economicamente viável seu uso real na indústria para produção de biodiesel (Takeuchi and Benning 2019). Diante desta problemática, o melhor entendimento sobre o acúmulo dos TAGs e sua regulação nas células das microalgas, através de estudos “ômicos”, pode contribuir com a criação de novas linhagens de microalgas com maior capacidade de acúmulo de lipídios neutros sem afetar seu crescimento.

Desde o sequenciamento do genoma da microalga modelo *Chlamydomonas reinhardtii* (Merchant et al. 2007), grandes avanços no entendimento sobre o acúmulo de TAGs e respostas à limitação nutricional foram alcançados, principalmente sob privação de N, incluindo estudos sistêmicos utilizando técnicas “ômicas” (Boyle et al. 2012; Schmollinger et al. 2014; Valledor et al. 2014; Park et al. 2015a). A maioria destes estudos foram realizados em condições mixotróficas (com adição de acetato), sendo limitado os estudos de fisiologia molecular em séries temporais realizadas em fotoautotrofia (Msanne et al. 2012; Juergens et al. 2016a). Além disso, ainda não há estudos do proteoma nuclear em *C. reinhardtii* sob limitação de N, nem a integração dos dados ômicos por método de aprendizagem de máquina como a descrita no presente estudo. Portanto, no presente estudo foram investigados e integrados os dados do proteoma total e nuclear, lipidoma e metaboloma da microalga modelo *C. reinhardtii* com o objetivo de identificar genes e vias candidatas envolvidas com a regulação do acúmulo de TAGs e sua relação com o crescimento sob privação de N.

Além do carbono (C), o N é o nutriente mais importante para o crescimento das microalgas e plantas, representando aproximadamente 7 a 12% do seu peso seco total (Robertson and Vitousek 2009; Schmollinger et al. 2014; Chen and Wang 2021). A privação de N gera alterações drásticas no metabolismo e fenótipo das células de *C. reinhardtii*, principalmente após 24h de privação, como já observado em estudos anteriores, caracterizado principalmente pelo acúmulo de amido e TAGs, redução do crescimento, e diminuição dos níveis de clorofila e proteína total (Msanne et al. 2012; Schmollinger et al. 2014; Valledor et al. 2014; Juergens et al. 2015; Park et al. 2015a). Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, com aumento dos lipídios neutros em 1.6, 2.4 e 4.5 vezes após 24h, 48h e 72h de privação de N e diminuição da concentração proteica por célula em 1.2, 2.1, 2.8 e 3.1 vezes após 6h, 24h, 48h e 72h, comparado com a condição controle (+N) (**Figura 12**). Com relação à divisão celular, diferentemente dos estudos em mixotrofia onde as células se dividiram por até 24h sob privação de N (Schmollinger et al. 2014; Valledor et al. 2014), no presente estudo em fotoautotrofia, observou-se que as células se dividiram na ausência de fonte de N por até 48h (**Figura 12, B**). No entanto, a velocidade de crescimento em mixotrofia mostrou-se maior no estudo de Schmollinger et al. (2014),

com 0.1 h^{-1} após 24 horas de privação de N, contra 0.031 h^{-1} após 48 horas no presente estudo em fotoautotrofia. Estas divisões celulares que ocorreram mesmo após a privação de N, podem estar relacionadas às reservas de N presentes nas células e também ao tempo da resposta celular para a transição ao ciclo de quiescência (Takeuchi and Benning 2019).

Com relação às respostas moleculares, quando as células de *C. reinhardtii* foram transferidas de uma condição repleta de N para a privação de N, os três níveis do sistema biológico avaliados no presente estudo (proteoma, metaboloma e lipidoma) sofreram alterações múltiplas diante dos 10 pontos de tempo investigados (-24h, 0.5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h, 48h e 72h).

De modo geral, as respostas iniciais à limitação de N, entre 1 e 6 horas, envolveram diminuição da abundância de proteínas relacionadas à captação de luz na fotossíntese e relacionadas à síntese proteica, o que foi observado no proteoma total e nuclear de nossos estudos. Em contraste, proteínas relacionadas com fosforilação oxidativa aumentaram sua abundância, indicando uma tentativa das células de compensar o déficit de energia causado pela limitação de N. Neste mesmo intervalo de tempo, entre 1 e 6 horas após a privação de N, verificou-se rápido aumento do fosfoglicerolípido de plastídio PG (Fosfatidilglicerol) enquanto os glicolipídios do cloroplasto como DGTS (1,2 diacilgliceril-3-O-4'-(N,N,N-trimetil)-homoserina) e MGDG (Monogalactosil diacilglicerol) diminuíram a sua abundância. Com relação aos metabólitos, as respostas iniciais foram mais acentuadas, com grande decaimento de metabólitos envolvidos com biossíntese de nucleotídeos e ATP (Adenina, Ribose e AMP) e da maioria dos aminoácidos detectados. Em contraste, os metabólitos ornitina, arginina, ketoglutarato, putrescina e agmatina aumentaram sua abundância entre 0.5 e 8 horas de privação de N.

Resumidamente, com relação às respostas tardias (entre 24 e 72 horas), estas foram marcadas pelo incremento dos TAGs e declínio dos lipídios de membrana (celular e plastidiais) e do precursor de TAG, o DAG (Diacilglicerol). As proteínas envolvidas com biossíntese de Arg, fosforilação oxidativa, respiração celular, biossíntese de purinas e resposta ao estresse oxidativo aumentaram sua abundância após 24 horas de privação de N. Em contraste, proteínas envolvidas com a biossíntese de demais aminoácidos, de proteínas, de ribossomos e de clorofila reduziram sua abundância após 24 horas de limitação de N. Somente os metabólitos que tiveram alteração tardia na condição -N foram glicose, shikimato e glicerol os quais aumentaram sua abundância após 24 horas e os metabólitos cisteína, Arg e ornitina diminuíram sua abundância.

A seguir uma discussão mais aprofundada das principais vias metabólicas alteradas baseada nos resultados “ômicos” integrados, em resposta à privação de N, suas implicações no metabolismo de *C. reinhardtii* e possíveis relações com o acúmulo de lipídios neutros e no crescimento estão descritas.

5.1. Metabolismo Central de Carbono – Redirecionamento para acúmulo de amido, biossíntese de acetil CoA, 2-oxalacetato e poder redutor (NADPH)

Diferente da condição mixotrófica, a qual o acetato e seus intermediários são a principal fonte de C e acetil-CoA para biossíntese *de novo* de ácidos graxos e acúmulo de TAGs sob limitação de N em *C. reinhardtii* (Work et

al. 2010; Fan et al. 2012; Goodenough et al. 2014; Shtaida et al. 2014) na condição de fotoautotrofia a fixação de C pelo ciclo de Calvin-Benson-Bassham tem maior importância para a biossíntese de ácidos graxos e TAGs, assim como o fornecimento de C através do catabolismo de outras macromoléculas. No presente estudo, realizado em fotoautotrofia, verificou-se que mesmo após a limitação de N, a menor subunidade da Rubisco (Ribulose biscofosfato carboxilase) (Cre02.g120150.t1.2), apresentou um aumento contínuo entre 4 e 72 horas, indicando que esta via pode também estar contribuindo com o aporte de C mesmo após a privação de N. Este resultado se difere dos outros estudos em mixotrofia os quais observaram um crescente decaimento de proteínas envolvidas com a via de fixação de C. Isso se deve à versatilidade de *C. reinhardtii* a qual dá preferência a vias com menor gasto energético quando há fornecimento de C orgânico, e que não foi o nosso caso. Além disso, verificou-se que a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (Cre11.g476325.t1.1), envolvida com a fixação de CO₂ pela via de plantas C₄, aumentou a abundância entre 2 e 72 horas da privação de N, assim como a enzima NADP-malato desidrogenase (Cre03.g194850.t1.2, Cre12.g483950.t1.2), responsável pela descarboxilação e liberação do CO₂ para a fixação na Rubisco. Esta via também foi reportada como ativada nos estudos anteriores de limitação de N.

Como a maioria das enzimas das vias de glicólise e gliconeogênese são compartilhadas, verificou-se a alteração de enzimas específicas de cada via, como a frutose 1,6 biscofosfatase (Cre07.g338451.t1.1) e fosfofrutoquinase (Cre06.g262900.t1.2), específicas da via de gliconeogênese e glicólise, respectivamente. Assim como em outros estudos (Park et al. 2014), verificou-se que a via de gluconeogênese é ativada nas primeiras horas da limitação de N (1 hora) e mantida até o início do acúmulo de TAGs (entre 6 e 24 horas), provavelmente apoiando a biossíntese de amido. Enquanto a glicólise é ativada mais tardiamente (após 6 horas) com o provável objetivo de manter a viabilidade celular.

Observou-se que a via oxidativa de pentose-fosfato também foi ativada tardiamente, juntamente com a glicólise, com aumento da abundância da enzima gluconato-6-fosfato desidrogenase (Cre12.g526800.t1.2) após 24 horas de limitação de N, a qual além de produzir a pentose Ribulose-5-fosfato (substrato para síntese de ácidos nucleicos), contribui com a geração de NADPH nas células. Park et al (2014) apoia que o papel da via oxidativa de pentose fosfato, nas células de *C. reinhardtii* sob limitação de N, tem como papel principal a geração de poder redutor (na forma de NADPH) para biossíntese de ácidos graxos e acúmulo de TAGs ao invés de produção de esqueletos de carbono para o crescimento celular.

Exceto pelas enzimas aconitase (Cre01.g042750.t1.2) e 2-oxoglutarato desidrogenase (Cre12.G537200.T1.2), as quais tiveram aumento tardio da abundância (após 24 horas), todas as enzimas da via do ácido tricarbóxico (TCA) apresentaram aumento inicial após a limitação de N, entre 2-4 horas até 24-72 horas, como as enzimas citrato sintase (Cre12.g514750.t1.2), isocitrato desidrogenase (Cre02.g143250.t1.2), succinato desidrogenase (Cre14.g619133.t1.1) e malato desidrogenase (Cre03.g194850). Além da função energética da via TCA, esta também fornece intermediários críticos para os processos anabólicos das células, como biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e açúcares. Nesse contexto, o aumento tardio das enzimas aconitase e 2-oxoglutarato desidrogenase, as quais são responsáveis pela transformação do citrato em isocitrato e da oxidação do 2-oxoglutarato para Succinil-CoA, respectivamente, está de acordo com o fato da importância destes metabólitos intermediários (citrato e 2-oxoglutarato) para a biossíntese de ácidos graxos e para a

assimilação de N, respectivamente (Araújo et al. 2011). O citrato, pode ser utilizado como um transportador de acetil-CoA para biossíntese de ácidos graxos e, a sua suplementação em cultivo de *C. reinhardtii* foi correlacionado com maior acúmulo de TAGs (Wase et al., 2014). Além disso, verificou-se que a enzima ATP-citrato liase (Cre05.g241850.t1.2), envolvida com a clivagem irreversível do citrato e produção de acetil-CoA e oxalacetato, também foi sobreexpressa entre 4 e 72 horas após privação de N no presente estudo, corroborando com o provável redirecionamento metabólico para biossíntese de ácidos graxos. Em contrapartida, o metabólito 2-oxoglutarato, tem papel central no fornecimento de esqueleto de carbono para na assimilação de N pelas vias GS-GOGAT (glutamina sintetase - Glutamina oxoglutarato aminotransferase) ou GDH (glutamato desidrogenase) e o seu acúmulo nas células é considerado um sinal de limitação de N em organismos fotoautotróficos (Stitt and Fernie 2003; Jiang et al. 2017), corroborando com o presente estudo o qual observou-se aumento deste metabólito na condição -N.

Além disso, Li et al. (2014) sugeriram que o *turnover* de compostos ricos em carbono e nitrogênio, como amido, proteína, clorofila e lipídios de membrana, causado pela privação de N, também pode fornecer carbono, grupos acil, acetil-CoA e energia para o acúmulo de lipídios, os quais serão discutidos mais adiante.

Nesse contexto, alguns autores concordam com a hipótese, chamada de “*overflow hypothesis*”, de que a limitação de N gera um excesso de C e energia nas células de *C. reinhardtii*, devido à restrição do uso de C no metabolismo de proteínas e no crescimento de *C. reinhardtii* e também ao excesso de energia da fotossíntese. Portanto, este excesso de C e energia poderia ser um sinal celular para desencadear o acúmulo de TAGs (Scott et al. 2010; Fan et al. 2012). No entanto, outros autores discordam e defendem que esta hipótese é uma interpretação simplista da resposta ao estresse nutricional e acúmulo de TAGs (Wase et al. 2014b, 2019; Juergens et al. 2016b), mostrando, por exemplo, que não há significativa dissipação do excesso de energia luminosa sob privação de N através da medição do *quenching* não-fotoquímico (Juergens et al., 2016). Além disso, Wase et al. (2019) verificaram que compostos ativadores do acúmulo de TAGs não induziram a renovação de proteínas ou lipídios de membrana, ao invés disso, a síntese proteica foi mantida e a biossíntese de aminoácidos foi potencializada durante o acúmulo de TAGs (Wase et al., 2014; Wase et al., 2019). Estes achados vão de encontro à idéia de desacoplamento da biossíntese de TAGs do crescimento celular.

5.2. Metabolismo de Amido e Lipídios – Acúmulo de TAGs e remodelamento de lipídios de membrana

O amido e os lipídios neutros são os principais compostos de armazenamento de C nas microalgas, incluindo em *C. reinhardtii*. Quando em condições ambientais favoráveis (não estressantes), *C. reinhardtii* sintetiza principalmente lipídios polares como constituintes de membrana de cloroplasto e membranas celulares, enquanto o amido é acumulado no cloroplasto durante a fase de luz e consumido durante a fase escura de fotoperíodo (Johnson and Alric 2013b). No entanto, em condições desfavoráveis para o crescimento celular, como na privação de N, o amido é rapidamente acumulado no cloroplasto e as células passam também a acumular lipídios neutros (TAGs), mais tardiamente, na forma de corpos lipídicos no citoplasma (Johnson and

Alric, 2013). Alguns estudos sugeriram que o amido acumulado nas células através da fotossíntese, pode ser um precursor para a biossíntese de TAGs (Li et al. 2014; Pick and Avidan 2017) e que as duas vias competem por precursores de C, sendo considerados “vasos comunicantes” de armazenamento de energia (Work et al. 2010; Fan et al. 2012). Em contrapartida, outros estudos sugeriram que são mecanismos independentes e com fontes de C diferentes, advindo da fixação de CO₂ para biossíntese de amido e do acetato para biossíntese TAGs, em mixotrofia (Juergens et al. 2016b). Portanto, ainda não há um consenso sobre como funciona a partição de C entre amido e TAGs em *C. reinhardtii* (Johnson and Alric 2013a; Juergens et al. 2016b; Chen and Wang 2021).

No presente estudo, observou-se rápida resposta no aumento de enzimas envolvidas com a biossíntese de amido entre 2 e 24 horas após a limitação de N e diminuição da abundância das mesmas após 24 horas, sendo as subunidades maior (STA1) e menor (STA6) de ADP-glicose pirofosforilase (Cre13.g567950.t1.2 e Cre03.g188250.t1.2, respectivamente). Estas enzimas apresentaram o mesmo comportamento em estudo de proteômica anterior (Park et al. 2014). Além disso, Juergens et al. (2016) verificaram que em condição fotoautotrófica e privada de N, a concentração de amido aumentou nas células de *C. reinhardtii* até 48h e, após este ponto de tempo, a taxa de acúmulo diminuiu, assemelhando-se ao comportamento das enzimas STA1 e STA6 verificadas no presente estudo. Wase et al. (2014), verificaram aumento de enzimas envolvidas com a hidrólise de amido após 24 horas, no entanto, estas não foram indentificadas no presente estudo.

Já a biossíntese de TAGs consiste em basicamente 3 processos celulares independentes que são a biossíntese de ácidos graxos, a formação de glicerol-lipídios e o empacotamento em corpos lipídicos (Fan et al. 2011). Além da grande necessidade de energia (ATP) e poder redutor (NADPH), o principal substrato para a biossíntese dos ácidos graxos é o acetil-CoA, e como descrito anteriormente, observamos em nossos resultados que houve um provável redirecionamento metabólico para acúmulo destes compostos nos primeiros pontos de tempo (entre 1 e 6 horas). Com relação às enzimas envolvidas com biossíntese de ácidos graxos no cloroplasto, como acetil-CoA carboxilase (Cre17.g715250.t1.2), malonil-CoA: ACP transacilase (Cre14.g621650.t1.1), 3-cetoacil-ACP-sintase (Cre07.g335300.t1.2), 3-cetoacil-ACP redutase (Cre03.g172000.t1.2), enoil-ACP redutase (Cre06.g294950.t1.1) e ácido graxo de cadeia longa-CoA ligase (Cre13.g566650.t2.1), apresentaram rápido e modesto aumento da abundância entre 2 e 6 horas após a privação de N, no entanto, após 6 horas houve uma marcada redução até 72 horas. Estes resultados são semelhantes aos encontrados nos dados de expressão gênica de Msanne et al. (2012) em experimento de duração de 11 dias em fotoautotrofia. Wase et al. (2014) e Villedor et al. (2014) mensuraram o proteoma de *C. reinhardtii* em condições mixotróficas e sob deprivação de N e também observaram o decaimento de algumas destas proteínas ao longo do tempo ou não observaram alterações significativas.

Além dos ácidos graxos, outro substrato essencial para a biossíntese *de novo* de TAGs é o glicerol-6-fosfato, produzido pela reação da enzima glicerol-3-fosfato deidrogenase (Cre01.g053000.t1.2), a qual verificou-se aumentada entre 6 e 72 horas após a limitação de N. Porém, outras enzimas importantes da via de biossíntese de TAGs, como as aciltransferases, não foram identificadas como alteradas no presente estudo. Similarmente, Wase et al (2014) e Park et al (2014) não encontraram nenhuma das enzimas envolvidas com a biossíntese de TAGs alteradas em seus dados de proteômica. Porém, estudos de transcriptômica verificaram aumento de

transcritos de aciltransferases pertencentes à via de Kennedy após 2 horas de privação de N até 24 horas (Park et al. 2014; Boyle et al. 2012).

As moléculas de TAGs também podem ser geradas através do remodelamento dos lipídios de membrana, pela transferência de grupo acil e também pela degradação e liberação de ácidos graxos por lipases. Sugere-se que o remodelamento de lipídios de membrana seja a maior fonte de ácidos graxos para o acúmulo de TAGs em *C. reinhardtii* em condição de limitação de N (Fan et al. 2011; Park et al. 2014). No presente estudo verificou-se uma diminuição da abundância de fosfolipase A2 (Cre09.g407700.t1.2) entre 1 e 6 horas após a limitação de N e um aumento entre 24 e 48 horas. Esta enzima cataliza a hidrólise de lipídios da membrana, fornecendo ácidos graxos para a biossíntese de TAGs (Zulu et al. 2018). Este resultado confirma nossos dados de lipidômica em que se observou grande redução dos lipídios de membrana plastidiais e de membrana celular após 24 horas de limitação de N (**Figura 29**). Outra forte evidência do remodelamento de lipídios de membrana foi o aumento dos níveis de TAGs polinsaturados (3 e 9 saturações) e a redução dos TAGs saturados e monoinsaturados (**Anexos A e B**). Esta maior insaturação dos TAGs é um indicativo de transferência de ácidos graxos de membrana de cloroplasto e extracloroplastídias para a formação de TAGs, visto que geralmente os lipídios de membrana são ricos em ácidos graxos polinsaturados (McConn and Browse 1998; Zhang et al. 2013). Além disso, as enzimas envolvidas com a biossíntese dos lipídios de membrana Sulfoquinovosil diacilglicerol (SQDG) (UDP-sulfoquinovose sintase, Cre16.g656400.t1.2) e 1,2 diacilgliceril-3-O-4'-(N,N,N-trimetil)-homoserina (DGTS) (S-adenosilmetionine sintetase, Cre06.g250200.t1.2) apresentaram uma redução entre 6 e 72 horas após privação de N.

De acordo com os estudos anteriores, o acúmulo de TAGs não se deve apenas ao remodelamento de lipídios de membrana. Segundo Fan et al. (2011), houve diminuição do acúmulo de TAGs quando a enzima cetoadil-ACP-sintase-1 (pertencente à via de biossíntese de ácidos graxos) foi inibida por cerulenina sob privação de N, indicando que a biossíntese *de novo* de ácidos graxos também contribui com o aumento de TAGs nas células. No entanto, a diminuição da abundância e/ou ausência de alteração das proteínas de biossíntese de ácidos graxos e biossíntese de TAGs aparentemente não concorda com os resultados de acúmulo de ácidos graxos e dados de lipidômica. Ainda não há um consenso sobre este fato contraditório entre os dados de proteômica e lipidômica, mas alguns autores sugeriram que a biossíntese de ácidos graxos e TAGs podem ser dependentes dos níveis de substratos e de modificações pós-traducionais, como ocorre em mamíferos, por exemplo (Msanne et al. 2012; Roustan et al. 2017).

Um estudo de fosfoproteômica (Roustan et al. 2017) observou aumento da fosforilação da proteína enoil-ACP redutase (componente do complexo ácidos graxos sintase), cuja abundância foi reduzida nos nossos dados de proteômica e em outros estudos. Além disso, os mesmos autores (Roustan et al. 2017) verificaram aumento de fosforilação em Proteínas Associada à Lipídio Plastidial (PLAP), as quais fazem parte da subfamília fibrilina e estão envolvidas com a formação das vesículas plastidiais, também chamadas de plastoglôbulos ou corpos lipídicos dos cloroplastos. Estes achados ainda não são suficientes para explicar a regulação do acúmulo de TAGs, mas sugerem que as modificações pós-traducionais de algumas proteínas podem ser importantes para este acúmulo. Interessantemente, a abundância de uma PLAP (Cre02.g143667.t1.1) aumentou após 2 horas de limitação de N no presente estudo. Além disso, outras proteínas envolvidas com a síntese, manutenção,

transporte e catabolismo de vesículas nas células, incluindo os corpos lipídicos, também tiveram um aumento na abundância após a limitação de N, como a Proteína indutora de vesículas em plastídeos 1 (VIP1, Cre13.g583550.t1.2) (aumento entre 24 e 72 horas), Subunidade beta de Coatomer (COP-II beta, Cre04.g217921.t1.1) e Subunidade gama de Coatomer (COP-II gamma, Cre06.g310750.t1.2) (aumento contínuo entre 2 e 72 horas).

Diante do exposto, a formação de TAGs no presente estudo provavelmente originou-se parte de síntese *de novo*, parte de cadeias acil presentes nas membranas dos lipídios e por ácidos graxos reciclados pelo remodelamento dos lipídios de membrana. No entanto, é provável que houve uma maior contribuição do remodelamento de lipídios de membrana devido à: i) marcante redução da abundância relativa dessas classes de lipídios após privação de N (**Figuras 29 e 30**); ii) aumento de TAGs polinsaturados (**Anexos B e C**); e iii) ausência de alterações marcantes das enzimas envolvidas com biossíntese *de novo* de ácidos graxos e TAGs.

5.3. Metabolismo de Nitrogênio – ativação de vias envolvidas com metabolismo de Arg

As células de *C. reinhardtii* quando privadas de N ajustam o metabolismo para maximizar a absorção e assimilação N e ao mesmo tempo minimizar o consumo de N. Estas respostas adiantadas foram observadas tanto a nível transcricional quanto proteômico em diversos estudos anteriores (Boyle et al. 2012; Msanne et al. 2012; Blaby et al. 2013; Schmollinger et al. 2014; Valledor et al. 2014; Wase et al. 2014a; Park et al. 2015a). No presente trabalho, assim como esperado, os níveis das enzimas envolvidas com a via GS-GOGAT (glutamina sintetase, Cre02.g113200.t1.1 – Glutamato sintetase, Cre13.g592200.T1.2), responsáveis pela assimilação do amônio e incorporação deste em glutamina e glutamato foram positivamente regulados após 2 h da privação de N e os níveis maiores destas enzimas foram encontrados após 24 horas. Além disso, enzimas envolvidas com o transporte e reciclagem do N orgânico, fornecidos pelo catabolismo de outras proteínas, purinas e aminoácidos, também foram aumentadas como por exemplo, urease carboxilase (Cre08.g360050.t2.1), xantina/uracil permease (Cre10.g442800.t1.1), L-aminoácido oxidase (Cre12.g551352.t1.1), Aspartato aminotransferase (Cre02.g147302.t1.1) e subunidade regulatória de proteassoma 26S (Cre10.g439150.t1.2). Também se verificou 80 proteínas envolvidas com a biossíntese de ribossomos citosólicos e cloroplastídias bastante reduzidas entre 6 e 72 horas de privação de N, estas foram enriquecidas com o termo “tradução” pelo GO. O catabolismo das proteínas e diminuição da tradução, também foram confirmados pela diminuição dos níveis de proteína total por célula (**Figura 12**) e dos níveis da maioria dos aminoácidos mensurados (**Figura 25**).

Dentre as vias de aminoácidos alteradas, a de Arg teve destaque, com diversos termos do GO enriquecidos e alterações nos níveis dos metabólitos relacionados à esta via como ornitina, Arg, agmanina, putrescina e 2-oxoalacetato (ou cetoglutarato) (**Figuras 19, 27 e 42**). Esta resposta também foi observada em estudos anteriores de transcriptômica e proteômica (Schmollinger et al. 2014; Valledor et al. 2014; Gargouri et al. 2015) e uma das hipóteses é que a Arg funciona como um armazenamento de N, pois essa molécula possui uma grande proporção de N/C em comparação com outros aminoácidos. No entanto, além dos nossos resultados de metabolômica, outro estudo também verificou que não houve acúmulo de Arg em resposta ao aumento tardio dos níveis das enzimas (Park et al. 2014), mas sim um acúmulo inicial (entre 1 e 2 horas), provavelmente

causado pela degradação de proteínas. Park et al. (2014) sugeriram que o aumento dos níveis das proteínas envolvidas com a via de Arg pode ser uma resposta similar à indução de proteínas relacionadas à captação e assimilação de N, permitindo que *C. reinhardtii* rapidamente capture qualquer N disponível, intracelular e/ou extracelular, quando em condição de privação de N. Outra possibilidade é que a Arg esteja sendo utilizada pela célula como precursor na biossíntese de poliaminas ou óxido nítrico (NO), como verificado em *Arabidopsis* sob estresse biótico e abiótico (Winter et al. 2015). Por fim, a atividade da enzima N-acetil-L-glutamato quinase (NAGK), identificada sobreexpressa no presente estudo (Cre01.g015000.t1.2), é ativada pelas proteínas de transdução de sinal PII em *Arabidopsis* e cianobactérias (Chen et al. 2006; Fokina et al. 2010), indicando uma possível via de regulação do metabolismo de Arg nas células de *C. reinhardtii*. Segundo Maheswaran et al. (2004) e Fokina et al. (2010), o complexo PII-NAGK é formado para aliviar a inibição do *feedback* da Arg e melhorar a ativação catalítica de NAGK em *Synechococcus*.

Curiosamente, nossos resultados da meta-análise de dados do transcriptoma de *C. reinhardtii* indicaram que esse conjunto de proteínas envolvidas com o metabolismo de Arg também foram positivamente regulados sob outras condições de estresse como baixo pH, exposição à metilmercúrio, limitação de Fe e exposição à peróxido de hidrogênio (**Anexo F**), sugerindo que esta resposta não seja específica apenas para a limitação de N. Consequentemente, denota-se que a Arg e seus derivados, como NO e poliaminas, apresentam outros papéis além do armazenamento e reciclagem de N em *C. reinhardtii*, com importância de sinalização, regulação e aclimação ao estresse como verificado em plantas, animais e em poucos estudos com microalgas (Sanz-Luque et al. 2015; Winter et al. 2015; González-Ballester et al. 2018; Munz et al. 2020). Embora haja estudos anteriores associando Arg, poliaminas e NO com crescimento celular e ação antioxidante em plantas e algas (Miller-Fleming et al. 2015; Chen et al. 2019), outros estudos mais aprofundados são necessários para avaliar o efeito de Arg e seus derivados na regulação de síntese de TAGs.

Neste contexto, realizamos testes de suplementação de Arg (2 mM) nas condições repletas e privadas de N, com objetivo de verificar o possível efeito modulador de Arg no crescimento e acúmulo de TAGs. Nossa conclusão é que, nas condições experimentais testadas, a Arg não interferiu no acúmulo de TAGs (**Figura 37**). Estudos anteriores verificaram que a Arg pode ser utilizada como fonte de N pela *C. reinhardtii*, a qual possui um transportador específico para captação deste aminoácido (Muñoz-Blanco et al. 1990). Considerando esta possibilidade, nossos resultados indicaram que provavelmente a Arg foi utilizada como fonte de N pela microalga, não interferindo no acúmulo de lipídios neutros. Diferentemente do observado no presente estudo, Munz et al. (2020) verificou acúmulo de lipídios neutros em *C. reinhardtii* quando a cultura foi suplementada com 8 mM de Arg em condição mixotrófica. No entanto, considerando que uma molécula de Arg possui 4 vezes mais N do que uma molécula de amônio, o estudo de Munz et al. (2018) torna-se questionável devido ao excesso de N adicionado e à ausência de um controle com a mesma proporção de N. Este desbalanço na razão nitrogênio/carbono (N/C) pode afetar tanto o crescimento, quanto acúmulo de lipídios neutros. Portanto, acreditamos que mais experimentos com diferentes concentrações de Arg e de amônio devam ser realizados para confirmar o efeito da suplementação de Arg no acúmulo de lipídios neutros.

Figura 42. Metabolismo da Arg alterado sob privação de N indicando os metabólitos e enzimas envolvidas

(A) Rota de anabolismo e catabolismo de Arg e via de síntese de Óxido Nítrico (NO) e Poliaminas: Representação dos metabólitos e proteínas em condição de privação de N (Baseado em ChlamyCyc, Munz et al., 2018 e Winter et al. 2015). Metabólitos indicados por fontes em vermelho aumentaram sua concentração relativa entre 0.5h a 8h. Metabólitos em fonte de cor azul diminuíram a concentração relativa entre 0.5h a 8h. Metabólitos com cor preta não foram identificados. Setas vermelhas indicam que a enzima foi identificada na análise proteômica e as enzimas escritas em vermelho indicam que houve aumento após 24h como indicado em B. Enzimas escritas em preto não foram identificadas pela proteômica; (B) Enzimas identificadas e suas concentrações relativas: Enzimas envolvidas com metabolismo de Arg que foram indentificadas na análise proteômica. A linha preta representa a condição controle e a linha tracejada preta representa a condição de privação de N. Os eixos x representam os pontos do tempo em horas. As amostras estão representadas como média $\pm$ desvio padrão (n = 3).

5.4. Fotossíntese, Respiração e Estresse oxidativo

O decaimento do rendimento da fotossíntese durante a privação de N foi bastante reportado tanto em mixotrofia, quanto em fotoautotrofia (Juergens et al. 2015; Blaby et al. 2013). Uma das causas deste decaimento é a alteração estrutural dos lipídios de membrana dos tilacóides compostos por MGDG, DGDG, SQDG e PG, cujos níveis foram severamente reduzidos após 24 horas da limitação de N (**Figuras 29 e 30**). Os níveis de clorofila também foram afetados pela privação de N, como verificado em outros estudos (Msanne et al. 2012; Wase et al. 2014a; Juergens et al. 2015; Park et al. 2015b), e são atribuídos não apenas pela degradação da clorofila, mas também pelo efeito de diluição entre as células devido à interrupção da sua biossíntese (Juergens et al. 2015). No presente estudo, verificamos decaimento de até 3 vezes após a privação de N de proteínas envolvidas com a biossíntese de clorofila *a* e *b* (entre 6 e 72) e biossíntese de carotenóides (entre 48 e 72 horas) (proteínas classificadas no termo do GO Processo biossintético de clorofila), indicando uma diminuição na síntese destes pigmentos. Com relação as proteínas dos fotossistemas I e II (PSI e PSII) e complexo de captação de luz I e II (LHC I e LHC II) observou-se uma variação no comportamento de expressão dependendo da subunidade, mas de modo geral, todos apresentaram uma redução em seus níveis entre 2 e 24 horas em privação de N, corroborando com os estudos anteriores (Msanne et al. 2012; Wase et al. 2014a; Juergens et al. 2015; Park et al. 2015b). No entanto, curiosamente, os níveis de algumas destas proteínas aumentaram após 48 horas, sendo em sua maioria pertencentes ao PSI e LHCI como a subunidade H do PS I (Cre07.g330250.t1.2), LHC I (Cre12.g508750.t1.2), subunidade II do centro de reação do PSI (Cre05.g238332.t1.1), LHC I (Cre07.g344950.t1.2) e subunidade V do centro de reação do PSI (Cre12.g560950.t1.2). Estudos de privação de N em *C. reinhardtii*, cianobactérias e outras microalgas identificaram maior decaimento nos níveis das proteínas e da atividade de PSII do que em PSI (Berges et al. 1996; Park et al. 2015a), indicando um maior fluxo cíclico de elétrons (no PSI) do que um fluxo linear de elétrons (no PSII) no fotossistema de *C. reinhardtii*. Nossos resultados apontam uma predominância do fluxo cíclico de elétrons no PSI devido a necessidade de maiores níveis de ATP diante do longo período na condição de privação de N (48 a 72 horas).

Em contraste, a abundância das proteínas envolvidas com fosforilação oxidativa nas mitocôndrias como as proteínas NADH-ubiquinona (Cre13.g568800.t1.2, Cre12.g535950.t1.2, Cre11.g467668.t1.1, Cre03.g146247.t1.1, Cre07.g327400.t1.1, Cre08.g378050.t1.2 e Cre03.g178250.t1.2), citocromo *c* oxidase (Cre01.g049500.t1.2, Cre13.g567600.t1.2, Cre16.g691850.t1.2, Cre03.g157700.t1.2, Cre12.g537450.t1.2) e ATP sintase (Cre09.g416150.t1.2, Cre16.g680000.t1.2, Cre07.g338050.t1.2, Cre09.g415550.t1.2, Cre17.g698000.t1.2 e Cre12.g522600.t1.2) foram todas aumentadas, em até 6 vezes, após 24 horas de privação de N (estas proteínas foram enriquecidas no termo do GO transporte de elétrons na cadeia respiratória). Este resultado está de acordo com o aumento da glicólise neste mesmo período (entre 24 e 72 horas), indicando um aumento do aporte de ATP, provavelmente com objetivo de manter a viabilidade celular (Msanne et al., 2012; Juergens et al., 2016).

Este aumento no transporte de elétrons eleva os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam estresse oxidativo nas células (Sevilla et al. 2015). A presença destas moléculas nas microalgas e plantas (desencadeada não apenas pela privação de N, mas também por outros tipos de estresse), foi correlacionada à formação dos corpos lipídicos nas células, funcionando como uma molécula sinalizadora (Jia et al. 2013; Menon

et al. 2013; Shi et al. 2017). Nosso estudo corrobora com o relatado anteriormente; proteínas antioxidantes envolvidas com a manutenção da homeostase redox foram identificadas com alta centralidade na rede de coexpressão e alta correlação com o acúmulo de TAGs nas células de *C. reinhardtii*, no presente estudo (**Anexo E**). As proteínas dos sistemas de glutathione e tioredoxina (Glutathione peroxidase 5- Cre10.g458450.t1.1; Glutathione-S-transferase F3 - Cre15.g636800.t1.1; Super família de Tiorredoxin - Cre09.g391900.t1.1; Tiorredoxina H-tipo 1 - Cre12.g554850.t1.2), Arcorbato peroxidase 4 (Cre05.g233900.t1.2), dehidroascorbato redutase 2 (Cre10.g456750.t1.2), Manganes superoxide dismutase 1 (Cre13.g605150.t1.2) e proteína dissulfido-isomerase (Cre02.g088200.t1.2) apresentaram aumento após 24 horas da privação de N. Enquanto as proteínas antioxidantes Ferro superóxido dismutase (Cre10.g436050.t1.2) e Catalase 2 (Cre09.g417150.t1.2) apresentaram resposta inicial, com aumento de abundância entre 1 e 6 horas e posterior decréscimo entre 24 e 48 horas.

5.5. Proteoma nuclear revela fator de transcrição com possível aplicação biotecnológica

Apesar do amplo uso de *C. reinhardtii* em pesquisas ômicas nos últimos anos (Vischi Winck et al. 2013; Mettler et al. 2014; Valledor et al. 2014; Wase et al. 2014b; Park et al. 2015b), incluindo o presente estudo, poucos avaliaram o seu proteoma nuclear, sendo descritos apenas os estudos realizados por (Winck et al. 2012; Arias et al. 2020). Estudos de proteômica total foram conduzidos em *C. reinhardtii* e foram capazes de identificar genes importantes relacionados com privação de nitrogênio e acúmulo de lipídios (Schmollinger et al. 2014; Park et al. 2015b). No entanto, essas abordagens muitas vezes são incapazes de identificar de forma significativa as proteínas regulatórias devido à sua baixa abundância comparando com outros grupos de proteína. Como tal, as redes de regulação gênica que conduzem o acúmulo e partição de lipídios, especialmente em resposta à limitação de nitrogênio, permanecem amplamente desconhecidas (Liu et al. 2013). Os isolados de núcleos relatados aqui são de qualidade e pureza semelhantes aos de estudos anteriores (Winck et al. 2012; Arias et al. 2020), conforme observado a partir de frações enriquecidas de análise microscópica (**Figura 22**) e porcentagens semelhantes de proteínas nucleares foram previstas (**Figura 23**).

Dentre as 660 proteínas identificadas a partir dos extratos enriquecidos de núcleo, 77 têm localização nuclear predita (**Tabela 1**), 16 são fatores de transcrição (TF) e 7 são reguladores transcricionais (TR) (**Tabela 2**). Dentre os TFs e TRs, apenas 2 apresentaram abundância significativamente diferente entre a condição repleta de N (+N) e a condição de privação de N (-N): a TF *Tyby-like protein* (Cre12.g520650.t1.2) e a TR *HMG-box containing* (Cre17.g702650.t1.1), sendo que a primeira aumentou 0,2 vezes sua concentração relativa na condição -N e a segunda foi exclusiva da condição +N.

As proteínas *Tyby-like protein* (TLPs) estão presentes no reino animal e das plantas e estão envolvidas com diferentes mecanismos nas células como transporte vesicular, mediação da sinalização da insulina, transcrição, sinalização da proteína-G e síntese de RNA ribossomal (Boggon et al. 1999; Kapeller et al. 1999; Santagata et al. 2001). Em células transgênicas de *Arabidopsis* portando a TLP de *Malus domestica*, apresentaram melhor crescimento sob estresse osmótico do que a *Arabidopsis* de referência (*wild type*) (Xu et al. 2019). Outro exemplo em tabaco, a superexpressão da TLP de grão de bico conferiu maior tolerância ao sal, seca e estresse oxidativo (Wardhan et al. 2012). Em plantas sob estresse abiótico e biótico, geralmente os TLPs são regulados

positivamente, indicando uma provável participação na transdução de sinal de estresse nas células, mas sua função ainda é incerta (Xu et al. 2019). Em *C. reinhardtii* aparentemente esta proteína pode estar envolvida com a montagem do flagelo (Stolc et al. 2005), no entanto, até o momento não há estudos funcionais desta proteína em *C. reinhardtii*.

No presente trabalho, um mutante de *C.reinhardtii* com deleção no gene que codifica TLP (Cre12.g520650.t1.2) foi cultivado, em paralelo com o a cepa *wild type*, com objetivo de avaliação preliminar do crescimento em condição de privação de N. Identificou-se, a partir das micrografias, um aumento de células-filhas conectadas nas células mutantes (**Figura 40**). Este resultado é preliminar, mas podemos inferir que possivelmente este TF é um regulador negativo da proliferação celular quando presente, pois diante do aumento de células-filhas conectadas no mutante, aparentemente a divisão celular no mutante aumentou por célula (**Figura 40**). Portanto, TLP poderia ser um candidato para engenharia genética, com objetivo de manter a divisão celular de *C. reinhardtii* sob condição de limitação de N. Entretanto, sugere-se estudo mais detalhado do fenótipo deste mutante para avaliar o acúmulo de TAGs e suas respostas moleculares.

6. CONCLUSÕES

Os achados deste estudo expandiram o atual conhecimento sobre os mecanismos moleculares que levam ao acúmulo de TAGs em *C. reinhardtii* em condição fotoautotrófica. Através de uma análise sistemática e integrativa de dados “ômicos” (proteoma, metaboloma e lipidômica) em resposta à privação de N em condição fotoautotrófica demonstramos que o metabolismo de *C. reinhardtii* é significativamente afetado nos três níveis do sistema biológico mensurados, além do proteoma nuclear, indicando que, nestas condições, o acúmulo de lipídios neutros (TAGs) é resultado da regulação de diversas vias em conjunto.

Os principais achados do presente estudo foram:

- As vias metabólicas como gluconeogênese, processo metabólico de ATP, reação de luz na fotossíntese e processo biossintético de arginina mostraram-se ser centralizadores na resposta à privação de N e estão fortemente associados com o acúmulo de TAGs nesta condição.
- É provável que a regulação positiva da via de arginina, observada após a privação de N, não seja uma resposta específica desta condição. Hipotiza-se que a Arg e seus derivados como NO e poliaminas apresentam papel importante de sinalização e regulação ao estresse.
- A maior contribuição para o acúmulo de TAGs na condição estudada foi, provavelmente, pelo remodelamento de lipídios de membrana.
- O método de integração ManiNetCluster utilizado corroborou com a extensa análise individualizada de cada “ômica” realizada previamente no presente estudo, além de confirmar os resultados de transcriptômica realizado anteriormente em outros estudos.
- O fator de transcrição *Tubby-like protein* provavelmente é um regulador negativo da proliferação celular, sendo um candidato para engenharia genética com objetivo de manter a divisão celular de *C. reinhardtii* sob limitação de N.

REFERÊNCIAS

- Aebersold R, Mann M (2016) Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 537:347–355. <https://doi.org/10.1038/nature19949>
- APHA, American Public Health Association (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 19th ed., Washington: Byrd Prepress Springfield.
- Albee AJ, Kwan AL, Lin H, et al (2013) Identification of Cilia Genes That Affect Cell-Cycle Progression Using Whole-Genome Transcriptome Analysis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS ONE* 8:979–991. <https://doi.org/10.1534/g3.113.006338>
- Almaraz-Delgado AL, Flores-Urbe J, Pérez-España VH, et al (2014) Production of therapeutic proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *AMB Express* 4:1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0057-4>
- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, et al (2011) Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends Plant Sci* 16:489–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.05.008>
- Arias C, Obudulu O, Zhao X, et al (2020) Nuclear proteome analysis of *Chlamydomonas* with response to CO₂. *Algal Res* 46:101765. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101765>
- Aslam B, Basit M, Nisar MA, et al (2017) Proteomics: Technologies and their applications. *J Chromatogr Sci* 55:182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- Beauvais-flu R, Slaveykova VI, Cosio C (2016) Transcriptomic and Physiological Responses of the Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii* during Short-Term Exposure to Subnanomolar Methylmercury Concentrations. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00403>
- Berges JA, Charlebois DO, Mauzerall DC, Falkowsk PG (1996) Differential Effects of Nitrogen Limitation on Photosynthetic Efficiency of Photosystems I and II in Microalgae. *Plant Physiol* 689–696
- Blaby IK, Glaesener AG, Mettler T, et al (2013) Systems-Level Analysis of Nitrogen Starvation-Induced Modifications of Carbon Metabolism in a *Chlamydomonas reinhardtii* Starchless Mutant. *Plant Cell* 25:4305–4323. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117580>
- Boggon TJ, Shan WS, Santagata S, et al (1999) Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. *Science* (80-) 286:2119–2125. <https://doi.org/10.1126/science.286.5447.2119>
- Bölling C, Fiehn O (2005) Metabolite profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient deprivation. *Plant Physiol* 139:1995–2005. <https://doi.org/10.1104/pp.105.071589.2>
- Boudière L, Michaud M, Petroutsos D, et al (2014) Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1837:470–480. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.09.007>
- Boyle NR, Page MD, Liu B, et al (2012) Three acyltransferases and nitrogen-responsive regulator are implicated in nitrogen starvation-induced triacylglycerol accumulation in *Chlamydomonas*. *J Biol Chem* 287:15811–15825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.334052>
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248-254.
- Cai T, Park SY, Li Y (2013) Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renew Sustain Energy Rev* 19:360–369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
- Caldana C, Li Y, Leisse A, et al (2013) Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 73:897–909. <https://doi.org/10.1111/tpj.12080>
- Carnielli CM, Winck F V., Paes Leme AF (2015) Functional annotation and biological interpretation of proteomics data. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1854:46–54. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.10.019>
- Chen D, Shao Q, Yin L, et al (2019) Polyamine function in plants: Metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Front Plant Sci* 9:1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01945>
- Chen H, Wang Q (2021) Regulatory mechanisms of lipid biosynthesis in microalgae. *Biol Rev* 14:. <https://doi.org/10.1111/bvr.12759>
- Chen YM, Ferrar TS, Lohmeir-Vogel E, et al (2006) The PII signal transduction protein of *Arabidopsis thaliana* forms an arginine-regulated complex with plastid N-acetyl glutamate kinase. *J Biol Chem* 281:5726–5733. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510945200>
- Cheng D, He Q (2014) Assessment of environmental stresses for enhanced microalgal biofuel production - an overview. *Front Energy Res* 2:1–8. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00026>
- Cherubini F, Strømman AH (2011) Life cycle assessment of bioenergy systems: State of the art and future challenges. *Bioresour Technol* 102:437–451. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.010>

- Chiari L, Zecca A (2011) Constraints of fossil fuels depletion on global warming projections. *Energy Policy* 39:5026–5034. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.06.011>
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Cox J, Hein MY, Lubner CA, et al (2014) Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* 13:2513–2526. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591>
- Fan J, Andre C, Xu C (2011) A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 585:1985–1991. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018>
- Fan J, Yan C, Andre C, et al (2012) Oil accumulation is controlled by carbon precursor supply for fatty acid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* 53:1380–1390. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs082>
- Fokina O, Chellamuthu VR, Zeth K, Forchhammer K (2010) A novel signal transduction protein PII variant from *synechococcus elongatus* PCC 7942 indicates a two-step process for NAGK-PII complex formation. *J Mol Biol* 399:410–421. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.018>
- Foyer CH, Parry M, Noctor G (2003) Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *J Exp Bot* 54:585–593. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg053>
- Gallaher SD, Fitz-gibbon ST, Strenkert D, et al (2018) High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved de novo assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates. *Plant J* 93:545–565. <https://doi.org/10.1111/tpj.13788>
- Gargouri M, Park JJ, Holguin FO, et al (2015) Identification of regulatory network hubs that control lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Exp Bot* 66:4551–4566. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv217>
- González-Ballester D, Sanz-Luque E, Galván A, et al (2018) Arginine is a component of the ammonium-CYG56 signalling cascade that represses genes of the nitrogen assimilation pathway in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* 13:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196167>
- Goodenough U, Blaby I, Casero D, et al (2014) The Path to Triacylglyceride Obesity in the sta6 Strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. 13:591–613. <https://doi.org/10.1128/EC.00013-14>
- Goodson C, Roth R, Wang ZT, Goodenough U (2011) Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. *Eukaryot Cell* 10:1592–1606. <https://doi.org/10.1128/EC.05242-11>
- Gouveia L, Oliveira AC (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:269–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0495-6>
- Gorman DS, Levine RP (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 54, p. 1665-1669.
- Greene CS, Troyanskaya OG (2010) Integrative systems biology for data-driven knowledge discovery. *Semin Nephrol* 30:443–454. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.07.002>
- Guarnieri MT, Nag A, Yang S, Pienkos PT (2013) Proteomic analysis of *Chlorella vulgaris*: Potential targets for enhanced lipid accumulation. *J Proteomics* 93:245–253. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.025>
- Gygi SP, Rochon Y, Franz BR, Aebersold R (1999) Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. 19:1720–1730
- Hannon M, Gimpel J, Tran M, et al (2010) Biofuels from algae: challenges and potential. *Biofuels* 1:763–784. <https://doi.org/10.4155/bfs.10.44>
- Holčapek M, Liebisch G, Ekroos K (2018) Lipidomic Analysis. *Anal Chem* 90:4249–4257. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b05395>
- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, et al (2008) Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: Perspectives and advances. *Plant J* 54:621–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2008.03492.x>
- Hummel J, Segu S, Li Y, et al (2011) Ultra Performance Liquid Chromatography and High Resolution Mass Spectrometry for the Analysis of Plant Lipids. *Front Plant Sci* 2:1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00054>
- Ideker T, Galitski T, Hood L (2001) A NEW APPROACH TO DECODING LIFE :
- Jia L, Xu W, Li W, et al (2013) Class III peroxidases are activated in proanthocyanidin-deficient *Arabidopsis thaliana* seeds. *Ann Bot* 111:839–847. <https://doi.org/10.1093/aob/mct045>
- Jiang YL, Wang XP, Sun H, et al (2017) Coordinating carbon and nitrogen metabolic signaling through the cyanobacterial global repressor NdhR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:403–408. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716062115>

- Johnson X, Alric J (2013a) Central carbon metabolism and electron transport in *chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryot Cell* 12:776–793. <https://doi.org/10.1128/EC.00318-12>
- Johnson X, Alric J (2013b) Central carbon metabolism and electron transport in *chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryot Cell* 12:776–793. <https://doi.org/10.1128/EC.00318-12>
- Jones CS, Mayfield SP (2012) Algae biofuels: Versatility for the future of bioenergy. *Curr Opin Biotechnol* 23:346–351. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.013>
- Juergens MT, Deshpande RR, Lucker BF, et al (2015) The Regulation of Photosynthetic Structure and Function during Nitrogen Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 167:558–573. <https://doi.org/10.1104/pp.114.250530>
- Juergens MT, Disbrow B, Shachar-Hill Y (2016a) The relationship of triacylglycerol and starch accumulation to carbon and energy flows during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 171:2445–2457. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00761>
- Juergens MT, Disbrow B, Shachar-Hill Y (2016b) The Relationship of Triacylglycerol and Starch Accumulation to Carbon and Energy Flows During Nutrient Deprivation in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 171:pp.00761.2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00761>
- Jüppner J, Mubeen U, Leisse A, et al (2017) Dynamics of lipids and metabolites during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 92:331–343. <https://doi.org/10.1111/tpj.13642>
- Kapeller R, Moriarty A, Strauss A, et al (1999) Tyrosine phosphorylation of tub and its association with Src homology 2 domain-containing proteins implicate tub in intracellular signaling by insulin. *J Biol Chem* 274:24980–24986. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24980>
- Kou Z, Bei S, Sun J, Pan J (2013) Fluorescent measurement of lipid content in the model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Appl Phycol* 25:1633–1641. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0011-x>
- Krall L, Huege J, Catchpole G, et al (2009) Assessment of sampling strategies for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) based metabolomics of cyanobacteria. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 877:2952–2960. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.07.006>
- La Russa M, Bogen C, Uhmeyer A, et al (2012) Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* 162:13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.04.006>
- Lee DY, Fiehn O (2013) Metabolomic response of *chlamydomonas reinhardtii* to the inhibition of target of rapamycin (tor) by rapamycin. *J Microbiol Biotechnol* 23:923–931. <https://doi.org/10.4014/jmb.1304.04057>
- Lee DY, Park J-J, Barupal DK, Fiehn O (2012) System Response of Metabolic Networks in *Chlamydomonas reinhardtii* to Total Available Ammonium. *Mol Cell Proteomics* 11:973–988. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.016733>
- Li C, Guan Z, Liu D, Raetz CRH (2011) Pathway for lipid A biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* resembling that of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:11387–11392. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108840108>
- Li J, Han D, Wang D, et al (2014) Choreography of transcriptomes and lipidomes of *Nannochloropsis* reveals the mechanisms of oil synthesis in microalgae. *Plant Cell* 26:1645–1665. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121418>
- Li Y, Han D, Hu G, et al (2010) *Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyper-accumulates triacylglycerol. *Metab Eng* 12:387–391. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.02.002>
- Liu B, Vieler A, Li C, et al (2013) Triacylglycerol profiling of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Nannochloropsis oceanica*. *Bioresour Technol* 146:310–316. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.088>
- Liu X, Locasale JW (2017) Metabolomics: A Primer. *Trends Biochem Sci* 42:274–284. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.004>
- Maheswaran M, Urbanke C, Forchhammer K (2004) Complex formation and catalytic activation by the PII signaling protein of N-acetyl-L-glutamate kinase from *synechococcus elongatus* strain PCC 7942. *J Biol Chem* 279:55202–55210. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410971200>
- Maldonado MT, Hughes MP, Rue EL, Wells ML (2002) The effect of Fe and Cu on growth and domoic acid production by *Pseudo-nitzschia multiseries* and *Pseudo-nitzschia australis*. *Limnol Oceanogr* 47:515–526. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.2.0515>
- McConn M, Browse J (1998) Polyunsaturated membranes are required for photosynthetic competence in a mutant of *Arabidopsis*. *Plant J* 15:521–530. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00229.x>

- Melino VJ, Casartelli A, George J, et al (2018) RNA catabolites contribute to the nitrogen pool and support growth recovery of wheat. *Front Plant Sci* 871:1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01539>
- Melo DOP, Moncada RJ-P, Winck FV, Barrios AFG (2014) In Silico Analysis for Biomass Synthesis under Different CO₂ Levels for *Chlamydomonas reinhardtii* Utilizing a Flux Balance Analysis Approach. In: *Advances in Intelligent Systems and Computing*. pp 279–285
- Menon KR, Balan R, Suraishkumar GK (2013) Stress induced lipid production in *Chlorella vulgaris*: Relationship with specific intracellular reactive species levels. *Biotechnol Bioeng* 110:1627–1636. <https://doi.org/10.1002/bit.24835>
- Merchant SS, Kropat J, Liu B, et al (2012) TAG , You ' re it ! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Curr Opin Biotechnol* 23:352–363. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.12.001>
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, et al (2007) The *Chlamydomonas* Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science* (80-) 318:245–250. <https://doi.org/10.1126/science.1143609>
- Mettler T, Muhlhaut T, Hemme D, et al (2014) Systems Analysis of the Response of Photosynthesis, Metabolism, and Growth to an Increase in Irradiance in the Photosynthetic Model Organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 26:2310–2350. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124537>
- Miller-Fleming L, Olin-Sandoval V, Campbell K, Ralser M (2015) Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *J Mol Biol* 427:3389–3406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.020>
- Miller R, Wu G, Deshpande RR, et al (2010) Changes in Transcript Abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following Nitrogen Deprivation Predict Diversion of Metabolism. *Plant Physiol* 154:1737–1752. <https://doi.org/10.1104/pp.110.165159>
- Minhas AK, Hodgson P, Barrow CJ, Adholeya A (2016) A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Front Microbiol* 7:1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00546>
- Msanne J, Xu D, Konda AR, et al (2012) Metabolic and gene expression changes triggered by nitrogen deprivation in the photoautotrophically grown microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Coccomyxa* sp. C-169. *Phytochemistry* 75:50–59. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.007>
- Mubeen U, Giraldi LA, Jüppner J, Giavalisco P (2019) A multi-omics extraction method for the in-depth analysis of synchronized cultures of the green alga *chlamydomonas reinhardtii*. *J Vis Exp* 2019:. <https://doi.org/10.3791/59547>
- Muñoz-Blanco J, Hidalgo-Martínez J, Cárdenas J (1990) Extracellular deamination of l-amino acids by *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Planta* 182:194–198. <https://doi.org/10.1007/BF00197110>
- Munz J, Xiong Y, Kariyawasam T, et al (2018) Arginine culture turns on the elusive nitrogen starvation signal during robust phototrophic growth in *Chlamydomonas*. *bioRxiv*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1101/416594>
- Munz J, Xiong Y, Kim JYH, et al (2020) Arginine-fed cultures generates triacylglycerol by triggering nitrogen starvation responses during robust growth in *Chlamydomonas*. *Algal Res* 46:101782. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101782>
- Nguyen ND, Blaby IK, Wang D (2019) ManiNetCluster: A novel manifold learning approach to reveal the functional links between gene networks. *BMC Genomics* 20:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6329-2>
- Park JJ, Wang H, Gargouri M, et al (2015a) The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: A systems biology analysis. *Plant J* 81:611–624. <https://doi.org/10.1111/tpj.12747>
- Park JJ, Wang H, Gargouri M, et al (2015b) The response of *Chlamydomonas reinhardtii* to nitrogen deprivation: A systems biology analysis. *Plant J* 81:611–624. <https://doi.org/10.1111/tpj.12747>
- Pick U, Avidan O (2017) Triacylglycerol is produced from starch and polar lipids in the green alga *Dunaliella tertiolecta*. *J Exp Bot* 68:4939–4950. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx280>
- Posewitz MC (2004) Hydrogen Photoproduction Is Attenuated by Disruption of an Isoamylase Gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Online* 16:2151–2163. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.021972>
- Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:635–648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M (2003) Stop And Go Extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* 75:663–670. <https://doi.org/10.1021/ac026117i>
- Rasala BA, Mayfield SP (2015) Photosynthetic biomanufacturing in green algae; Production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynth Res* 123:227–239. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-9994-7>

- Riaño-Pachón DM, Corrêa LGG, Trejos-Espinosa R, Mueller-Roeber B (2008) Green transcription factors: A chlamydomonas overview. *Genetics* 179:31–39. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.086090>
- Robertson GP, Vitousek PM (2009) Nitrogen in agriculture: Balancing the cost of an essential resource. *Annu Rev Environ Resour* 34:97–125. <https://doi.org/10.1146/annurev.environ.032108.105046>
- Roustan V, Bakhtiari S, Roustan PJ, Weckwerth W (2017) Quantitative in vivo phosphoproteomics reveals reversible signaling processes during nitrogen starvation and recovery in the biofuel model organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Biofuels* 10:1–24. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0949-z>
- Salas-Montantes CJ, González-Ortega O, Ochoa-Alfaro AE, et al (2018) Lipid accumulation during nitrogen and sulfur starvation in *Chlamydomonas reinhardtii* overexpressing a transcription factor. *J Appl Phycol* 30:1721–1733. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1393-6>
- Salem MA, Jęppner J, Bajdzienko K, Giavalisco P (2016) Protocol: A fast, comprehensive and reproducible one-step extraction method for the rapid preparation of polar and semi-polar metabolites, lipids, proteins, starch and cell wall polymers from a single sample. *Plant Methods* 12:1–15. <https://doi.org/10.1186/s13007-016-0146-2>
- Santagata S, Boggon TJ, Baird CL, et al (2001) G-protein signaling through tubby proteins. *Science* (80-) 292:2041–2050. <https://doi.org/10.1126/science.1061233>
- Sanz-Luque E, Chamizo-Ampudia A, Llamas A, et al (2015) Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Front Plant Sci* 6:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899>
- Sayre R (2010) Microalgae: The potential for carbon capture. *Bioscience* 60:722–727. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.9.9>
- Schmollinger S, Muhlhaus T, Boyle NR, et al (2014) Nitrogen-Sparing Mechanisms in *Chlamydomonas* Affect the Transcriptome, the Proteome, and Photosynthetic Metabolism. *Plant Cell* 26:1410–1435. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.122523>
- Scippa GS, Di Michele M, Onelli E, et al (2004) The histone-like protein H1-S and the response of tomato leaves to water deficit. *J Exp Bot* 55:99–109. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh022>
- Scott SA, Davey MP, Dennis JS, et al (2010) Biodiesel from algae: Challenges and prospects. *Curr Opin Biotechnol* 21:277–286. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.005>
- Sevilla F, Camejo D, Ortiz-Espín A, et al (2015) The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: Current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *J Exp Bot* 66:2945–2955. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv146>
- Sheth BP, Thaker VS (2014) Plant systems biology: Insights, advances and challenges. *Planta* 240:33–54. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2059-5>
- Shi K, Gao Z, Shi TQ, et al (2017) Reactive oxygen species-mediated cellular stress response and lipid accumulation in oleaginous microorganisms: The state of the art and future perspectives. *Front Microbiol* 8:1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00793>
- Shtaida N, Khozin-Goldberg I, Solovchenko A, et al (2014) Downregulation of a putative plastid PDC E1 α subunit impairs photosynthetic activity and triacylglycerol accumulation in nitrogen-starved photoautotrophic *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Exp Bot* 65:6563–6576. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru374>
- Siaut M, Cuiné S, Cagnon C, et al (2011) Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC Biotechnol* 11:7. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-7>
- Singh P, Kumari S, Guldhe A, et al (2016) Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae. *Renew Sustain Energy Rev* 55:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.11.001>
- Stitt M, Fernie AR (2003) From measurements of metabolites to metabolomics: An “on the fly” perspective illustrated by recent studies of carbon-nitrogen interactions. *Curr Opin Biotechnol* 14:136–144. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00023-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00023-5)
- Stolc V, Samanta MP, Tongprasit W, Marshall WF (2005) Genome-wide transcriptional analysis of flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies orthologs of ciliary disease genes
- Sueoka N. (1960) *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 46, p. 83-91.
- Takeuchi T, Benning C (2019) Nitrogen-dependent coordination of cell cycle, quiescence and TAG accumulation in *Chlamydomonas*. *Biotechnol Biofuels* 12:1–20. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1635-0>
- Tyanova S, Temu T, Sinitsyn P, et al (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13:731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
- Urzica EI, Adler LN, Page MD, et al (2012a) Impact of Oxidative Stress on Ascorbate Biosynthesis in *Chlamydomonas* via Regulation of the VTC2 Gene Encoding a GDP-L-galactose Phosphorylase. *J Biol Chem* 287:14234–14245. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341982>

- Urzica EI, Casero D, Yamasaki H, et al (2012b) Systems and Trans -System Level Analysis Identifies Conserved Iron Deficiency Responses in the Plant Lineage. *Plant Cell* 24:3921–3948. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.102491>
- Valledor L, Furuhashi T, Recuenco-Muñoz L, et al (2014) System-level network analysis of nitrogen starvation and recovery in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals potential new targets for increased lipid accumulation. *Biotechnol Biofuels* 7:1–17. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0171-1>
- Vargas SR, dos Santos PV, Giraldo LA, et al (2018) Anaerobic phototrophic processes of hydrogen production by different strains of microalgae *Chlamydomonas* sp. *FEMS Microbiol Lett* 365:. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny073>
- Vidotti ADS, Riaño-Pachón DM, Mattiello L, et al (2020) Analysis of autotrophic, mixotrophic and heterotrophic phenotypes in the microalgae *Chlorella vulgaris* using time-resolved proteomics and transcriptomics approaches. *Algal Res* 51:102060. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102060>
- Vischi Winck F, Arvidsson S, Riaño-Pachón DM, et al (2013) Genome-Wide Identification of Regulatory Elements and Reconstruction of Gene Regulatory Networks of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* under Carbon Deprivation. *PLoS One* 8:e79909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079909>
- Wang B, Li Y, Wu N, Lan CQ (2008) CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:707–718. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1518-y>
- Wardhan V, Jahan K, Gupta S, et al (2012) Overexpression of CaTLP1, a putative transcription factor in chickpea (*Cicer arietinum* L.), promotes stress tolerance. *Plant Mol Biol* 79:479–493. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9925-y>
- Wase N, Black PN, Stanley BA, Dirusso CC (2014a) Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling. *J Proteome Res* 13:1373–1396. <https://doi.org/10.1021/pr400952z>
- Wase N, Black PN, Stanley BA, Dirusso CC (2014b) Integrated quantitative analysis of nitrogen stress response in *Chlamydomonas reinhardtii* using metabolite and protein profiling. *J Proteome Res* 13:1373–1396. <https://doi.org/10.1021/pr400952z>
- Wase N, Tu B, Rasineni GK, et al (2019) Remodeling of *chlamydomonas* metabolism using synthetic inducers results in lipid storage during growth. *Plant Physiol* 181:1029–1049. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00758>
- Winck FV, Páez Melo DO, González Barrios AF (2013) Carbon acquisition and accumulation in microalgae *Chlamydomonas*: Insights from “omics” approaches. *J Proteomics* 94:207–218. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.09.016>
- Winck F V., Melo DOP, Riaño-Pachón DM, et al (2016) Analysis of Sensitive CO₂ Pathways and Genes Related to Carbon Uptake and Accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* through Genomic Scale Modeling and Experimental Validation. *Front Plant Sci* 7:1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00043>
- Winck F V., Riaño-Pachón DM, Sommer F, et al (2012) The nuclear proteome of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics* 12:95–100. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000782>
- Winter G, Todd CD, Trovato M, et al (2015) Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front Plant Sci* 6:1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00534>
- Work VH, Radakovits R, Jinkerson RE, et al (2010) Increased lipid accumulation in the *Chlamydomonas reinhardtii* sta7-10 starchless isoamylase mutant and increased carbohydrate synthesis in complemented strains. *Eukaryot Cell* 9:1251–1261. <https://doi.org/10.1128/EC.00075-10>
- Xu J, Xing S, Sun Q, et al (2019) The expression of a tubby-like protein from *Malus domestica* (MdTLP7) enhances abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 19:1–8. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1662-9>
- Yang D, Song D, Kind T, et al (2015) Lipidomic analysis of *chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen and sulfur deprivation. *PLoS One* 10:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137948>
- Yen HW, Hu IC, Chen CY, et al (2013) Microalgae-based biorefinery - From biofuels to natural products. *Bioresour Technol* 135:166–174. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.099>
- Zabawinski C, Koornhuyse N, D'Hulst C, et al (2001) Starchless Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Lack the Small Subunit of a Heterotetrameric ADP-Glucose Pyrophosphorylase Starchless Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Lack the Small Subunit of a Heterotetrameric ADP-Glucose Pyrophosphorylase. *J Bacteriol* 183:1069–1077. <https://doi.org/10.1128/JB.183.3.1069>
- Zhang YM, Chen H, He CL, Wang Q (2013) Nitrogen Starvation Induced Oxidative Stress in an Oil-Producing Green Alga *Chlorella sorokiniana* C3. *PLoS One* 8:1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069225>
- Zheng P, Allen WB, Roesler K, et al (2008) A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize. *Nat Genet* 40:367–372. <https://doi.org/10.1038/ng.85>

- Zienkiewicz K, Du Z, Ma W, et al (2016) Biochimica et Biophysica Acta Stress-induced neutral lipid biosynthesis in microalgae — Molecular , cellular and physiological insights. BBA - Mol Cell Biol Lipids. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.008>
- Zulu NN, Zienkiewicz K, Vollheyde K, Feussner I (2018) Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. Prog Lipid Res 70:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001>

ANEXOS

ANEXO A. Distribuição dos lipídios triacilgliceróis (TAGs) polinsaturados (3 a 9 insaturações) ao longo do tempo

ANEXO B. Distribuição dos lipídios triacilgliceróis (TAGs) saturados, monoinsaturados e diinsaturados ao longo do tempo.

ANEXO C. Número de proteínas em cada termo do Gene Ontology (GO) enriquecidos em cada módulo.

I) Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos no módulo 1.

II) Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 2.

Number of proteins per biological process at Cluster 2

Number of proteins per molecular function at Cluster 2

Number of proteins per cellular component at Cluster 2

III) Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 3.

IV) Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 6

V) **Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 7**

Number of proteins per molecular function at Cluster 7

Number of proteins per cellular component at Cluster 7

VI) **Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 8**

Number of proteins per biological process at Cluster 8

Number of proteins per molecular function at Cluster 8

VII) Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 9

VIII) Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 11 (Processo biológico)

IX) Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 11 (Função molecular e componente celular)

X) Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 12

XI) Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 14

Number of proteins per biological process at Cluster 14

Number of proteins per molecular function at Cluster 14

XII) Número de proteínas em cada termo do GO enriquecidos do módulo 15

ANEXO D. Top 100 proteínas com maior valor de centralidade de rede nas condições de privação de N e controle.

I) Top 100 proteínas com maior valor de centralidade de rede *degree* nas condições de privação de N e controle.

Top 100 proteínas maior <i>degree</i> - Privação de N		Top 100 proteínas maior <i>degree</i> - Controle	
Identificador Proteína	Degree	Identificador Proteína	Degree
Cre06.g285250.t1.2	0.0083	Cre06.g272850.t1.2	0.0083
Cre03.g190100.t1.1	0.0083	Cre01.g040000.t1.2	0.0076
Cre09.g396326.t1.1	0.0076	Cre13.g603225.t1.1	0.0076
Cre03.g208050.t1.2	0.0076	Cre10.g444700.t1.1	0.0076
Cre16.g689087.t1.1	0.0076	Cre01.g051500.t1.2	0.0076
Cre11.g467556.t1.1	0.0076	Cre04.g222700.t1.2	0.0076
Cre09.g411900.t1.1	0.0076	Cre17.g699000.t2.1	0.0076
Cre01.g032300.t1.2	0.0076	Cre03.g174750.t1.2	0.0076
Cre03.g187450.t1.2	0.0076	Cre03.g206600.t1.2	0.0076
Cre06.g282800.t1.2	0.0076	Cre10.g440450.t1.2	0.0076
Cre12.g535851.t1.1	0.0068	Cre03.g204601.t1.1	0.0076
Cre17.g702650.t1.1	0.0068	Cre12.g500150.t1.1	0.0076
Cre03.g194350.t1.2	0.0068	Cre09.g394750.t1.2	0.0076
Cre06.g298350.t1.2	0.0068	Cre06.g251500.t1.2	0.0076
Cre01.g026550.t1.1	0.0068	Cre06.g273300.t1.2	0.0068
Cre05.g234550.t2.1	0.0068	Cre05.g234550.t2.1	0.0068
Cre16.g656400.t1.2	0.0068	Cre12.g533550.t1.1	0.0068
Cre16.g690431.t2.1	0.0068	Cre06.g265800.t1.2	0.0068
Cre11.g476550.t1.2	0.0068	Cre16.g680700.t1.2	0.0068
Cre03.g189500.t1.2	0.0068	Cre13.g573250.t1.2	0.0068
Cre03.g173350.t2.1	0.0068	Cre08.g370650.t1.2	0.0068
Cre09.g415700.t1.2	0.0068	Cre09.g408000.t1.1	0.0068
Cre05.g245900.t1.2	0.0068	Cre01.g020950.t1.2	0.0068
Cre07.g314100.t1.2	0.0068	Cre09.g394065.t2.1	0.0068
Cre12.g509650.t1.2	0.0068	Cre12.g519180.t2.1	0.0068
Cre09.g416150.t1.2	0.0068	Cre08.g359350.t1.2	0.0068
Cre01.g048150.t1.2	0.0068	Cre10.g435800.t1.2	0.0068
Cre03.g194400.t1.2	0.0068	Cre10.g430400.t1.2	0.0068
Cre16.g688050.t1.1	0.0068	Cre01.g000350.t1.1	0.0068
Cre12.g532550.t1.1	0.0068	Cre05.g243800.t1.2	0.0068
Cre05.g242300.t1.2	0.0068	Cre12.g516200.t1.2	0.0068
Cre11.g482600.t1.1	0.0068	Cre10.g423650.t1.2	0.0068
Cre04.g214150.t1.1	0.0068	Cre03.g158750.t1.1	0.0068
Cre03.g192850.t1.2	0.0068	Cre15.g635650.t2.1	0.0068
Cre06.g263250.t1.1	0.0068	Cre17.g746997.t1.1	0.0068
Cre04.g214503.t2.1	0.0068	Cre01.g042800.t1.2	0.0068
Cre10.g452350.t1.1	0.0068	Cre12.g512300.t1.2	0.0068
Cre08.g384000.t1.1	0.0068	Cre02.g091700.t1.2	0.0068
Cre12.g528750.t1.2	0.0068	Cre10.g440050.t1.2	0.0068
Cre03.g172850.t1.2	0.0068	Cre14.g621450.t1.2	0.0068
Cre08.g365400.t1.2	0.0068	Cre02.g143250.t1.2	0.0068
Cre15.g636750.t1.2	0.0068	Cre12.g556050.t1.2	0.0068
Cre02.g077750.t1.2	0.0061	Cre12.g498900.t1.2	0.0068
Cre14.g614350.t1.2	0.0061	Cre09.g411900.t1.1	0.0061
Cre07.g332950.t1.2	0.0061	Cre09.g415800.t1.2	0.0061
Cre05.g238332.t1.1	0.0061	Cre06.g257500.t1.2	0.0061
Cre06.g263450.t1.2	0.0061	Cre13.g587050.t1.2	0.0061
Cre01.g050850.t2.1	0.0061	Cre06.g309100.t1.2	0.0061
Cre12.g485800.t1.2	0.0061	Cre15.g635600.t1.2	0.0061
Cre24.g755497.t1.1	0.0061	Cre06.g284550.t1.2	0.0061
Cre11.g481000.t1.2	0.0061	Cre01.g010400.t1.2	0.0061
Cre03.g201900.t1.1	0.0061	Cre17.g702200.t1.2	0.0061
Cre06.g290950.t1.2	0.0061	Cre08.g358556.t2.1	0.0061
Cre12.g558900.t1.2	0.0061	Cre12.g489150.t1.2	0.0061
Cre02.g092900.t1.2	0.0061	Cre13.g603850.t1.2	0.0061
Cre09.g393358.t1.1	0.0061	Cre05.g234638.t1.1	0.0061
Cre05.g245950.t1.1	0.0061	Cre16.g661350.t1.2	0.0061
Cre01.g004350.t1.2	0.0061	Cre06.g252650.t1.2	0.0061
Cre12.g489150.t1.2	0.0061	Cre03.g176250.t1.2	0.0061
Cre06.g273300.t1.2	0.0061	Cre10.g451900.t1.1	0.0061
Cre01.g033400.t1.2	0.0061	Cre09.g388467.t1.1	0.0061
Cre06.g300700.t1.1	0.0061	Cre06.g258700.t1.1	0.0061
Cre01.g010900.t1.2	0.0061	Cre17.g737050.t1.2	0.0061
Cre08.g384750.t1.1	0.0061	Cre12.g494850.t1.2	0.0061
Cre48.g761197.t1.1	0.0061	Cre06.g285401.t1.1	0.0061
Cre06.g262900.t1.2	0.0061	Cre09.g395350.t1.1	0.0061
Cre13.g588100.t1.2	0.0061	Cre06.g272050.t1.2	0.0061
Cre11.g467770.t1.1	0.0061	Cre01.g027800.t1.2	0.0061
Cre10.g436650.t1.1	0.0061	Cre16.g664550.t1.2	0.0061
Cre03.g182551.t1.2	0.0061	Cre12.g514200.t1.2	0.0061
Cre10.g451900.t1.1	0.0061	Cre01.g042750.t1.2	0.0061
Cre10.g423650.t1.2	0.0061	Cre08.g360900.t1.2	0.0061
Cre03.g152150.t1.2	0.0061	Cre03.g202113.t1.1	0.0061
Cre05.g243800.t1.2	0.0061	Cre03.g182150.t1.2	0.0061
Cre01.g039250.t2.1	0.0061	Cre16.g696000.t1.2	0.0061
Cre03.g176250.t1.2	0.0061	Cre01.g015350.t1.1	0.0061
Cre08.g358556.t2.1	0.0061	Cre06.g308250.t1.2	0.0061
Cre12.g537581.t1.1	0.0061	Cre06.g257601.t1.2	0.0061
Cre09.g410700.t1.2	0.0061	Cre06.g279850.t1.2	0.0061

Cre11.g480150.t1.2	0.0061	Cre12.g554850.t1.2	0.0061
Cre14.g616100.t1.1	0.0061	Cre19.g750547.t4.1	0.0061
Cre06.g259900.t1.2	0.0061	Cre12.g493250.t1.2	0.0061
Cre06.g278750.t1.2	0.0061	Cre08.g358580.t1.1	0.0061
Cre12.g494450.t1.2	0.0061	Cre02.g077300.t1.2	0.0061
Cre01.g048950.t1.2	0.0061	Cre01.g001100.t1.2	0.0061
Cre04.g217550.t1.1	0.0061	Cre02.g146250.t1.2	0.0061
Cre02.g147900.t4.1	0.0061	Cre12.g510450.t1.2	0.0061
Cre12.g510650.t1.2	0.0061	Cre06.g275900.t1.2	0.0061
Cre09.g415800.t1.2	0.0061	Cre07.g326950.t1.1	0.0061
Cre10.g419950.t1.1	0.0061	Cre17.g741450.t1.2	0.0061
Cre12.g558100.t1.2	0.0061	Cre03.g144627.t1.1	0.0061
Cre06.g264350.t1.2	0.0061	Cre01.g002500.t1.2	0.0061
Cre03.g145507.t1.1	0.0061	Cre05.g233800.t1.2	0.0061
Cre16.g691850.t1.2	0.0061	Cre12.g537450.t1.2	0.0061
Cre10.g441400.t1.2	0.0061	Cre05.g245900.t1.2	0.0061
Cre16.g664550.t1.2	0.0061	Cre12.g494450.t1.2	0.0061
Cre03.g180750.t1.2	0.0061	Cre06.g275100.t1.2	0.0061
Cre03.g175400.t2.1	0.0061	Cre02.g097550.t1.2	0.0061
Cre12.g529651.t1.1	0.0061	Cre14.g614300.t1.2	0.0061
Cre09.g393200.t1.2	0.0061	Cre01.g038850.t1.1	0.0061

II) Top 100 proteínas com menor e maior valor de centralidade de rede *closeness* nas condições de privação de N e controle.

Top 100 proteínas <u>maior</u> <i>closeness</i> - Privação de N		Top 100 proteínas <u>maior</u> <i>closeness</i> - Controle	
Identificador Proteína	<i>Closeness</i>	Identificador Proteína	<i>Closeness</i>
Cre17.g746997.t1.1	0.0788	Cre17.g703900.t1.2	0.0044
Cre07.g340450.t1.1	0.0786	Cre12.g551352.t1.1	0.0044
Cre08.g380201.t1.1	0.0784	Cre06.g294200.t1.1	0.0049
Cre14.g612633.t1.1	0.0781	Cre17.g715300.t1.2	0.0049
Cre12.g526800.t1.2	0.0777	Cre12.g540650.t1.2	0.0054
Cre10.g459200.t1.2	0.0773	Cre09.g392208.t1.1	0.0054
Cre09.g394436.t1.1	0.0766	Cre02.g077750.t1.2	0.0061
Cre14.g619133.t1.1	0.0755	Cre14.g614350.t1.2	0.0061
Cre16.g682725.t1.1	0.0746	Cre07.g332950.t1.2	0.0061
Cre10.g456050.t2.1	0.0741	Cre02.g079500.t1.1	0.0394
Cre13.g567450.t1.2	0.0740	Cre09.g402515.t1.1	0.0394
Cre17.g703700.t1.1	0.0739	Cre10.g442800.t1.1	0.0394
Cre06.g258800.t1.1	0.0737	Cre12.g504950.t1.2	0.0394
Cre02.g143250.t1.2	0.0737	Cre09.g395350.t1.1	0.0411
Cre06.g278210.t1.1	0.0736	Cre08.g360050.t2.1	0.0411
Cre12.g528750.t1.2	0.0736	Cre17.g706600.t1.2	0.0419
Cre06.g261450.t1.2	0.0731	Cre06.g263450.t1.2	0.0420
Cre06.g275900.t1.2	0.0729	Cre09.g396213.t1.1	0.0420
Cre01.g021251.t1.1	0.0725	Cre12.g549550.t1.2	0.0421
Cre17.g729150.t1.2	0.0720	Cre05.g238332.t1.1	0.0421
Cre09.g388726.t1.1	0.0715	Cre08.g372450.t1.2	0.0421
Cre11.g477950.t1.1	0.0714	Cre04.g216850.t1.2	0.0424
Cre01.g029750.t1.1	0.0714	Cre12.g537000.t1.2	0.0427
Cre13.g582800.t1.2	0.0710	Cre09.g402775.t1.1	0.0428
Cre09.g416150.t1.2	0.0709	Cre19.g750147.t1.1	0.0428
Cre16.g680000.t1.2	0.0706	Cre09.g394399.t1.1	0.0436
Cre10.g444700.t1.1	0.0702	Cre07.g356350.t1.1	0.0438
Cre10.g430000.t1.1	0.0702	Cre06.g285250.t1.2	0.0438
Cre17.g714650.t1.2	0.0701	Cre05.g234550.t2.1	0.0438
Cre04.g218100.t1.2	0.0699	Cre09.g411100.t2.1	0.0439
Cre19.g750547.t4.1	0.0698	Cre02.g080200.t1.2	0.0439
Cre09.g393150.t1.2	0.0697	Cre11.g467770.t1.1	0.0439
Cre01.g026600.t1.2	0.0697	Cre01.g010900.t1.2	0.0440
Cre13.g567700.t1.2	0.0696	Cre09.g412100.t1.2	0.0441
Cre09.g400050.t1.1	0.0696	Cre10.g436550.t1.2	0.0442
Cre06.g262700.t1.1	0.0696	Cre07.g328200.t1.2	0.0443
Cre15.g635850.t2.1	0.0695	Cre08.g368500.t1.2	0.0443
Cre12.g514750.t1.2	0.0695	Cre01.g061077.t1.1	0.0443
Cre01.g019250.t1.2	0.0694	Cre02.g119550.t1.2	0.0443
Cre07.g342250.t1.2	0.0694	Cre12.g537100.t1.2	0.0444
Cre03.g198850.t1.2	0.0694	Cre13.g591951.t1.1	0.0444
Cre10.g462950.t1.2	0.0694	Cre07.g313250.t1.2	0.0444
Cre16.g694850.t1.2	0.0693	Cre08.g382800.t1.2	0.0454
Cre11.g468750.t1.2	0.0693	Cre01.g027550.t1.1	0.0458
Cre17.g719000.t1.2	0.0693	Cre06.g252000.t1.2	0.0458
Cre09.g410600.t1.1	0.0692	Cre06.g308850.t1.2	0.0458
Cre17.g741850.t1.2	0.0692	Cre04.g223300.t1.2	0.0458
Cre05.g233305.t2.1	0.0692	Cre12.g516200.t1.2	0.0458
Cre09.g401886.t1.1	0.0692	Cre03.g204250.t1.2	0.0459
Cre01.g015000.t1.2	0.0692	Cre06.g260250.t1.2	0.0459
Cre03.g194850.t1.2	0.0691	Cre11.g481000.t1.2	0.0459
Cre03.g145967.t1.1	0.0691	Cre03.g201900.t1.1	0.0459
Cre03.g202113.t1.1	0.0691	Cre17.g702650.t1.1	0.0459
Cre03.g193850.t1.2	0.0690	Cre11.g476750.t1.2	0.0460
Cre09.g386735.t1.1	0.0690	Cre12.g550850.t1.2	0.0460
Cre06.g296600.t1.2	0.0690	Cre03.g182551.t1.2	0.0460
Cre02.g093450.t1.2	0.0688	Cre17.g698000.t1.2	0.0462
Cre15.g636800.t1.1	0.0687	Cre12.g513150.t1.2	0.0463
Cre11.g467573.t1.1	0.0687	Cre12.g485150.t1.2	0.0463
Cre10.g452350.t1.1	0.0686	Cre11.g477850.t1.1	0.0463
Cre12.g522550.t1.2	0.0686	Cre01.g010400.t1.2	0.0463
Cre03.g179860.t1.1	0.0685	Cre12.g508900.t1.2	0.0463
Cre15.g636750.t1.2	0.0684	Cre15.g635067.t1.1	0.0463

Cre01.g054500.t1.2	0.0668	Cre11.g467700.t1.1	0.0503
Cre13.g573250.t1.2	0.0667	Cre11.g467644.t1.1	0.0504
Cre06.g308500.t1.2	0.0667	Cre06.g306601.t1.1	0.0504
Cre12.g548950.t1.2	0.0666	Cre12.g513200.t1.2	0.0504
Cre02.g095146.t1.1	0.0684	Cre10.g419950.t1.1	0.0463
Cre12.g557600.t1.1	0.0684	Cre05.g245158.t1.1	0.0463
Cre17.g724200.t1.2	0.0684	Cre09.g400627.t1.1	0.0474
Cre02.g078507.t1.2	0.0684	Cre02.g143307.t1.1	0.0474
Cre13.g605150.t1.2	0.0683	Cre06.g260350.t1.2	0.0474
Cre07.g321750.t1.2	0.0682	Cre08.g380300.t1.1	0.0474
Cre01.g044800.t1.2	0.0682	Cre09.g397697.t1.1	0.0479
Cre02.g101400.t1.2	0.0682	Cre03.g178250.t1.2	0.0479
Cre16.g653350.t1.2	0.0681	Cre04.g214150.t1.1	0.0480
Cre10.g458450.t1.1	0.0680	Cre12.g490500.t1.2	0.0480
Cre02.g093650.t1.2	0.0680	Cre01.g012150.t1.2	0.0480
Cre15.g638400.t1.2	0.0679	Cre02.g116750.t2.1	0.0481
Cre12.g546050.t1.2	0.0679	Cre09.g394200.t1.1	0.0481
Cre09.g408200.t1.2	0.0678	Cre01.g000900.t1.2	0.0481
Cre17.g705000.t1.2	0.0678	Cre07.g314100.t1.2	0.0481
Cre03.g158000.t1.2	0.0677	Cre16.g673650.t1.1	0.0482
Cre03.g175400.t2.1	0.0676	Cre06.g252200.t1.2	0.0483
Cre11.g467707.t1.1	0.0676	Cre12.g514850.t1.2	0.0483
Cre06.g285401.t1.1	0.0676	Cre12.g538100.t1.2	0.0485
Cre02.g141400.t1.2	0.0675	Cre09.g402450.t1.2	0.0485
Cre12.g522600.t1.2	0.0674	Cre07.g332800.t1.2	0.0486
Cre12.g524400.t1.2	0.0674	Cre12.g488850.t2.1	0.0486
Cre17.g721700.t1.2	0.0673	Cre16.g668150.t1.2	0.0486
Cre17.g734500.t1.2	0.0673	Cre12.g517900.t1.1	0.0486
Cre01.g014350.t1.2	0.0672	Cre15.g641000.t2.1	0.0497
Cre09.g415550.t1.2	0.0672	Cre06.g271200.t1.2	0.0497
Cre16.g691000.t1.2	0.0672	Cre12.g500500.t2.1	0.0498
Cre10.g433950.t1.1	0.0670	Cre09.g411200.t1.2	0.0499
Cre17.g727300.t1.2	0.0670	Cre06.g269450.t1.2	0.0500
Cre01.g049000.t1.2	0.0670	Cre06.g278148.t1.1	0.0500
Cre12.g543350.t3.1	0.0670	Cre06.g307500.t1.1	0.0500
Cre03.g203450.t1.2	0.0669	Cre02.g108450.t1.2	0.0501
Cre10.g441400.t1.2	0.0669	Cre17.g720250.t1.2	0.0503

III) Top 100 proteínas com menor e maior valor de centralidade de rede betweenness nas condições de privação de N e controle.

Top 100 proteínas <u>maior</u> betweenness - Privação de N		Top 100 proteínas <u>maior</u> betweenness - Controle	
Identificador Proteína	Betweenness	Identificador Proteína	Betweenness
Cre10.g459200.t1.2	0.2189	Cre03.g195650.t1.2	0.4317
Cre17.g746997.t1.1	0.1575	Cre06.g278162.t1.1	0.4257
Cre06.g275900.t1.2	0.1551	Cre12.g537200.t1.2	0.3875
Cre08.g378850.t1.2	0.1404	Cre17.g743897.t1.1	0.3533
Cre17.g714650.t1.2	0.1094	Cre10.g439400.t1.1	0.3279
Cre15.g638400.t1.2	0.1082	Cre16.g684750.t1.2	0.3258
Cre10.g456050.t2.1	0.1009	Cre10.g456200.t1.2	0.2800
Cre06.g258800.t1.1	0.0998	Cre03.g184700.t1.2	0.2223
Cre07.g342250.t1.2	0.0965	Cre10.g449550.t1.2	0.2126
Cre14.g612633.t1.1	0.0856	Cre17.g729150.t1.2	0.2126
Cre02.g093450.t1.2	0.0843	Cre02.g088600.t1.2	0.2094
Cre15.g636750.t1.2	0.0826	Cre11.g467668.t1.1	0.2049
Cre12.g546050.t1.2	0.0789	Cre07.g357850.t1.2	0.2026
Cre17.g715350.t2.1	0.0776	Cre07.g343700.t1.2	0.2016
Cre12.g526800.t1.2	0.0762	Cre02.g111450.t1.2	0.1927
Cre06.g306300.t1.2	0.0746	Cre13.g565850.t1.1	0.1658
Cre10.g447950.t1.2	0.0739	Cre06.g283050.t1.2	0.1575
Cre08.g365400.t1.2	0.0719	Cre02.g114450.t1.2	0.1549
Cre03.g158000.t1.2	0.0710	Cre12.g498900.t1.2	0.1548
Cre12.g537450.t1.2	0.0691	Cre17.g714600.t1.2	0.1537
Cre09.g402100.t1.2	0.0656	Cre02.g115200.t1.2	0.1433
Cre09.g393150.t1.2	0.0638	Cre05.g248450.t1.2	0.1376
Cre08.g380201.t1.1	0.0615	Cre07.g325400.t1.2	0.1362
Cre03.g172850.t1.2	0.0570	Cre12.g511900.t1.2	0.1332
Cre12.g489700.t1.2	0.0542	Cre17.g721700.t1.2	0.1316
Cre02.g079600.t1.2	0.0541	Cre12.g495951.t2.1	0.1279
Cre03.g195650.t1.2	0.0539	Cre09.g387800.t1.2	0.1185
Cre08.g380250.t1.2	0.0507	Cre16.g675550.t3.1	0.1126
Cre09.g396300.t1.2	0.0501	Cre06.g278255.t1.1	0.1108
Cre02.g143250.t1.2	0.0459	Cre03.g168450.t1.2	0.1099
Cre10.g452800.t1.2	0.0420	Cre12.g555150.t1.2	0.1099
Cre11.g467617.t1.1	0.0414	Cre04.g214501.t1.1	0.1099
Cre07.g340450.t1.1	0.0408	Cre01.g035350.t1.2	0.1025
Cre12.g548950.t1.2	0.0403	Cre05.g241850.t1.2	0.1006
Cre02.g080700.t1.2	0.0403	Cre13.g567950.t1.2	0.0993
Cre01.g044800.t1.2	0.0402	Cre01.g002300.t1.2	0.0969
Cre14.g608800.t1.2	0.0402	Cre03.g203450.t1.2	0.0902
Cre16.g663900.t1.2	0.0401	Cre06.g273750.t1.1	0.0836
Cre03.g203450.t1.2	0.0398	Cre03.g166050.t1.2	0.0832
Cre09.g415550.t1.2	0.0396	Cre14.g625400.t1.1	0.0801
Cre07.g357850.t1.2	0.0387	Cre02.g097900.t1.2	0.0770
Cre09.g394436.t1.1	0.0386	Cre07.g340200.t1.1	0.0725
Cre11.g477950.t1.1	0.0380	Cre06.g271200.t1.2	0.0714
Cre17.g703700.t1.1	0.0376	Cre17.g720050.t1.2	0.0704
Cre10.g461050.t1.2	0.0366	Cre09.g394200.t1.1	0.0695
Cre07.g339700.t1.2	0.0360	Cre01.g044800.t1.2	0.0673
Cre12.g494000.t1.2	0.0359	Cre12.g486300.t1.2	0.0665
Cre13.g582800.t1.2	0.0356	Cre02.g101350.t1.2	0.0661
Cre12.g528750.t1.2	0.0350	Cre17.g724300.t1.2	0.0637
Cre02.g096150.t1.2	0.0346	Cre12.g525200.t1.2	0.0617
Cre01.g004950.t1.1	0.0346	Cre06.g264300.t1.2	0.0617
Cre08.g384000.t1.1	0.0341	Cre14.g619166.t1.1	0.0613
Cre07.g357350.t1.2	0.0339	Cre10.g434750.t1.2	0.0603
Cre12.g544050.t1.1	0.0335	Cre04.g220200.t3.1	0.0576
Cre09.g416800.t1.2	0.0333	Cre01.g006950.t2.1	0.0563
Cre02.g091050.t1.2	0.0331	Cre17.g721500.t1.2	0.0544
Cre17.g721500.t1.2	0.0330	Cre12.g556050.t1.2	0.0536
Cre12.g529500.t1.2	0.0324	Cre01.g003550.t1.1	0.0519
Cre07.g325746.t1.1	0.0320	Cre04.g216850.t1.2	0.0498
Cre17.g729150.t1.2	0.0320	Cre16.g652550.t1.2	0.0482
Cre03.g200250.t1.2	0.0319	Cre06.g296600.t1.2	0.0478
Cre17.g715250.t1.2	0.0319	Cre06.g307500.t1.1	0.0468
Cre13.g567700.t1.2	0.0316	Cre01.g004900.t1.2	0.0458

Cre02.g087450.t1.2	0.0313	Cre02.g088850.t1.2	0.0455
Cre07.g327400.t1.1	0.0306	Cre09.g412100.t1.2	0.0446
Cre17.g723650.t1.2	0.0302	Cre03.g156900.t1.2	0.0443
Cre02.g146250.t1.2	0.0298	Cre17.g721650.t1.2	0.0435
Cre07.g321750.t1.2	0.0297	Cre17.g708600.t1.2	0.0433
Cre09.g387875.t1.1	0.0296	Cre01.g039300.t1.2	0.0432
Cre07.g315750.t1.2	0.0295	Cre05.g242400.t1.2	0.0429
Cre13.g567450.t1.2	0.0294	Cre09.g391900.t1.1	0.0426
Cre03.g145967.t1.1	0.0285	Cre11.g481000.t1.2	0.0426
Cre03.g202113.t1.1	0.0285	Cre02.g143250.t1.2	0.0422
Cre13.g605150.t1.2	0.0282	Cre09.g416750.t1.2	0.0421
Cre03.g181500.t1.2	0.0269	Cre14.g616600.t1.2	0.0420
Cre16.g655150.t1.2	0.0268	Cre07.g339050.t1.2	0.0418
Cre09.g388726.t1.1	0.0263	Cre13.g581600.t1.2	0.0417
Cre12.g538500.t1.1	0.0257	Cre01.g049500.t1.2	0.0412
Cre09.g386758.t1.1	0.0254	Cre06.g252000.t1.2	0.0411
Cre05.g234638.t1.1	0.0254	Cre10.g458450.t1.1	0.0409
Cre16.g680000.t1.2	0.0251	Cre03.g188250.t1.2	0.0408
Cre10.g452350.t1.1	0.0245	Cre13.g603700.t1.2	0.0408
Cre10.g444700.t1.1	0.0245	Cre17.g741200.t1.2	0.0402
Cre03.g158800.t3.1	0.0237	Cre10.g439100.t1.2	0.0399
Cre10.g458550.t1.2	0.0232	Cre07.g331500.t1.1	0.0385
Cre01.g004450.t1.2	0.0231	Cre12.g517150.t1.1	0.0365
Cre14.g627850.t1.2	0.0229	Cre13.g573351.t1.2	0.0365
Cre01.g005050.t1.1	0.0229	Cre05.g246800.t1.2	0.0346
Cre10.g430000.t1.1	0.0225	Cre12.g512000.t1.1	0.0342
Cre19.g750547.t4.1	0.0225	Cre07.g357350.t1.2	0.0342
Cre09.g391171.t1.1	0.0224	Cre06.g262900.t1.2	0.0336
Cre17.g727300.t1.2	0.0224	Cre09.g402219.t2.1	0.0335
Cre11.g467781.t1.1	0.0218	Cre06.g278185.t1.1	0.0333
Cre01.g034000.t1.2	0.0218	Cre03.g199535.t1.1	0.0327
Cre08.g360950.t1.1	0.0218	Cre09.g415550.t1.2	0.0327
Cre16.g677026.t1.1	0.0217	Cre09.g416150.t1.2	0.0325
Cre12.g522600.t1.2	0.0215	Cre02.g076350.t1.2	0.0320
Cre07.g331500.t1.1	0.0211	Cre12.g483700.t2.1	0.0319
Cre11.g467573.t1.1	0.0210	Cre02.g097400.t1.2	0.0319
Cre11.g467547.t1.1	0.0209	Cre17.g715500.t1.2	0.0315

ANEXO E. Número de proteínas classificadas em cada termo do Gene Ontology (GO) de processo biológico enriquecidos. Análise realizada com as top 100 proteínas com maior centralidade.

I) Análise de enriquecimento realizada com as top 100 proteínas com maior centralidade *degree* na condição de privação de N.

II) Análise de enriquecimento realizada com as top 100 proteínas com maior centralidade *degree* na condição controle.

III) Análise de enriquecimento realizada com as top 100 proteínas com maior centralidade *closeness* na condição de privação de N.

IV) Análise de enriquecimento realizada com as top 100 proteínas com maior centralidade *closeness* na condição controle.

V) Análise de enriquecimento realizada com as top 100 proteínas com maior centralidade *betweenness* na condição de privação de N.

VI) Análise de enriquecimento realizada com as top 100 proteínas com maior centralidade *betweenness* na condição controle.

Lista de publicações e apresentações no período do doutorado

Publicações

Vargas, S. R.; Santos, P.V.; **Giraldi, L. A.**; Zaiat, M.; Calijuri, M.C. Anaerobic phototrophic processes of hydrogen production by different strains of microalgae *Chlamydomonas* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 365. 2018.

Mubeen, U.; **Giraldi, L. A.**; Jüppner, J.; Giavalisco, P. Multi-Omics Extraction Method for the In-Depth Analysis of Synchronized Cultures of the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Vis. Exp.* (150). 2019.

Giraldi, L.A.; Vargas, S. R.; Santos, P.V.; Tonietto, A. E.; Winck, F. V.; Calijuri, M.C. Growth and saxitoxin production responses to copper (CuCl₂) exposure by the cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii*. *Journal of Applied Phycology*, 33, 891–900. 2021.

Vidotti, A.D.S.; Riaño-Pachón, D.M.; Mattiello, L.; **Giraldi, L.A.**; Winck, F.V.; Franco, T.T. Analysis of autotrophic, mixotrophic and heterotrophic phenotypes in the microalgae *Chlorella vulgaris* using time-resolved proteomics and transcriptomics approaches. *Algal Res.*, 51. 2020.

Apresentação oral

Giraldi, L.A.; Dorado, R.; Riaño-Pachón, D.M.; Mubeen, U.; Caldana, C.; Winck, F.V. Proteomics and Metabolomics analysis can reveal the controlling of metabolic shift to Triacylglycerol (TAGs) synthesis in microalgae. Redealgas, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. 2020.

Posters

Giraldi, L. A.; Franco, T.T.; Riaño-Pachón, D. M.; Colepicolo, P.; Winck, F.V. Proteomic analysis of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation in photoautotrophic conditions. Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference, Campos do Jordão – SP. 2017.

Giraldi, L. A.; Dorado, R.; Riaño-Pachón, D. M.; Mubeen, U.; Caldana, C.; Winck, F.V. Proteomics and metabolomics analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* response under nitrogen starvation. Harvel-Spree-Colloquium, Berlin, Germany, 2019.

Giraldi, L.A.; Dorado G., R.R.; Riaño-Pachón, D.M.; Freitas, G.H.F.; Taghavi, D.; Caldana, C.; Mubeen, U.; Cabral, C.M.C.; Winck, F.V. Novel targets that can control the metabolic shift to triacylglycerol (TAGs) synthesis in microalgae under nitrogen starvation. Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference. 2020.