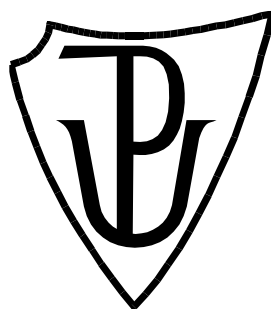


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



**Softvérová aplikácia pre MALDI MS intaktných
buniek**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Simona Martikánová
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný obor:	Bioinformatika
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok:	2021

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstva. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámena s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa *podpis bakalára*

Pod'akovanie

Chcela by som sa pod'akovať vedúcemu mojej práce pánovi prof. Mgr. Marek Šebela, Dr. za odborné vedenie, čas a hlavne trpezlivosť, ktoré mi venoval. Moja vďaka patrí aj mojej rodine za oporu a pevné nervy.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Simona Martikánová
Názov práce	Softvérová aplikácia pre MALDI MS intaktných buniek
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF intaktných buniek mikroorganizmov sa dajú získať fingerprintové spektrá proteínov obsahujúce charakteristické diagnostické signály. So znalosťou úplnej proteómovej sekvencie je možné priradiť na základe molekulovej hmotnosti jednotlivé signály konkrétnym proteínom. Náplňou práce je pripraviť algoritmus umožňujúci spracovanie proteómových sekvencií vo FASTA formáte do hodnôt molekulových hmotností proteínov a porovnať ich s experimentálnou sadou diagnostických signálov odčítaných zo spektier. Zvolením tolerancie pre zhodu hodnôt teoretických a experimentálnych hmotností, budú tieto signály priradené konkrétnym proteínom. Ďalej bude navrhnutý algoritmus, ktorý umožňuje porovnávať signály dvoch spektier medzi sebou a vybrať tie, ktoré sú podobné a rozdielne.

Kľúčové slová	MALDI-TOF, spektrum, kontrola, hmotnostná spektrometria, proteín, proteóm, algoritmus, teoretická hmotnosť, sinica, Python
Počet strán	68
Počet príloh	3
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Simona Martikánová
Title	Software application for MALDI MS of intact cells
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2021

Abstract

With MALDI-TOF mass spectrometry of intact cells of microorganisms, fingerprints spectra of proteins containing characteristic diagnostic signals can be acquired. With knowledge of complete proteomic sequence, individual signals are assigned to particular proteins based on molecular mass. The scope of work is to prepare algorithm enabling processing of proteomic sequences in FASTA format into molecular weight and compare them with an experimental set of diagnostic signals obtained from the spectra. These signals will be assigned to particular protein by selecting a tolerance for matching of theoretical and experimental mass values. Next designed algorithm will compare signals of two different spectra with each other and select similar and different signals.

Keywords	MALDI-TOF, spectrum, control, mass spectrometry, protein, proteome, algorithm, theoretical mass, cyanobacteria, Python
Number of pages	68
Number of appendices	3
Language	Slovak

OBSAH

1 ÚVOD	9
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	11
2.1 Hmotnostná spektromentia (MS)	11
2.1.1 Hmotnostný spektrometer	11
2.1.2 Hmotnostné spektrum	12
2.1.3 Ionizačné techniky	13
2.2 MALDI MS	14
2.2.1 Matrica	15
2.2.2 Príprava analytu	16
2.2.3 MALDI prístroje	16
2.2.4 Ionizácia	17
2.2.5 TOF analyzátor	17
2.3 Hmotnostná spektrometria v mikrobiológii	19
2.3.1 „Fingerprints“ celých intaktných buniek	20
2.3.2 Identifikácia organizmov	21
2.3.3 Faktory ovplyvňujúce vzorku	22
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	23
3.1 Nástroje	23
3.1.1 Python	23
3.1.2 Excel	24
3.1.3 mMass	24
3.2 Databáze	25
3.2.1 Databáza Uniprot	25
3.2.2 FASTA formát	27
4 VÝSLEDKY	28
4.1 Softvérová aplikácia pre výpočet hmotností proteínov	28
4.1.1 Výpočet hmotnosti proteínu	29
4.2 Program pre priradzovanie proteínov	31
4.2.1 Priradenie proteínov	33
4.2.2 Funkcia pre priradenie názvu	34
4.3 Porovnanie signálov	36
4.3.1 Podobné signály	36
4.3.2 Rozdielne signály	38
4.4 Využitie kódov v praxi	39
4.4.1 Kultivácia <i>Synechococcus</i> za prítomnosti inhibítorov	40

4.4.1.1 Deoxyglukóza	41
4.4.1.2 Porovnanie spektier a rozdielnych signálov pre DG	43
4.4.1.3 Kyselina fluóroctová (FAA)	46
4.4.1.4 Malonát (MA)	50
4.4.2 Kultivácia buniek v bezťažovom stave	53
4.5 GUI aplikácia	56
4.5.1 Tlačidlá pre otvorenie súborov	56
4.5.2 Výpočet proteómu a priradenie proteínov	57
4.5.3 Tlačidlo pre uloženie výsledkov	58
4.5.4 GUI pre porovnanie signálov	59
4.5.4 .EXE file	59
5 DISKUSIA	61
6 ZÁVER	63
7 LITERATÚRA	64
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	66
9 PRÍLOHY	67

Ciele práce

Teoretická časť

- vypracovať primeranú rešerš odbornej literatúry zameranú na hmotnostnú spektrometriu, MALDI-TOF MS a identifikáciu mikroorganizmov

Praktická časť

- vytvoriť program, ktorý vypočíta hmotnosti proteínov v proteóme
- vytvoriť program pre priradzovanie proteínov signálom vybraných z hmotnostného spektra
- vytvoriť program, ktorý bude porovnávať signály dvoch spektier

1 ÚVOD

Hmotnostná spektrometria je analytická metóda, sledujúca relatívnu početnosť iónov dopadajúcich na detektor v závislosti na pomere hmotnosti k náboju iónu. Základným princípom je ionizácia atómov alebo molekúl vzorku, jeho následná separácia podľa pomeru ich hmotnosti k náboju a záznam signálov (m/z). Táto metóda je využívaná hlavne v prípadoch, kedy potrebujeme identifikovať neznáme látky, objasniť ich štruktúru, atď. Hlavnou výhodou je získanie informácií z pomerne malého vzorku.

Podľa dodanej energie pri ionizácii poznáme dva iónové zdroje – tvrdé a mäkké. Medzi „mäkké“ zdroje radíme metódu MALDI-TOF, čo je skratka pre hmotnostnú spektrometriu s laserovou desorpciou a ionizáciou za účasti matrice s prietokovým analyzátorom (z anglického Matrix -Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry). Princíp spočíva v meraní času, ktorý ión potrebuje k prejdutiu vzdialenosti medzi detektorom a iónovým zdrojom. To je takzvaná „doba letu“. TOF analyzátor sa vyznačuje hlavne vysokou citlivosťou, krátkou dobou analýzy a vysokou maximálnou hodnotou m/z .

Vďaka tejto metóde získavame fingerprintové spektrá proteínov a peptidov. Tie obsahujú charakteristické diagnostické signály, ktoré umožňujú s pomocou databázy rozlíšiť rod, druh, či kmeň. Týmto signálom sa dajú priradiť konkrétne proteíny, pokiaľ poznáme ich úplnú genómovú/proteínovú sekvenciu.

Python je multi-paradigmaticý programovací jazyk s vlastnosťami, vďaka ktorým je odporúčaný pre biológov a vedcov. Má niekoľko dobre navrhnutých knižníc pre vykonávanie zložitých vedeckých výpočtov a vlastností, ktoré uľahčujú manipuláciu s reťazcami znakov (DNA, RNA,...). Ľahko sa integruje s už existujúcimi nástrojmi a je široko používaný vo vedeckej komunite. Hlavným cieľom tejto práce je pomocou Pythonu pripraviť program, ktorý umožní automatické spracovanie proteómových sekvencií vo formáte FASTA, do hodnôt molekulových hmotností proteínov. Tie budú následne porovnávané s experimentálnou sadou molekulových hmotností diagnostických signálov odčítaných zo spektier. Tieto signály budú priradené konkrétnym proteínom s použitím zvolenej tolerancie na zhodu hodnôt teoretických a experimentálnych molekulových hmotností. Signály zo vzoriek môžeme použiť na identifikáciu a typizáciu mikroorganizmov porovnávaním signálov s referenčnými spektrami. Ďalším z cieľov

tejto práce je preto vytvoriť program, ktorý by porovnával signály zo vzorky s referenčným spektrom a v stanovených hraniciach vybral podobné a rozdielne signály.

2 Súčasný stav riešenej problematiky

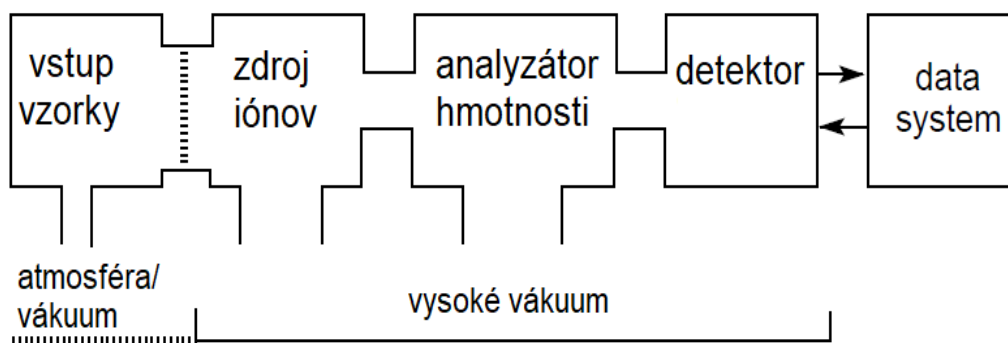
2.1 Hmotnostná spektromentia (MS)

Hmotnostná spektrometria (skrátene MS z anglického „Mass Spectrometry“) je v súčasnosti nepostrádateľným analytickým nástrojom. Používa sa v chémii, biochémií, biológii, medicíne a mnohých ďalších podobných vedných odboroch (Gross, 2017). Hlavným cieľom MS je identifikovať zlúčeninu z atómovej alebo molekulovej hmotnosti jej zložiek. Podstatou hmotnostnej spektrometrie je rozdelenie nabitých častíc podľa molekulových hmotností v magnetickom alebo elektrickom poli, čiže meria pomer hmoty m k náboju z iónov (vyjadrený ako m/z) (Watson a Sparkman, 2007).

V postupe, ktorý je pre MS typický, sa vzorka v pevnom, kvapalnom alebo plynnom stave ionizuje, čo spôsobuje, že buď sa molekuly vzorky rozpadnú na nabité fragmenty, alebo sa nabijú bez fragmentácie. Následne sa napríklad ich urýchlením a vystavením elektrickému poľu, ióny rozdelia podľa pomeru hmotnosti k náboju. Výsledky sa zvyčajne predkladajú vo forme hmotnostného spektra (Watson a Sparkman, 2007).

2.1.1 Hmotnostný spektrometer

Skoro každá technika, ktorej cieľom je ionizácia, separácia a detekcia iónov v plynnej fáze, môže byť použitá v MS. Preto sa typický hmotnostný spektrometer skladá z troch hlavných komponentov: zdroj iónov, analyzátor hmotnosti a detektor (Obr. 1). V zdroji iónov sa molekuly prevedú do plynnej fázy a nabijú sa. Neskôr sú v hmotnostnom analyzátoe separované podľa ich m/z pomerov. Nakoniec je relatívne zastúpenie každého iónu zaznamenané detektorom na vytvorenie hmotnostného spektra. (Haroun a Saheer, 2010) Spektrometre fungujú pri podmienkach vysokého vákua, ktoré zabezpečuje, aby sa ionizované častice pri prenose smerom k detektoru nezrážali s inými molekulami. To by mohlo totiž viesť k ich roztriešteniu a odkloneniu z požadovanej cesty. Vákuum tiež chráni niektoré povrchové materiály, ktoré sú použité na výrobu jednotlivých častí spektrometra a hrozí im korózia. Tá by mohla narušiť funkčnosť spektrometra (Smith, 2004).



Obr. 1 Všeobecná schéma hmotnostného spektrometra (Gross, 2004)

Úlohou zdroju iónov je ionizovať materiál, ktorý podlieha analýze. Produkujú sa ióny hlavne ionizáciou neutrálnej molekuly v plynnej fáze pomocou elektrónovej eekcie, deprotonácie, protonácie alebo aj prenosom nabitkej látky z kondenzovanej do plynnej fázy. Techniky ionizácie majú kľúčovú úlohu pri určení typu vzorky, ktorú je možné analyzovať MS. Existuje celý rad ionizačných techník. Najdôležitejšími faktormi pri výbere sú vnútorná energia prenášaná počas procesu ionizácie a fyzikálno-chemické vlastnosti analyzovanej látky (de Hoffman a Stroobant, 2007).

Akonáhle sú ióny zionizované, triedia sa a separujú podľa pomeru hmotnosti k náboju – m/z v hmotnostnom analyzátoe. Oddelenie iónov môže byť založené na rôznych princípoch, všetky však používajú statický alebo dynamický elektrický prúd a magnetické pole, ktoré sa môžu kombinovať. Základné rozdiely bežných typov analyzátorov spočíva práve v spôsobe použitia polí. Medzi hlavné charakteristiky pre meranie výkonu analyzátoa patrí: limit rozsahu, rýchlosť analýzy, prenos, presnosť hmotnosti, rozlíšenie (de Hoffman a Stroobant, 2007).

Poslednou časťou hmotnostného spektrometra je detektor iónov. Ten je schopný zaznamenať dopady alebo prechody iónov. Dôležitými parametrami, ktorými sa rozlišujú rôzne detektory, sú citlivosť, presnosť a čas odozvy (Watson a Sparkman, 2007).

2.1.2 Hmotnostné spektrum

Grafickú reprezentáciu hmotnostnej spektrometrie predstavuje hmotnostné spektrum. Tento dvojrozmerný obraz znázorňuje intenzitu signálu (pík) na zvislej osi, pomer m/z na vodorovnej osi. Spektrá sa používajú na určenie elementárneho, či izotopového popisu vzorky, objasnenie hmotnosti častíc a molekúl alebo štruktúry molekúl a iných chemických zlúčenín (Smith, 2004).

Pri zaznamenávaní hmotnostného spektra sa zapisujú vrcholy, tzv. píky, ktoré predstavujú ióny tvoriace sa v spektrometri (Watson a Sparkman, 2007). Je však dôležité vedieť rozlíšiť tieto pojmy. Ióny sú častice s hmotnosťou, nábojom a relatívnym zastúpením. Na druhej strane píky zodpovedajú maximálnym lokalizovaným signálom produkovaným z detektora, sú spájané len s intenzitou a m/z (Smith, 2004). Intenzita píku priamo odráža početnosť iónových druhov s príslušným m/z . Vrchol s najväčšou intenzitou sa nazýva základný pík. Pomer m/z je bezrozmerný, pretože je odvodený od bezrozmerného hmotnostného čísla, m daného iónu a čísla elementárneho náboja z (Gross, 2004). Elementárny náboj je často, nie nevyhnutne, rovný 1. U ESI-MS metódy pre peptidy môže byť z rovné 2, 3 alebo 4. Pokiaľ sú však pozorované len jednotlivé nabité ióny, tak m/z priamo odráža stupnicu m .

2.1.3 Ionizačné techniky

V hmotnostnej spektrometrii sa ionizácia týka výroby iónov v plynnom skupenstve, ktoré sú vhodnejšie na separáciu v hmotnostnom analyzátore. K ionizácii dochádza v zdroji iónov. Techniky ionizácie poznáme prevažne mäkké a tvrdé.

Medzi tvrdé ionizačné techniky sa radí elektrónová ionizácia, jedna z úplne prvých techník v hmotnostnej spektrometrii. Spôsobuje rozsiahlu fragmentáciu molekuly a vznik radikálových iónov. Je uskutočniteľná len u vzoriek v plynnej fázi, čím je vhodná len pre tepelne stabilné a prchavé látky. Biologický materiál však predstavuje prevažne neprchavé látky, ktoré často podliehajú tepelnému rozkladu (Papoušková a Džubák, 2014).

Mäkkou ionizáciu nazývame procesy, ktoré dávajú vzorke malé množstvo zvyškovej energie, a tak nedochádza k príliš veľkej fragmentácii. V takto získaných spektrách pozorujeme najmä (de)protónované molekuly, vďaka čomu sa dá zistiť molekulová hmotnosť (Friedecký a Lemr, 2012).

Vývoj dvoch mäkkých ionizačných metód MALDI a ESI umožnil rutinnú analýzu tepelne nestálych a neprchavých biomolekúl, ako sú peptidy a proteíny. Použitie hmotnostnej spektrometrie na identifikáciu biomarkerov sa dá vysledovať niekoľko desaťročí spätne v histórii. Avšak až tieto techniky oživilo a prinieslo úspech proteomiky založenej na MS. Elektrosprejová ionizácia (ESI) je metóda, ktorou môžu byť rozpustené látky prítomné v roztoku prevedené do plynnej fázy ako ióny. Tieto ióny môžu byť následne detegované s prostriedkami hmotnostnej spektrometrie (ESI MS). ESI si poradí

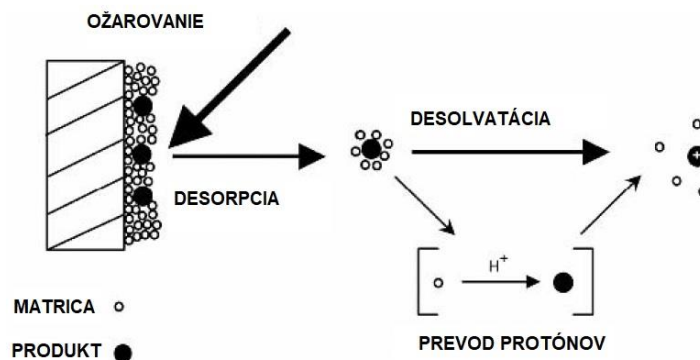
s látkami ako sú polyméry, nukleové kyseliny a proteíny s veľkou molekulovou hmotnosťou (Cole, 2010).

2.2 MALDI MS

Matricou asistovaná laserová desorpcia a ionizácia (MALDI) sa používa na analýzu biomolekúl akými sú bielkoviny, peptidy, sacharidy, DNA a veľkých organických molekúl, ktoré pri použití iného spôsobu ionizácie fragmentujú.

Táto metóda sa začala formovať v osemdesiatych rokoch dvadsiateho storočia hlavne Michaelom Karasom, Franzom Hillenkampom a Koichi Tanakom. V Tanakovej štúdii boli generované spektrá s hodnotou m/z až do 100 000 pre proteíny a polyméry s molekulárnou hmotnosťou 25 000 Da. Vzorky analyzoval so spektrometrom „čas letu“, nitrogénnym laserom a ako matrica bol použitý glycerol s kobaltovým práškom. V tom istom roku Hillenkamp analyzoval proteíny s hmotnosťou do 67 000 Da použitím hovädzieho sérového albumínu. V tejto štúdii sa použil rovnaký spektrometer, Nd-YAG laser a kyselina nikotínová. Od týchto prvotných štúdií sa MALDI-MS stala častým a rozšíreným zdrojom ionizácie (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2014). Populárna je najmä v proteomike pre svoju jednoduchosť, citlivosť a zároveň robustnosť. V poslednej dobe sa stala rutinou v laboratóriách na charakterizáciu a klasifikáciu mikróbov. Umožňuje totiž rýchlu identifikáciu baktérií, prvokov, húb a iných organizmov, a je tak možné, že úplne nahradí dosiaľ používané techniky. Bežný prístup spočíva v použití proteínového extraktu, peptidu alebo celých intaktných buniek (Cole, 2010).

MALDI sa dosahuje v dvoch krokoch (Obr. 2). V prvom kroku sa analyzovaná zlúčenina rozpustí v rozpúšťadle s ďalšími malými organickými molekulami, nazývanými matrica (de Hoffman a Stroobant, 2007). Takto vzniknutá zmes sa vysuší a použité kvapalné rozpúšťadlo sa odstráni. Zostane tuhý roztok usadeniny kryštálov matrice dopovanej analytom. Molekuly analytu sú pritom zapustené do matrice tak, aby boli navzájom úplne izolované. Druhý krok prebieha vo vákuu v hmotnostnom spektrometre. Odstraňuje sa veľká časť tuhého roztoku pomocou intenzívnych laserových pulzov v krátkom čase. Presný mechanizmus MALDI nie je úplne objasnený, hoci vieme, že ionizačné procesy môžu prebiehať vo vákuu kedykoľvek počas procesu, pôvod produkovaných iónov nie je kompletne známy (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2014).

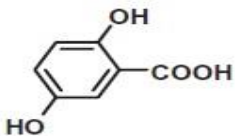
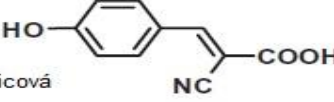
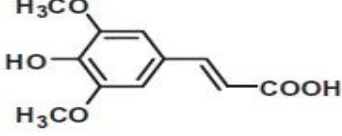



Obr. 2 Diagram princípu MALDI (de Hoffman a Stroobant, 2007)

2.2.1 Matrica

Vzorku, ktorú chceme pomocou MALDI skúmať, je potrebné zmiešať s organickou alebo anorganickou zlúčeninou – matricou vo vhodne zvolenom rozpúšťadle. Molárny pomer analytu k matrici by mal byť približne 1:5000. Hlavnou úlohou matrice je absorpcia žiarenia, pričom dochádza k ionizácii a desorpcii matrice s analytom. Ochráňuje ho pred žiarením a minimalizuje poškodenie. Taktiež oddeľuje molekuly analytu, aby sa zabránilo molekulárnym analyt-analyt interakciám počas ionizácie (Hosseini a Martinez-Chapa, 2017).

Výber matrice je jedným z najdôležitejších krokov v MALDI analýze. Ideálna matrica spĺňa vlastnosti akými sú dobrá stabilita vo vákuu, priaznivá miešateľnosť s analytom a silná absorpcia elektrónov pri použitej vlnovej dĺžke. Voľba matrice závisí najmä na vlnovej dĺžke lasera, ktorý chceme použiť. Medzi najbežnejšie používané matrice patrí: kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová alebo kyselina 3,5-dimetoxy-4-hydroxyškoricová (sinapová) (Obr. 3). Roztok danej matrice sa zvyčajne pripravuje z vybranej matrice a rozpúšťadla (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2014).

Matrica	Štruktúra	Vlnová dĺžka	Hlavná aplikácia
kyselina 2,5-dihydroxybenzoová		UV 337 nm, 355 nm	Proteíny, peptidy, karbohydráty, syntetické polyméry
kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová		UV 337 nm, 355 nm	Peptidy, fragmentácia
kyselina 3,5-dimetoxy-4-hydroxyškoricová		UV 337 nm, 355 nm	Proteíny, peptidy
kyselina jantárová		IR 2.94 μm , 2.79 μm	Proteíny, peptidy

Obr. 3 Príklady matrice (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2014)

2.2.2 Príprava analytu

Pre úspešnú analýzu je rozhodujúca správna príprava vzorku. Analyt sa pripravuje zriedením malého množstva (1-10 pmol) s koncentráciou asi $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v rozpúšťadle, ktoré je miešateľné s matricovým roztokom. Roztoky matrice a analytu sa zmiešajú, čím sa získa výsledny molárny pomer analytu k matrici, spadajúci do rozsahu od 1:1000 do 1:100 000, vo vhodnom objeme. V tomto rozmedzí je dobrý pomer signálu k šumu a miera fragmentácie iónov je nízka. Základné aspekty pre prípravu analytu sú: matrica musí byť v nadbytku nad analytom, analyt sa musí úplne rozpustiť a mal by byť číry (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2014).

Prípravený roztok sa aplikuje na čistú doštičku, ktorá je obvykle z nehrdzavejúceho kovu. Rozpúšťadlo sa odparí a zostane rekryštalizovaná matrica s molekulami analytu. Voľba matrice a optimalizované podmienky pre prípravu vzorku majú podstatný vplyv na analytickú hodnotu MALDI spektra (Cole, 2010).

2.2.3 MALDI prístroje

Súčasťou prístroja je bezpochyby laser. V minulosti sa používali rôzne plynové alebo polovodičové lasere. V dnešnej dobe sú zďaleka najdôležitejšími zdrojmi svetla UV, menej bežne sa využívajú infračervené lasere. Užitočné sú avšak len tie, ktorých typ prevádzky je pulzný, pretože energia potrebná k desorpcii a ionizácii musí byť prenesená do vzorky vo veľmi krátkom čase. Medzi najbežnejšie používané UV lasere patrí nitrogénový s 337 nm a Nd:YAG laser s 355 alebo 326 nm. Infračervené lasere sa

používajú kvôli nižšej miere fragmentácie pri ionizácii, napríklad Er:YAG laser s 2,94 μm (Cole, 2010).

Zmes molekulárnych a fragmentovaných iónov vytvorených v zdroji iónov obsahuje informácie, ktoré by sa stratili, ak by sa nejako zmysluplne neidentifikovali. Je treba zmerať ich m/z pomer, pričom by analyzátor mal využívať jedinečné vlastnosti iónov, zistené zavedením elektrického alebo magnetického poľa. MALDI ióny môžu byť hmotnostne analyzované pomocou rôznych typov hmotnostných spektrometrov, od lacnejších spektrometrov s kvadropólovou iónovou pascou (QIT-MS), ktorý generuje kvalitou nízke spektrá, po spektrometer s Fourierovou transformáciou (FT-MS), ktorý generuje spektrá vysokej kvality, ale za podstatne vyššiu cenu (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2014). Najbežnejším typom je hmotnostný spektrometer doby letu („time-of-flight“, TOF-MS).

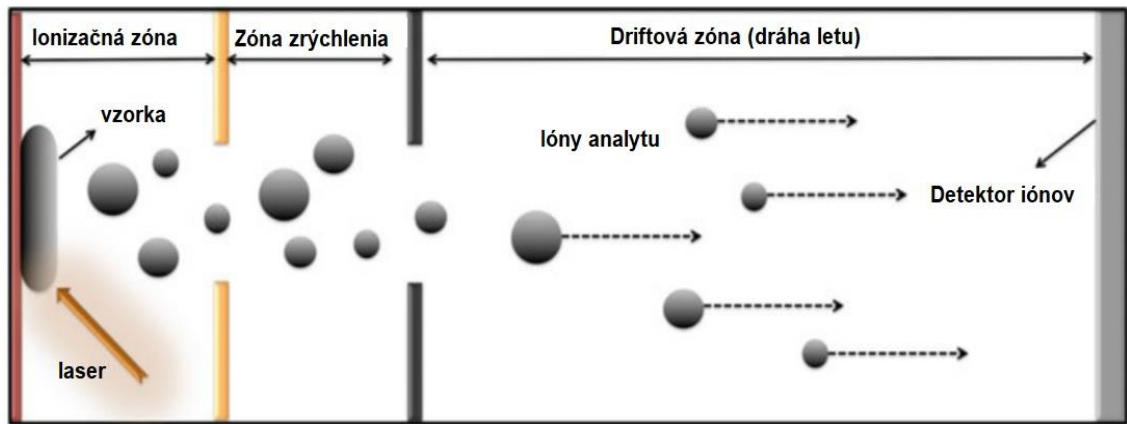
2.2.4 Ionizácia

Laserová desorpčná ionizácia nastane, keď je analyt ožiarený intenzívnym lúčom fotónov. Matrica absorbuje vyžiarenú energiu. Takto energetizovaná matrica sa tepelne rozkladá a predáva svoju energiu a protóny analytu, čím mu dodáva elektrický náboj. To vedie k dvom procesom, ktoré môžu nastať: protonácia a deprotonácia (Gross, 2017).

Mechanizmy tvorby iónov v MALDI sú predmetom pokračujúceho výskumu. Hlavným záujmom je vzťah medzi iónovým výťažkom a laserovou plynulosťou, časový vývoj desorpčného procesu a jeho dôsledkov na tvorbu iónov, počiatočná rýchlosť desorpčných iónov a otázka, či predformované ióny alebo ióny generované v plynnej fáze poskytujú hlavný zdroj iónových druhov detekovaných v MALDI (Gross, 2017).

2.2.5 TOF analyzátor

Technológia TOF, bola vynájdená koncom 50-tych rokov dvadsiateho storočia, ale mala chudobné rozlíšenie a nenašla si uplatnenie v metódach hmotnostnej spektrometrie, ktoré boli vtedy dostupné. Až neskôr po vynájdení MALDI MS došlo k ich kombinácii a vzniku novej vysoko citlivej metódy dnes známej ako MALDI-TOF (Hosseini a Martinez-Chapa, 2017).



Obr. 4 Schématické znázornenie mechanizmu času letu (Hosseini a Martinez-Chapa, 2017)

„Time of flight“ (TOF, v preklade „čas letu“) je technika, pri ktorej sú nabité ióny nútené letieť zo zdroja k detektoru, takže ich môžeme identifikovať na základe ich času letu k iónovému detektoru (de Hoffman a Stroobant, 2007).

Vytvorené matricové a analytové ióny sa urýchľujú a vedú smerom k driftovej zóne (Obr. 4). Detektor iónov, ktorý registruje intenzitu a čas letu iónov, je umiestnený na konci dráhy letu. Ióny s rovnakou kinetickou energiou E_k budú mať rôzne rýchlosti v na základe ich hmotnosti m , podľa rovnice:

$$E_k = \frac{1}{2} m v^2$$

Preto ťažším iónom zvyčajne trvá dlhšie prekonať celú dráhu ako ľahším (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2014).

V začiatkoch MALDI prístroje fungovali v režime lineárneho TOF spektrometra. To znamená, že ióny rôznych hmotností sa stretnú s detektorom na základe času, ktorý potrebujú na prekonanie driftovej zóny. Ťažším iónom, ako je uvedené vyššie, to trvá dlhšie, a preto obsadzujú vyššie hodnoty m/z ako tie ľahšie. Tento režim avšak nemá dostatočné rozlíšenie, pretože ióny rovnakého m/z nemusia dostať rovnakú intenzitu z laserového žiarenia, takže dochádza k distribúcie kinetickej energie v každom jednotlivom m/z (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2014).

S pokročilejším rozlíšením prišiel režim odrazu (reflektrón). Princíp tejto techniky pozostáva z iónových zrkadiel a elektrických polí, ktoré odrážajú ióny späť do driftovej zóny až k detektoru, nastaveného na opačnej strane dráhy letu. Mechanizmus odrazu preostruje ióny analytu podľa ich hmotnosti (de Hoffman a Stroobant, 2007).

2.3 Hmotnostná spektrometria v mikrobiológii

V minulosti spôsoby ionizácie a detekcie umožňovali analyzovať len látky, ktoré mali nízku molekulovú hmotnosť. Vznik jemnejších ionizačných procesov viedol k ďalším technikám pre molekuly s vyššou molekulovou hmotnosťou. Plazmová desorpcia, bombardovanie rýchlymi atómami a ionizácia elektrosprejom boli použité na analýzu zložiek živých organizmov (Cotter, 1992). Najvýznamnejší bol však objav TOF technológie, pretože sa ukázalo, že umožňuje analýzu molekúl bez teoretického horného hmotnostného limitu. Vzorky sú ionizované a desorbované za vzniku oblaku plyných iónov (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2014).

Laserová desorpcia a hmotnostná spektrálna analýza veľkých biomolekúl boli vyvinuté súčasne dvoma výskumnými skupinami v Japonsku a Nemecku pod vedením Koichi Tanakou a Franzom Hillenkampom. Za menej ako dekádu sa stala z MALDI-TOF metóda aplikovateľná na rôzne oblasti výskumu. Prvé komerčné nástroje sa používali hlavne na identifikáciu a diferenciaciu bakteriálnych druhov. Postupom času sa ukázalo, že v hmotnostných spektrách celých buniek nejakého bakteriálneho kmeňa sa nachádzajú vzory hmotnostných signálov, ktoré sú špecifické pre daný kmeň (Cole, 2010).

Hmotnostná spektrometria s matricovou laserovou desorpciou/ionizáciou za pomoci doby letu priniesla revolúciu v mikrobiológii. Schopnosť nákladovo efektívne a rýchlo identifikovať mikroorganizmy nahrádza náročnejšie a dlhé antigénne identifikačné metódy. Kritickou zložkou identifikácie mikroorganizmu s MALDI-TOF je šablóna alebo cieľová doštička, na ktorú sa nanášajú mikroorganizmy. Najbežnejšie používanou matricou je kyselina α -kyano-4-hydroxyškoricová (Kostrzewa, 2016).

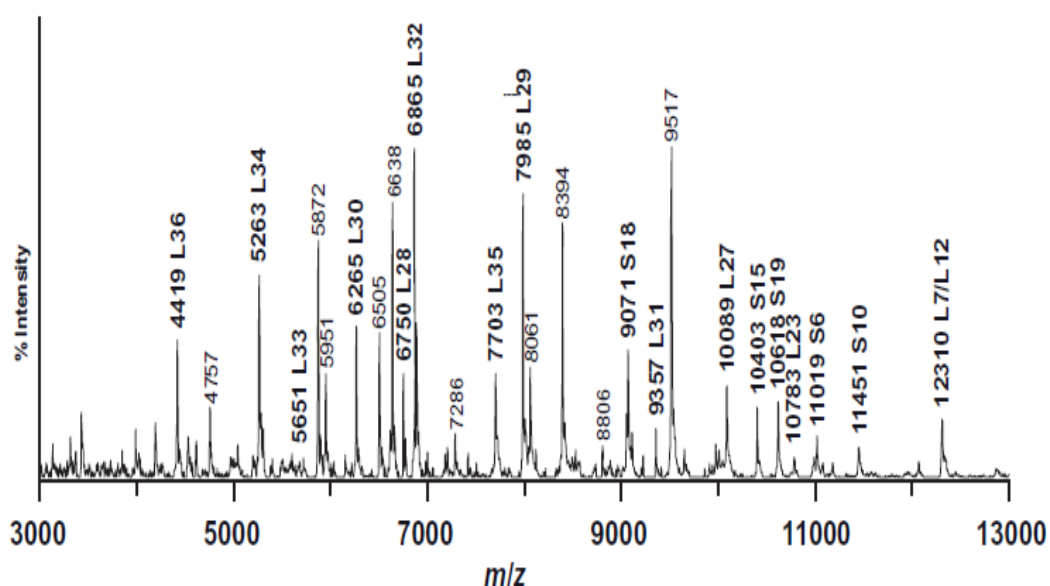
Aj zdanlivo dokonalá MALDI-TOF má niekoľko problémov. Tými najbežnejšími sú podobnosť genotypového alebo proteínového profilu, chýbajúce informácie v databáze a identifikácia mikroorganizmu, ktorý ešte nebol poznaný. Identifikáciu organizmov sa dá uskutočniť aj inými, bežnejšími metódami ako s použitím MALDI. O štandardných postupoch je známe, že sú časovo a pracovne náročné (napr. kultivačné média a biochemické testy). Moderné prístupy vedúce k rýchlejšej identifikácii sú vykonávané pomocou molekulárnych techník, ako je sekvenovanie 16S ribozomálneho génu na základe polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Pravdepodobne najpoužívanejšou je práve metóda PCR, ktorá sa dá aplikovať priamo na klinické vzorky, čím sa urýchlia

diagnostické procedúry. Ďalšími aplikovateľnými metódami sú mikroskopia, gélová elektroforéza s pulzným poľom a spektroskopia (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

2.3.1 „Fingerprints“ celých intaktných buniek

Mikrobiologické taxóny boli podrobne študované, aby sa zistila identita proteínov detegovaných hmotnostnou spektrometriou intaktných buniek. Veľa pozorovaných píkov v spektrách sa dá priradiť k ribozomálnym proteínom rôznych druhov nachádzajúcich sa v databázach. Počet dostupných úplných genómov sa neustále zväčšuje, takže identifikácia ribozomálnych proteínov v spektrách sa stáva lepšie uskutočniteľná a s pomocou bioinformatických nástrojov sa dajú rozšíriť dokonca aj na nesequenované druhy (Haroun a Saheer, 2010).

Štandardne sa pre analýzu mikroorganizmov používajú intaktné bunky alebo peptidové, či proteinové extrakty. Intaktné bunky značia bunky bez akejkoľvek deštruktívnej predbežnej úpravy. Príprava na analýzu býva jednoduchá, vzorka sa priamo dá na doštičku a pridá sa k nej jedna zo štandardných matric. Následne sa získa vhodný počet profilových spektier. Z priemerného profilového spektra (Obr. 5) sa extrahuje zoznam píkov, ktorý sa porovnáva so zoznamami píkov referenčných spektier uložených v databázach. Tento postup sa nazýva „fingerprintovanie“ (Hillenkamp a Peter-Katalinic, 2014).



Obr. 5 Hmotnostné spektrum celej bunky (*Streptococcus pneumoniae*) merané s MALDI-TOF (Haroun a Saheer, 2010)

Stabilita hmotnostných fingerprintov závisí od vybraného hmotnostného rozsahu. Pre mikrobiálnu identifikáciu je rozsah zvyčajne nastavený v rozpätí 2 000- 20 000 Da. Detegované proteíny môžu byť čiastočne identifikované pre viacero kmeňov, pre ktoré sú dostupné genómové sekvencie. Zaznamenané píky v príslušnom hmotnostnom spektre možno priradiť ribozomálnym, DNA viažucim proteínom, RNA chaperónom a ďalším druhom proteínov (Welker,2011).

2.3.2 Identifikácia organizmov

Podstatný krok pre identifikáciu druhov je porovnanie hmotnostného fingerprintu vzorky, ktorú chceme identifikovať s referenčnými spektrami z databáze. Používajú sa princípy, kde sa vyžaduje rozpoznávanie vzorov. Najdôležitejšou súčasťou systému pre automatizovanú spektrálnu identifikáciu mikroorganizmov je validovaná referenčná databáza. Tá by mala obsahovať nie len spektrálne údaje patogénov, ale aj súvisiacich nepatogénnych druhov, ktoré sa vyskytujú v klinickom prostredí, aby sa zabránilo falošne pozitívnej identifikácii. Ďalej je dôležité, aby databáza obsahovala spektrá viacerých kmeňov stoviek mikrobiálnych druhov. Okolo roku 2000 sa zaviedli na trh dve komplexné softvérové riešenie pre biotypizáciu mikroorganizmov: AnagnosTec a Bruker Daltonik (Karger, 2012).

AnagnosTec vyvinul SARAMIS, ktorý pozostáva z databázy obsahujúcej referenčné/kontrolné spektrá a softvér, ktorý umožňuje porovnanie fingerprintu neznámej vzorky s tzv. „Superspectra“. To bolo vypočítané z replikovaných hmotnostných spektier viacerých izolátov jedného záujmového druhu pestovaných za rôznych podmienok v rôznych laboratóriách. Identifikácia je založená na percente spoľahlivosti získanej zo vzájomného porovnávanía s referenčnými spektrami (Haroun a Saheer, 2010).

Spôsob biotypovania od spoločnosti Bruker spoľieha na hmotnostný spektrometer MALDI-TOF a softvér MALDI Biotyper. Aj tu sa identifikácia vykonáva porovnávaním spektra vzorky a knižnice s referenčnými spektrami. Použitý algoritmus párovania zohľadňuje intenzitu, polohu a frekvenciu vrcholov. Referenčné spektrá pochádzajú z analýz jedného, definovaného kmeňa (Karger, 2012).

Rovnaká spoločnosť ponúka vo Francúzsku softvér Andromas a databázu pre mikrobiálnu identifikáciu s MALDI-TOF MS. Andromas identifikuje na základe obmedzeného počtu druhovo špecifických vrcholov v získanom hmotnostnom spektrometre. Výsledky porovnávanía databáze so spektrom vzorky sa zobrazujú

v percentách, ktoré predstavujú podobnosť s referenčnými spektrami. Dobrá identifikácia odkazuje na hodnotu podobnosti najmenej 65% s rozdielom medzi prvými dvoma pridelenými druhmi najmenej 10% (Bille, 2011).

2.3.3 Faktory ovplyvňujúce vzorku

Podmienky kultivácie môžu spôsobiť niekoľko rôznych rozdielov. Existuje požiadavka na štandardizáciu celého postupu vrátane kultivácie buniek, prípravy vzoriek, kalibrácie prístroja a analýzu údajov. Nezrovnalosti ovplyvňujúce fyziológiu bunky vznikajú kvôli rozdielom v podmienkach rastu alebo aj kvôli prítomnosti cudzích látok. Známymi rušičkami, spôsobujúcimi potlačenie signálov a posun sú soli a tenzidy (Sauget, 2017).

Môže avšak nastať situácia, kde sú identické klonované izoláty, ktoré boli kultivované rovnako, a aj tak vyprodukujeme čiastočne neidentické hmotnostné spektrá, pretože ich ovplyvňujú chemické a technické faktory merania (Haroun a Saheer, 2010).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Nástroje

3.1.1 Python

Programátori neustále vytvárajú nové programovacie jazyky, pričom väčšina z nich je vytvorená so špecifickým cieľom, ktorý pomáha definovať charakteristiku a čo by mal daný jazyk robiť. V prípade Pythonu bolo dôležitým to, aby bolo programovanie efektívne a produktívne. Je to silný, objektovo orientovaný a funkcionálny jazyk. Bol vytvorený koncom 80-tych rokov Guidom Van Rossumom a jeho názov bol inšpirovaný komediálnou skupinou Monty Python (Bhasin, 2018).

Python sa stal populárnym hlavne kvôli jeho jednoduchosti a robustnosti. Najbežnejšie sa používa na vytváranie prototypu aplikácie, skriptovanie aplikácií založených na prehliadači, interakciu s databázami, navrhovanie matematických, vedeckých a technických aplikácií. Tento jazyk je pomerne jednoduchý na porozumenie, a vďaka odstráneniu viacnásobného zátvorkovanie pôsobí elegantne a prehľadne. Väčšina bežných úloh, ale aj menej bežných už bolo spracovaných v Pythone, preto existuje mnoho knižníc, ktoré programovanie ešte viac uľahčujú. Má napríklad viacero knižníc pre vyvíjanie grafického užívateľského rozhrania alebo tvorbu mobilnej aplikácie (Müller and Guido, 2016).

Program napísaný v Pythone sa dá rozbehnúť takmer na každej známej platforme (Mac, Windows, Linux), preto sa hovorí, že je multiplatformový. Často je porovnávaný s inými populárnymi jazykmi akými sú Java, R, Perl, C#, alebo aj s jazykom C, v ktorom je napísaný. Python obsahuje mnoho knižníc. Niektoré sú vstavané do jazyka a iné sa dajú získať prostredníctvom príkazového riadku. Tieto knižnice pomáhajú vykonávať mnoho úloh jednoduchšie a rýchlejšie pomocou Pythonu (Mueller, 2018).

Python je vyvíjaný na základe licencie open source schválenej OSI. Čo ho robí voľne distribuovateľným a voľne použiteľným. Licenciu spravuje Python Software Foundation. V súčasnosti je najnovšou verziou Python 3, ale používa sa aj verzia Python 2. Pre použitie jazyka existuje viacero integrovaných vývojových prostredí. 100% čistý Python sa nachádza v prostredí IDLE. Obsahuje zdrojový prehliadač s viacerými oknami, automatické hľadanie a dokončovanie, debugger a mnoho ďalších nástrojov, ktoré uľahčujú prácu (Chan, 2014).

3.1.2 Excel

Excel je napoužívanější tabuľkový softvér na svete. K dispozícii je mnoho ďalších tabuľkových softvérov, ale Excel je zďaleka najpopulárnejší a pre mnoho ľudí aj jediný známy. Vývojárom Excelu je firma Microsoft a predáva sa hlavne ako súčasť kancelárskeho balíka Microsoft Office. Veľkou výhodou je univerzálnosť tohto programu. Vykonáva numerické výpočty, ale je vhodný aj pre iné ako len numerické aplikácie (Alexander, 2018).

Práca v Exceli štandardne prebieha v rozhraní tabuľkového procesora obsahujúceho bunky usporiadané do riadkov a stĺpcov. Riadky sú označené celými kladnými číslami, stĺpce písmenami abecedy. Vytvorením nového súboru Excel, aplikácia predstaví prázdny zošit s jedným listom. Listy sa dajú pridávať, odoberať, meniť ich poradie a skývať ich. Prostredníctvom Microsoft Excel sa dajú prehľadne usporiadať, vyhodnocovať údaje, tvoriť grafy, tabuľkové hárky samostatne alebo pomocou šablón. Obsahuje vzorce pre vykonávanie výpočtov a veľký počet funkcií. Umožňuje importovať, filtrovať a formátovať dáta. Jeho súčasťou sú aj makrá písané v jazyku VBA (Guerrero, 2019).

Verzia Excel 2016 bola použitá pri práci v tejto bakalárskej práci. Je kompatibilná s Windows 10, Windows 8.1 a Windows 7. Desktopová verzia obsahuje všetky funkcie zabudované v Excel 2016. Dá sa kúpiť ako súčasť balíka Office aplikácií, ako súčasť predplatného balíka Office 365 alebo samostatne (Frye, 2015).

3.1.3 mMass

Podľa informácií na stránkach <http://www.mmass.org/>, mMass predstavuje multiplatformový open-source softvér na spracovanie hmotnostných spektier. Je písaný hlavne v jazyku Python. mMass je vydaný ako slobodný operačný systém (GNU), čiže ho môžu jeho používatelia kopírovať, meniť a distribuovať bez obmedzení. Jeho oficiálny vývoj bol ukončený začiatkom roka 2018 a kód sa dá nájsť na stránkach github.com/xxao/mMass.

mMass podporuje všetky moderné formáty ako sú mzML, mzXML, nzData, MGF a ASCII. Stredom softvéra je modul Hmotnostné Spektum. Poskytuje nielen vizualizáciu spektra (Obr. 6) a jeho manipuláciu, ale aj množstvo ďalších dôležitých funkcií. Pre píky sú k dispozícii metódy pre označovanie jednotlivých vrcholov aj pre vytvorenie celých

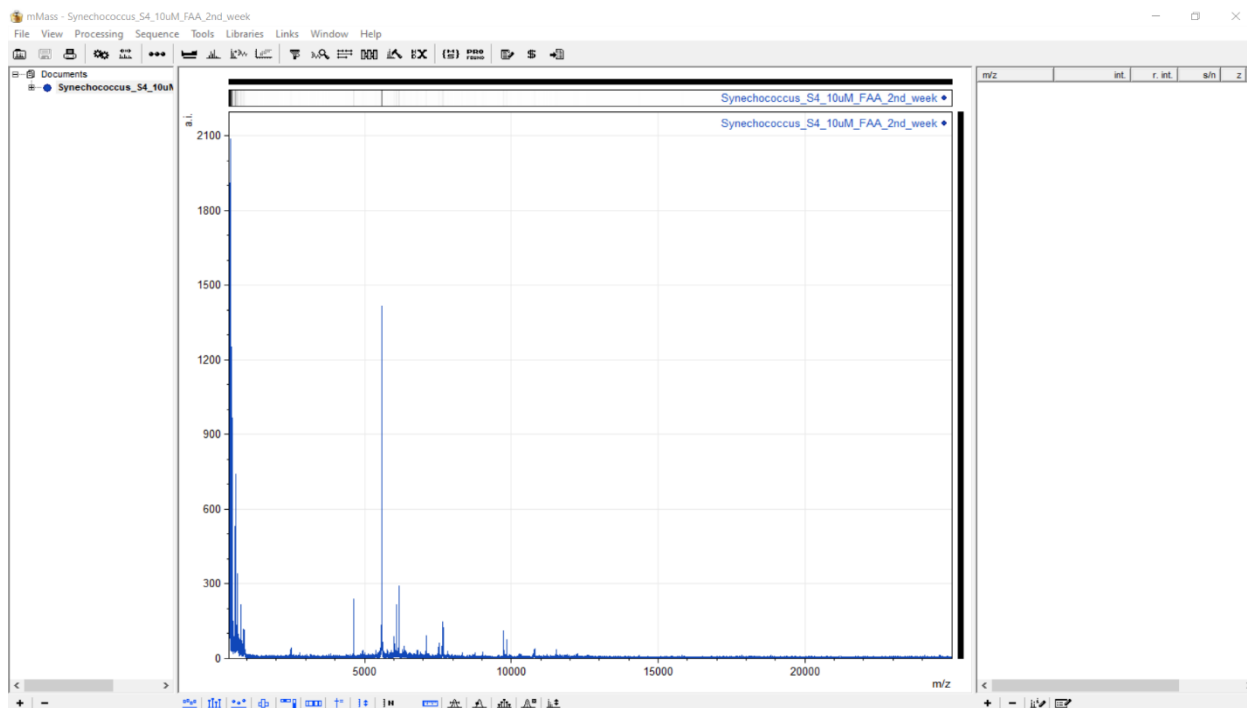
zoznamov píkov. Funkcie v mMass umožňujú napríklad aj porovnanie spektier medzi sebou vizuálne aj priamo cez vybrané vrcholy (Strohalm *et al.*, 2008).

mMass nie je žiadny prelomový algoritmus, ale je to vysoko prepracovaný mechanizmus. Jeho sila spočíva v poskytnutí sady nástrojov, ktoré pokrývajú riešenia pre širokú škálu typických proteomických úloh. Primárne bol vyvinutý pre MALDI-TOF spektrometriu, je možné ho aplikovať aj na iné techniky hmotnostnej spektrometrie (Strohalm *et al.*, 2008).

3.2 Databáze

3.2.1 Databáza Uniprot

Univerzálny zdroj pre Proteíny (UniProt, „The Universal Protein Resource“) poskytuje stabilný, komplexný a voľne dostupný centrálny zdroj proteínových sekvencií a funkčných anotácií. Konzorcium UniProt je spoluprácou medzi „Protein Information Resource“ (PIR), Švajčiarskym ústavom pre bioinformatiku (SIB) a Európskym bioinformatickým inštitútom (EMBL-EBI). UniProt sa skladá zo štyroch hlavných komponentov optimalizovaných pre rôzne použitie: UniProt vedomostná základňa (UniProtKB), UniProt referenčné klastre (UniRef), UniProt archív (UniParc), UniProt metagenomická a environmentálna databáza sekvencií (UniMES) (Apweiler, 2008).



Obr. 6 Softvér mMass po vizualizácii hmotnostného spektra pre organizmus *Synechococcus* kultivovaný počas dvoch týždňov s 10 μ M fluoroacetátu (FAA)

Na stránkach www.uniprot.org sa nachádza celý rad služieb, ktoré umožňujú prehliadať a analyzovať údaje. Dajú sa vykonávať jednoduché aj komplexné textové dotazy, spustiť vyhľadávanie na základe sekvencie vo všetkých UniProt databázach či vykonať viacnásobné zarovnanie sekvencií. Položky UniProt/UniRef a podpornú dokumentáciu je možné stiahnuť v rôznych formátoch, akými sú napríklad: „flat file“, FASTA, XML (Apweiler *et al.*, 2004).

UniProt poskytuje proteómové sady proteínov, ktorých genómy boli úplne sekvenované. Proteóm je skupina proteínov, kde sa predpokladá, že sú tvorené organizmom. Väčšina proteómov v UniProt databáze je založená na kompletnej translácii sekvenovaného genómu. Normálne obsahuje i sekvencie, ktoré sa odvodzujú od extrachromozomálnych prvkov organizmov (plazmidy, genómy organel), kde sa vyskytujú. Proteómy sa dajú získať prostredníctvom „Proteomes“ sekcie na stránkach UniProt (Obr. 7), ktorá poskytuje aj odkazy na sťahovanie dát v rôznych formátoch (Bateman, 2019).

The screenshot shows the UniProt Proteomes section. At the top, there is a search bar with 'Proteomes' entered and a search button. Below the search bar, there are navigation links: BLAST, Align, Retrieve/ID mapping, Peptide search, SPARQL, Help, and Contact. The main heading is 'Proteomes 2021_02 results'. There are two informational boxes: 'What are proteomes?' and 'What are reference proteomes?'. Below these, there are filters for 'Filter by' and 'Download'/'Columns'. A table of proteome entries is displayed, with columns for Proteome ID, Organism, Organism ID, Protein count, BUSCO, CPD, and Genome representation (RefSeq). The table lists several proteomes, including Phococina phococina papillomavirus 4, Bunyavirus La Crosse (isolate Human/United States/L78/1978), Banna virus (strain Indonesia/JKT-6423/1980) (BAV), Myxoma virus (strain Lausanne) (MYXV), and Tortoise microvirus 63.

Proteome ID	Organism	Organism ID	Protein count	BUSCO	CPD	Genome representation (RefSeq)
<input type="checkbox"/> UP000052091	Phococina phococina papillomavirus 4	706527	6	Single	Close to standard (low)	full
<input type="checkbox"/> UP000008768	Bunyavirus La Crosse (isolate Human/United States/L78/1978)	796210	4	Single	Close to standard (high)	full
<input type="checkbox"/> UP00000832	Banna virus (strain Indonesia/JKT-6423/1980) (BAV)	649604	12	Single	Close to standard (high)	full
<input type="checkbox"/> UP00000867	Myxoma virus (strain Lausanne) (MYXV)	31530	158	Single	Outlier (high)	full
<input type="checkbox"/> UP000323066	Tortoise microvirus 63	2583169	7	Single	Close to standard (high)	full

Obr. 7 Vzhľad sekcie „Proteomes“ na stránkach www.uniprot.org

3.2.2 FASTA formát

FASTA je textový formát používaný pre reprezentáciu nukleotidových alebo aminokyselinových sekvencií. Nukleotidy alebo aminokyseliny sú v ňom reprezentované pomocou jednopísmenkových kódov. FASTA formát pozostáva zo znaku „>“ nasledovanom identifikačným kódom sekvencie (Obr. 8). Za identifikáciou môže byť aj textový popis danej sekvencie. V novom riadku je už sekvencia vo forme písmien označujúcich jednotlivé aminokyseliny. Môže sa pretiahnuť aj na viac riadkov. FASTA súbor takisto umožňuje aj spracovanie viacerých sekvencií v jednom súbore (Binz *et al.*, 2019).

Formát je veľmi jednoduchý, vďaka čomu je použiteľný pre väčšinu vyhľadávacích nástrojov, a takmer každého sprostredkovateľa proteínových sekvencií (napr. UniProt). Umôžňuje aj ľahkú manipuláciu a analyzovanie sekvencie pomocou nástrojov pre spracovanie textu a skriptovacie jazyky (R, Python, Perl,...).

```
>sp|Q2J102|RL20_SYNJB 50S ribosomal protein L20 OS=Synechococcus sp. (strain JA-2-3B'a(2-13)) OX=321332 GN=rp1T PE=3 SV=1
MRVVRGNVARKRRKKILKLAGFRGAGSKLFR TANQQVMKALRSAYRDRRRKKRDFRRLW
ITRINAATRAQGLRYHEFIDGLKKANIQLNRKMLARLAFLDPEAFTQVVEAARQSRAS
```

Obr. 8 FASTA formát pre 50S ribosomálny proteín v proteóme *Synechococcus sp.* (strain JA-2-3B'a(2-13))

4 VÝSLEDKY

4.1 Softvérová aplikácia pre výpočet hmotností proteínov

Pokiaľ chceme priradiť signálu v hmotnostnom spektre konkrétny proteín, môžeme tak urobiť podľa molekulej hmotnosti. Tú vieme vyrátať zo sekvencie aminokyselín kódujúcich jednotlivé proteíny. Súbory proteínov, ktoré chceme priradzovať, čiže predpokladáme o nich, že sú produkované organizmom, sa dajú zohnať vo forme referenčných proteómov. Hmotnostné spektrá, ktoré sa použili pre testovanie algoritmov, boli získané hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF intaktnej bunky sinice *Synechococcus*. Pre viaceré kmene sinice *Synechococcus* boli v minulosti sekvenované kompletne genómy, z tých sa dajú získať proteíny ich počítačovou transláciou.

Keďže sa neustále sekvenujú nové genómy, stúpa aj číslo proteómov. Je dôležité si preto vybrať dostupnú databázu, ktorá efektívne organizuje svoje dáta. Jednou z tých najspoľahlivejších je UniProt. Poskytuje referenčné proteíny, tvoriace reprezentatívny prierez taxonomickou diverzitou. Referenčné proteómy pre jedenásť kmeňov sinice (Tab. 1) boli stiahnuté vo formáte FASTA z databázy proteómov na stránke <https://www.uniprot.org/proteomes/>. Všetky proteíny a ich sekvencie sa spojili do jedného súboru - *synechococcus.fasta*, ktorý sa používal ďalej.

Tab. 1 Kmene sinice *Synechococcus* a počet proteínov v príslušnom proteóme

Kmeň	Počet proteínov
<i>Synechococcus sp. Strain ATCC 27167 PCC 6312</i>	3541
<i>Synechococcus sp. strain ATCC 27264 PCC 7002 PR-6</i>	3179
<i>Synechococcus sp. strain ATCC 29403 PCC 7335</i>	5475
<i>Synechococcus sp. (strain CC9311)</i>	2882
<i>Synechococcus elongatus (strain PCC 7942)</i>	2657
<i>Synechococcus sp. (strain JA-2-3B'a(2-13))</i>	2835
<i>Synechococcus lacustris</i>	2879

Tab. 1 Kmene sinice *Synechococcus* a počet proteínov v príslušnom proteóme (pokračovanie)

Kmeň	Počet proteínov
<i>Synechococcus sp. MIT S9508</i>	2817
<i>Synechococcus sp. PCC 7502</i>	3310
<i>Synechococcus sp. WH 5701</i>	3316
<i>Synechococcus sp. (strain WH7805)</i>	2874

Pre tvorbu programu pre výpočet hmotností proteínov v proteóme bol založený nový súbor v python formáte *vypocet_hmotnosti.py*. Kedže sa pracovalo s FASTA formátom, bolo potrebné nájsť vhodné knižnice umožňujúce prácu s ním. Na to bol vybraný biopython, kolekcia nástrojov obsahujúca triedy predstavujúce biologické sekvencie, ktoré dokáže čítať, ale aj zapisovať do ďalších rôznych formátov súborov. Uľahčuje prácu so sekvenciami a údajmi o nich, čo zrýchly výkon programu a celkovo aj zkráti kód.

4.1.1 Výpočet hmotnosti proteínu

Hmotnosť proteínu sa vypočíta z jeho sekvecie, čiže postupnosti aminokyselín za sebou. Kvôli tomu je potrebné poznať hmotnosti jednotlivých aminokyselín, z ktorých sa proteín skladá. Hmotnosti, ktoré boli vyrátané, boli priemerná (vážený priemer hmotností jednotlivých izotopov) a monoizotopická (vypočítaná z presných hmotností prvkov). Tieto údaje sú ľahko dohľadateľné, v programe boli použité hmotnosti so zaokrúhlením na štyri desatinné miesta zo stránok www.proteinsandproteomics.org (tab. 2). Pri výpočte sa zohľadnila tvorba peptidových väzieb (formálne strata vody na jednu väzbu) plus existencie aminoskupiny na N-konci a karboxyskupinu na C-konci. Použili sa preto molekulové hmotnosti aminokyselinových zvyškov a pripočítala molekulová hmotnosť vody (H pre N-koniec a OH pre C-koniec).

Na uloženie hodnôt hmotností aminokyselín boli vytvorené dva slovníky fungujúce na princípe ukladania údajov do párov vo forme – kľúč:hodnota. Do jedného sa vložili hodnoty priemernej a do druhého monoizotopickej hmotnosti z tabuliek (Tab. 2). Okrem základných 20 aminokyselín slovníky obsahujú aj hodnotu X : 0.0000, ktorá sa v sekvenciách používa na zvýraznenie prítomnosti neznámej aminokyseliny.

Ďalej bola v programe vytvorená funkcia *vypocet_proteomu* (Obr. 9), pre ktorej zahájenie sú potreba dva súbory: *file_in* vo FASTA a *file_out* v textovom formáte.

Prostredníctvom knižnice biopython sa použila trieda SeqIO slúžiaca na prácu so súborom sekvencií. Táto trieda bola zavolaná v cykle *for*, aby program otvoril FASTA súbor, následne prechádzal jednotlivé sekvencie samostatne. Príkazom *.description* sa oddelili názvy proteínov od ich ID. Následne sa vytvorili premenné, do ktorých príkaz *sum* zrával hmotnosť aminokyseliny po aminokyseline, ako išli za sebou v sekvencii. Na záver sa k tejto hodnote prirátala ešte hmotnosť vody 18.0105. Tieto premenné boli zaokrúhlené s funkciou *round* na 4 desatinné miesta.

Tab. 2 Molekulové hmotnosti aminokyselinových zvyškov v proteínoch

Názov aminokyseliny	Skratka	Priemerná hmotnosť	Monoizotopická hmotnosť
Alanín	A	71.0788	71.03711
Cysteín	C	103.1448	103.00919
Kyselina asparágová	D	115.0886	115.02694
Kyselina glutámová	E	129.1155	129.04259
Fenylalanín	F	147.1766	147.06841
Glycín	G	57.0520	57.02146
Histidín	H	137.1412	137.05891
Izoleucín	I	113.1595	113.08406
Leucín	L	113.1595	113.08406
Metionín	M	131.1986	131.04049
Asparagín	N	114.1039	114.04293
Prolín	P	97.1167	97.05276
Glutamín	Q	128.1308	128.05858
Arginín	R	156.1876	156.10111
Serín	S	87.0782	87.03203
Treonín	T	101.1051	101.04768
Valín	V	99.1326	99.06841
Tryptofán	W	186.2133	186.07931
Tyrozín	Y	163.1760	163.06333
Neznáma	X	0.0000	0.0000

```

def vypocet_proteomu(file_in,out_file):

    with open(out_file,"w") as outt:
        sys.stdout = outt

        for seq_record in SeqIO.parse(open(file_in, mode = "r"),"fasta"):
            #predefinovanie opisu proteínov- odstránenie id-čiek
            seq_record.description=' '.join(seq_record.description.split()[1:])
            terminator = seq_record.description.index('OS=')

            #výpočet jednotlivých váh, +voda

            weight = sum((weights_average[p] for p in seq_record.seq),18.0105)
            weight = round(weight,4)
            weight2 = (sum((weights_mono[p] for p in seq_record.seq),18.0105))
            weight2 = round(weight2,4)
            X = "X"

            #výpis len váh menších než 20 000
            if (weight<20000) and (weight2<20000):
                if X in seq_record.seq:
                    pass
                else:
                    print(seq_record.id, "\t", weight, "\t", weight2,"\t", seq_record.description[:terminator] )

```

Obr. 9 Funkcia na výpočet hmotností proteínov v proteóme

Pokiaľ vieme, pre ako veľké signály potrebujeme priradzovať proteíny, môžeme si do programu pridať podmienku pre výpis. Neskôr použité signály neboli väčšie ako číslo 20 000, takže sa s cyklom *if* výpis programu omedzil len na menšie čísla. Výsledkom boli vytlačené hodnoty: ID proteínu, priemerná hmotnosť, monoizotopická hmotnosť a pokiaľ chceme tak aj názov proteínu. Na názov sa použil *terminator* aby sa vypísalo len meno proteínu bez popisu. V ďalšom procese sa však použil len výpis bez názvu.

V prípade, že sekvencia obsahovala neznámu aminokyselinu „X“, vyradila sa. Sekvencie s neznámou sa nachádzali len v proteóme *Synechococcus lacustris*. Ďalšou knižnicou použitou v tejto funkcii okrem *biopythonu* bola knižnica *sys*, z ktorej bol volaný príkaz *stdout*, ktorý umožňuje ukladanie výsledkov do nového súboru, v tomto prípade vo formáte *.txt*. Výsledky sa vložili do tabuliek (Tab. 3), s ktorými sa pracovalo ďalej.

4.2 Program pre priradzovanie proteínov

Pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie boli vedúcim práce získané spektrá intaktných buniek kultivovaných za prítomnosti inhibítorov a v bezťažovom prostredí. Špecifické vrcholy (píky) z týchto spektier boli odčítané ako hodnoty m/z , ktoré

rozpoznal program Biotyper, a následne boli vytvorené píklisty spektier. Všetky spektrá boli spracované s príslušnými kontrolami.

Tab. 3 Ukážka výsledku výpočtu proteómu *Synechococcus* sp. WH 5701

ID	Priemerná hmotnosť	Monoizotopická hmotnosť	Názov
tr A3YY84 A3YY84_9SYNE	6770.9128	6766.4541	Uncharacterized protein
tr A3YUZ0 A3YUZ0_9SYNE	5019.8421	5016.5663	Uncharacterized protein
tr A3YXH9 A3YXH9_9SYNE	4414.1876	4411.3329	Photosystem II reaction center protein I
tr A3Z0G5 A3Z0G5_9SYNE	14041.3643	14032.2419	Isrso18-transposase protein
tr A3YW35 A3YW35_9SYNE	17051.3131	17040.7147	t(6)A37 threonylcarbamoyladenosine biosynthesis protein TsaE
tr A3YTR3 A3YTR3_9SYNE	13422.5195	13414.2832	Uncharacterized protein
tr A3YYJ7 A3YYJ7_9SYNE	17764.5132	17753.0908	Recombination protein RecR
tr A3YTK2 A3YTK2_9SYNE	4829.4478	4826.326	Uncharacterized protein
tr A3YVF5 A3YVF5_9SYNE	16532.5977	16521.897	3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ occus sp. WH
tr A3YY19 A3YY19_9SYNE	4333.2897	4330.4358	Photosystem I reaction center subunit IX
tr A3YXF0 A3YXF0_9SYNE	10540.0819	10533.6052	Uncharacterized protein
tr A3YYD2 A3YYD2_9SYNE	2402.818	2401.2456	Uncharacterized protein
tr A3YY82 A3YY82_9SYNE	8699.2432	8693.4462	Uncharacterized protein
tr A3Z082 A3Z082_9SYNE	6863.7138	6859.3022	Uncharacterized protein
tr A3YUY6 A3YUY6_9SYNE	8324.6394	8319.1389	Uncharacterized protein
tr A3YTN5 A3YTN5_9SYNE	19804.5019	19791.817	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit J

Proteíny boli priradzované podľa m/z z píklistu a priemernej hmotnosti proteínu vypočítanej z proteómu, ktorá je braná ako teoretická hmotnosť vypočítaná zo sekvencie z databáze UniProt. Počas MALDI v pozitívnom móde dochádza k ionizácií, kde sa

hmotnosť peptidu/proteínu zväčší o protón vo forme $[M+H]^+$. Pre zistenie molekulovej hmotnosti preto odčítame od m/z hodnôt priemernú protónovú hmotnosť 1,007. Takže napríklad, ak máme peptid s m/z 3035,15, potom je jeho teoretická experimentálna hmotnosť 3034,14. K tejto hodnote už môžeme priradiť proteín, podľa toho ako si stanovíme toleranciu rozdielu experimentálnej a vypočítanej teoretickej hmotnosti. V tomto algoritme bola zvolená ± 1 .

Pre program priradzujúci proteíny hodnotám m/z bol vytvorený nový súbor *priradenie.py*. V kóde bola použitá len knižnica *sys*, znova pre jej príkaz na vypisovanie výsledku do nového súboru. Ďalej boli vytvorené dve funkcie.

4.2.1 Priradenie proteínov

Prvou funkciou je *priradenie_proteinov(proteom,signals)*, ktorá pre chod potrebuje vypočítané hmotnosti proteínov z proteómu v súbore označenom ako *proteom* a súbor *signals* s hodnotami m/z , ktorým chceme priradiť proteíny (Obr. 10). Najskôr sa s *with open* otvoria súbory s proteómom a pre výpis výstupných hodnôt. Vo *for* cykle sa berie riadok zo súboru *proteom* (bez názvu proteínu) a príkaz *split* ho rozdelí. Z hodnôt ID, priemerná a monoizotopická hmotnosť sa vytvorí slovník ID:priemerná, monoizotopická. Hmotnosti sa zaokrúhlia na dve desatinné miesta a pretypujú na *float*.

Ďalej sa otvorí súbor *signals* a s cyklom *for* sa súbor prechádza riadok po riadku. Keďže použité hodnoty obsahovali desatinnú čiarku a v pythone sa na túto funkciu používa bodka, metóda *replace* to napravi. Hodnoty sa pretypujú na *float* a zaokrúhlia na dve desatinné miesta.

Vytvorí sa nová premenná *exper*, ktorá stojí ako $M(\text{exp})$ a od m/z sa odčíta hmotnosť náboja 1,007. Nasleduje vytvorenie premennej *rozdiel*, za ktorou stojí číslo vzniknuté odčítaním experimentálnej hodnoty od priemernej hmotnosti.

Cyklom *if* sa vyberú hodnoty rozdielu v rozmedzí 1 až -1. Pre kontrolu sa vytvoria dve nové premenné. V prvej je priemerná hmotnosť s prirátanou hmotnosťou náboja, stojaca ako teoretická m/z . V druhej je vypočítaný rozdiel experimentálnej m/z od teoretickej. Funkcia končí výpisom hodnôt (Tab. 4): m/z , experimentálna hmotnosť, rozdiel, priemerná hmotnosť, teoretická m/z , monoizotopická hmotnosť a s ID proteínu sa volá funkcia *nazov(key)* pre zistenie príslušného názvu proteínu.

```

def priradenie_proteinov(proteom, signals):
    with open(proteom) as p:
        with open(out_file, 'w') as out:
            sys.stdout = out
            for line in p:
                (key, av, mo) = line.split()
                d[key] = av, mo
                avr = round(float(av), 2)
                mol = round(float(mo), 2)
                with open(signals) as f:
                    for i in f:
                        i = i.strip()
                        i = i.replace(',', '.')
                        mz = float(i)
                        mz = round(mz, 2)
                        exper = round((mz - 1.007), 2)
                        rozdiel = round((exper - avr), 2)
                        if (rozdiel <= 1) and (rozdiel >= -1):
                            avmz = round((avr + 1.007), 2)
                            rozdiel2 = round((mz - avmz), 2)
                            if (rozdiel2 <= 1) and (rozdiel2 >= -1):
                                print(mz, '\t', exper, '\t', rozdiel, '\t', avr, '\t',
                                      avmz, '\t', mol, '\t', key, '\t', nazov(key))

```

Obr. 10 Funkcia pre priradenie proteínov

4.2.2 Funkcia pre priradenie názvu

Keďže v programe sa pracuje so slovníkom, v *proteom* sa berie čisto súbor, ktorý má v riadku len tri hodnoty: ID, priemernú a monoizotopickú hmotnosť. Keby tam je aj názov proteínu, slovník by sa nedal použiť, pretože názvy nemajú rovnaký počet slov pre každý proteín, tým pádom by sa riadok nedal rozobrať. Vytvorila sa preto druhá funkcia, nazvaná *nazov(key)* (Obr. 11). Ako vstup berie hodnotu *key*, ktorá obsahuje ID kód proteínu.

```

def nazov(key):
    compare_dict = {}
    compare_dict[key.strip()] = None
    compare_tuple = tuple('>' + a for a in compare_dict.keys())
    with open(fasta) as fh:
        for line_no, line in enumerate(fh, 1):
            if line.startswith(compare_tuple):
                key, value = line.split(" ", 1)
                key = key[1:]
                terminator = value.index('OS=')
                compare_dict[key] = value
                return (value[:terminator])

```

Obr. 11 Funkcia pre priradenie názvu proteínu podľa ID

Najskôr sa z hodnôt *key* vytvorí prázdny slovník *compare_dict*, pričom metóda *strip* zbaví kľúče prázdnych medzier. Následne sa vytvorí *compare_tuple*, kde sa pred ID pridá znak „>“. S otvoreným proteómom sa v cykle *for* očísľujú sekvencie (*line_no*) a oddelia sekvencie (*line*).

Cykľus *if* zaručí, že sa vyberú len sekvencie, ktoré začínajú rovnako ako hodnoty v *compare_tuple*. S metódou *split* sa oddelí ID od názvu proteínu zo sekvencii. Ďalej sa odstráni znak „>“ z kľúčovej hodnoty ID a do *compare_dict* sa na základe zhodnosti ID priradí hodnota *value* obsahujúca názov, čím slovník už nie je prázdny. Tá sa ešte omedzí s *terminator*, pre výpis názvu bez popisu sekvencie. Výstupom funkcie je hľadaný názov proteínu.

Tab. 4 Ukážka výstupu funkcie *priradenie proteínov*

<i>m/z</i>	M(exp)	rozdiel	Priemerná hmotnosť	Teoretická <i>m/z</i>	Monoizotopická hmotnosť	Proteín
3766,1	3765,09	0,58	3764,51	3765,52	3761,99	Cytochrome B6-F complex subunit 5
3912,55	3911,54	0,82	3910,72	3911,73	3908,19	Photosystem II reaction center protein M
4161,75	4160,74	-0,25	4160,99	4162	4158,34	Photosystem II reaction center X protein
4161,75	4160,74	-0,14	4160,88	4161,89	4158,23	Uncharacterized protein
4161,75	4160,74	-0,26	4161	4162,01	4158,27	Uncharacterized protein

Tab. 4 Ukážka výstupu funkcie *priradenie proteínov* (pokračovanie)

<i>m/z</i>	M(exp)	rozdiel	Priemerná hmotnosť	Teoretická <i>m/z</i>	Monoizotopická hmotnosť	Proteín
4161,75	4160,74	0,82	4159,92	4160,93	4157,23	Uncharacterized protein
4605,41	4604,4	0,31	4604,09	4605,1	4601,27	Uncharacterized protein
4605,41	4604,4	0,24	4604,16	4605,17	4601,08	Uncharacterized protein
4605,41	4604,4	0,97	4603,43	4604,44	4600,45	Uncharacterized protein
4605,41	4604,4	0,84	4603,56	4604,57	4600,3	Uncharacterized protein
4605,41	4604,4	0,05	4604,35	4605,36	4601,45	Uncharacterized protein
4925,94	4924,93	0,16	4924,77	4925,78	4921,56	Cytochrome b559 subunit beta
4925,94	4924,93	-0,97	4925,9	4926,91	4922,63	Uncharacterized protein

4.3 Porovnanie signálov

Signály, ktorým sa priradzovali proteíny, boli získané zo spektier bunky rovnakého druhu, ale kultivované za rôznych podmienok. Proteíny, ktoré im boli priradené, sa preto mohli líšiť. So stanovením určitých hraníc môžeme skúmať, ktoré signály si boli podobné napriek rozdielom počas kultivácie a naopak sa dá zistiť, v akej miere látky menia bunku.

4.3.1 Podobné signály

Pre získanie podobných signálov bol vytvorený súbor *porovnanie_signálov.py*. S *def* sa vytvorila nová funkcia, ktorá bola nazvaná *porovnanie_podobne(signaly_1, signaly_2)* (Obr. 12), ktorá berie ako vstup dva súbory so signálmi. Najskôr sa zavolá funkcia *with open*, ktorá otvorí prvý súbor so signálmi, presnejšie s kontrolnou vzorkou. S cyklom *for* sa v nasledujúcich procesoch berie súbor riadok po riadku. Každému riadku, teda každej hodnote sa zmení typ na float a vytvorí nová premenná od ktorej sa odčítava číslo 1,007 pre získanie $M(\text{exp})1$. Ďalej sa otvára súbor so signálmi, ktoré chceme porovnávať s kontrolou. Tu sa opakuje proces *for* a vytvorí sa dve nové premenné, $M(\text{exp})2$ pre hodnoty *m/z* tohoto dokumentu.

```

def porovnanie_podobne(signal_1, signal_2):
    spolocne = {}
    kontrola = {}
    porovnanie = {}

    with open(signal_1, "r") as file:
        for i in file:
            i = i.strip()
            i = i.replace(", ", ".")
            mz = float(i)
            exper = mz - 1.007
            exper = round(exper, 2)

            with open(signal_2, "r") as f:
                for y in f:
                    x = y.strip()
                    z = x.replace(", ", ".")
                    mz2 = float(z)
                    exper2 = mz2 - 1.007
                    exper2 = round(exper2, 2)
                    rozdiel = round(exper - exper2, 2)

                    if rozdiel <= 3 and rozdiel >=-3:
                        print(mz, "\t", exper, "\t", rozdiel, "\t", mz2, "\t", exper2)
                        spolocne[rozdiel] = mz, exper, rozdiel, mz2, exper2
                        kontrola[exper] = mz
                        porovnanie[exper2] = mz2

    return spolocne, kontrola, porovnanie

```

Obr. 12 Funkcia *porovnanie_podobne*

Druhá premenná obsahuje hodnotu získanú výpočtom $M(\text{exp})_1 - M(\text{exp})_2$. Nasleduje cyklus *if* zaručujúci, že výsledky neprekonajú stanovené hranice. V kóde (Obr. 12) sa interval stanovil na veľkosť šiestich jednotiek, čiže sa obmedzí na rozdiely s hodnotou menšou ako 3 a väčšou ako -3. Nasleduje vytlačenie výsledkov (Tab. 5) a uloženie hodnôt do troch slovníkov. Prvý slovník *spolocne* obsahuje hodnoty, ktoré sa vytlačili (Tab. 5). *Kontrola* a *porovnanie* obsahujú len hodnoty *m/z*, ktoré majú podobné. *Kontrola* pre prvý a *porovnanie* pre druhý vstupný súbor.

Tab. 5 Ukážka výstupu funkcie *porovnanie_podobne*

CTRL		Rozdiel	1 uM Fa	
<i>m/z</i>	M(Exp)		<i>m/z</i>	M(Exp)
4605.1	4604.09	0.97	4606.07	4605.06
4621.75	4620.74	-1.59	4620.16	4619.15
4863.37	4862.36	-2.77	4860.6	4859.59
4928.4	4927.39	-0.74	4927.66	4926.65
4977.23	4976.22	2.74	4979.97	4978.96
5000.41	4999.4	-2.49	4997.92	4996.91
5385.43	5384.42	2.49	5387.92	5386.91
5472.06	5471.05	-0.25	5471.81	5470.8

Tab. 5 Ukážka výstupu funkcie *porovnanie_podobne* (pokračovanie)

CTRL			1 uM Fa	
<i>m/z</i>	M(Exp)	Rozdiel	<i>m/z</i>	M(Exp)
5510.27	5509.26	-2.01	5508.26	5507.25
5541.04	5540.03	-1.84	5539.2	5538.19
5563.93	5562.92	-1.59	5562.34	5561.33
5578.64	5577.63	-1.21	5577.43	5576.42
5596.17	5595.16	-2.07	5594.1	5593.09
5752.08	5751.07	2.56	5754.64	5753.63
5766.31	5765.3	1.84	5768.15	5767.14
5896.03	5895.02	0.73	5896.76	5895.75
5999.51	5998.5	-1.7	5997.81	5996.8
6026.75	6025.74	-2.2	6024.55	6023.54
6041.31	6040.3	-0.08	6041.23	6040.22
6072.53	6071.52	-2.49	6070.04	6069.03
6151.63	6150.62	-0.51	6151.12	6150.11
6167.19	6166.18	-1.48	6165.71	6164.7
6345.12	6344.11	2.67	6347.79	6346.78
6900.22	6899.21	-2.79	6897.43	6896.42
7070.04	7069.03	2.85	7072.89	7071.88
7087.28	7086.27	-0.41	7086.87	7085.86
7179.05	7178.04	-2.53	7176.52	7175.51

4.3.2 Rozdielne signály

Keď už máme určené, ktoré signály sú si podobné, je dobré vypísať si aj tie rozdielne. Pre túto úlohu boli vytvorené nové funkcie (Obr. 13). Obidve fungujú na rovnakom princípe. Načítajú sa hodnoty z príslušného slovníka so spoločnými signálmi a súbor s hodnotami *m/z* buďto z kontroly, alebo porovnávaného vzorku.

Najskôr sa zo slovníka so spoločnými signálmi vytvorí *list*. a v cykle *for* sa postupne prechádza. Ďalej sa otvorí súbor so signálmi s *with open* v móde „read“. V cykle *for* sa zoberie riadok s číslom, upraví sa, pretypuje a uloží sa do listu *k* alebo *p*.

```

def kontrola (signaly_1, kontrola):
    s = list(kontrola.values())
    k = []
    rozdielne = []
    with open(signaly_1,"r") as file:
        for line in file:
            line = line.strip()
            line = line.replace(",",".")
            mz = float(line)
            k.append(mz)
        for item in k:
            if item not in s:
                print(item)
                rozdielne.append(item)
    return (rozdielne)

def porovnanie(signaly_2, porovnanie):
    s = list(porovnanie.values())
    p = []
    rozdielne = []
    with open(signaly_2, "r") as file:
        for line in file:
            line = line.strip()
            line = line.replace(",",".")
            mz = float(line)
            p.append(mz)
        for item in p:
            if item not in s:
                print(item)
                rozdielne.append(item)
    return (rozdielne)

```

Obr. 13 Funkcie pre získ rozdielnych signálov

Ďalej sa použil cyklus v cykle. V prvom (*for*) sa zaistí, že hodnota sa nachádza v liste *k* alebo *p*. V druhom (*if*) sa skontroluje, že nie je v liste *s* podobnými signálmi a uloží sa do nového listu. Nakoniec sa zaistí výstup hodnôt s *print*, kde sa vytlačí rozdielne *m/z*. Pre istotu sa uloží aj do nového *list*-u, ktorý je zároveň aj výstupom celej funkcie.

4.4 Využitie kódov v praxi

Po navrhnutí a naprogramovaní algoritmov nasledovala ich skúška s konkrétnymi peaklistmi zloženými z hodnôt *m/z* získaných z buniek *Synechococcus* kultivovaných za rôznych podmienok. Hodnoty *m/z* pre jednotlivé spektrá sa vložili do samostatných .TXT súborov, ktoré boli následne použité ako vstupné dáta pre *priradenie_proteinov* (*proteom,signals*). Výsledky sa vypísali do nových textových súborov, ktoré boli spracované do tabuliek v exceli. Tabulky sa zoradili od najmenšieho *m/z* po najväčšie.

Na hodnoty *m/z* v textových súboroch sa použili aj algoritmy pre porovnanie signálov vzorky so signálmi kontrolných spektier. Maximálny rozdiel pre podobné signály sa zvolil 3 jednotky hore a 3 dole, čiže sa porovnávalo na intervale o veľkosti 6-tich jednotiek. Výsledky sa vložili do nových tabuliek v exceli (príloha Tabulky), taktiež sa do nich dali výsledky z kódu pre rozdielne signály. Pre každé porovnanie tak vzniká tabuľka s podobnými signálmi, kde je uvedená hodnota *m/z* a *M(exp)* a dve tabuľky s rozdielnymi signálmi: tabuľka „CTRL“ (značí kontrolu) obsahuje signály, ktoré sa vyskytli len v kontrole a nie vo vzorke a tabuľka pre vzorku, kde sú len signály vytiahnuté zo spektra vzorky a nevyskytujú sa v kontrole. Keďže rozdiel medzi podobnými signálmi mohol byť väčší ako rozdiel medzi *m/z* a hmotnosťou priradeného proteínu, mohlo dôjsť

k situácií, keď si signály síce boli podobné, ale im priradené proteíny sa líšili. Pre rozdielne aj spoločné hodnoty m/z sa znova použila funkcia pre *priradenie_proteinov*, o týchto proteínoch sa pojednáva v nasledujúcich častiach.

4.4.1 Kultivácia *Synechococcus* za prítomnosti inhibítorov

V laboratórii boli získané spektra *Synechococcus* buniek, ktoré boli kultivované v prítomnosti metabolických inhibítorov a ich príslušných kontrol. Medzi použité inhibítory patrili inhibítory metabolických procesov, akým je glykolýza – 2-deoxyglukóza (DG), citrátový cyklus – fluoroacetát (FAA) a malonát (MA) po dobu 1 až 3 týždňov. Pri kultivácii sa použili rôzne koncentrácie látok a to 1, 2, 5 a 10 μM . Z takto vzniknutých spektier boli získané diagnostické píky (m/z).

Spektrám sa pridelili proteíny a ich píky sa porovnali s referenčnými/kontrolnými spektrami. Vznikli tak tabuľky s podobnými a rozdielnymi signálmi. Pre výsledky ohľadom látky DG prebehla aj kontrola, či rozdiely skutočne patria zmysluplným píkom a nejedná sa len o šum.

CTRL		1 uM DG		CTRL		2 uM DG		CTRL		5 uM DG		CTRL		10 uM DG	
m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)
3766.1	3765.09	3170.53	3169.52	3912.55	3911.54	3080.42	3079.41	3912.55	3911.54	3873.15	3872.14	3766.1	3765.09	3033.57	3032.56
4605.41	4604.4	3813.01	3812.0	4161.75	4160.74	3813.09	3812.08	4161.75	4160.74	4869.04	4868.03	4605.41	4604.4	3170.79	3169.78
4975.85	4974.84	4912.96	4911.95	4858.62	4857.61	3871.88	3870.87	4858.62	4857.61	4811.99	4810.98	4975.85	4974.84	3829.36	3828.35
5363.42	5362.41	5123.43	5122.42	4975.85	4974.84	4910.96	4909.95	4975.85	4974.84	5109.75	5108.74	5363.42	5362.41	4380.35	4379.34
5371.71	5370.7	5237.44	5236.43	5363.42	5362.41	5066.06	5065.05	5363.42	5362.41	5125.28	5124.27	5859.46	5858.45	4505.88	4504.87
5385.21	5384.2	5252.33	5251.32	5385.21	5384.2	5122.52	5121.51	5385.21	5384.2	5197.4	5196.39	6026.09	6025.08	4912.39	4911.38
5615.12	5614.11	5367.54	5366.53	5754.25	5753.24	5323.67	5322.66	5859.46	5858.45	5238.7	5237.69	6103.47	6102.46	4980.25	4979.24
5859.46	5858.45	5381.39	5380.38	5859.46	5858.45	5381.33	5380.32	5911.02	5910.01	5253.47	5252.46	6281.29	6280.28	5123.75	5122.74
5911.02	5910.01	5451.92	5450.91	5911.02	5910.01	5509.59	5508.58	6103.47	6102.46	5269.97	5268.96	6325.15	6324.14	5237.24	5236.23
6026.09	6025.08	5493.23	5492.22	6026.09	6025.08	5524.22	5523.21	6325.15	6324.14	5325.49	5324.48	6903.12	6902.11	5251.95	5250.94
6103.47	6102.46	5508.1	5507.09	6103.47	6102.46	5620.58	5619.57	6903.12	6902.11	5382.06	5381.05	6935.47	6934.46	5357.89	5356.88
6281.29	6280.28	5524.2	5523.19	6281.29	6280.28	5636.37	5635.36	6935.47	6934.46	5453.82	5452.81	7071.45	7070.44	5508.72	5507.71
6325.15	6324.14	5620.97	5619.96	6325.15	6324.14	5708.08	5707.07	7071.45	7070.44	5494.01	5493.0	7177.31	7176.3	5524.21	5523.2
6903.12	6902.11	5636.25	5635.24	6903.12	6902.11	5750.46	5749.45	7142.96	7141.95	5509.61	5508.6	7192.1	7191.09	5638.34	5637.33
6935.47	6934.46	5708.75	5707.74	6935.47	6934.46	5764.54	5763.53	7330.86	7329.85	5525.26	5524.25	7330.86	7329.85	5766.3	5765.29
7330.86	7329.85	5764.15	5763.14	7071.45	7070.44	5780.72	5779.71	7497.92	7496.91	5622.06	5621.05	7610.82	7609.81	5780.57	5779.56
7497.92	7496.91	5781.59	5780.58	7412.96	7411.95	5840.66	5839.65	7775.66	7774.65	5637.95	5636.94	7775.66	7774.65	5879.94	5878.93
7775.66	7774.65	5836.67	5835.66	7330.86	7329.85	5877.42	5876.41	7791.3	7790.29	5655.79	5654.78	7942.74	7941.73	6202.97	6201.96
7810.97	7809.96	5877.0	5875.99	7497.92	7496.91	5923.3	5922.29	7810.97	7809.96	5694.26	5693.25	8017.33	8016.32	6201.42	6200.41
7942.74	7941.73	5964.41	5963.4	7775.66	7774.65	5965.79	5964.78	7942.74	7941.73	5710.05	5709.04	8106.67	8105.66	6221.73	6220.72
8017.33	8016.32	6020.86	6019.85	7942.74	7941.73	6006.55	6005.54	7962.15	7961.14	5736.34	5735.33	8157.07	8156.06	6276.19	6275.18
8106.67	8105.66	6092.64	6091.63	8017.33	8016.32	6022.07	6021.06	8017.33	8016.32	5766.19	5765.18	8186.94	8185.93	6329.24	6328.23
8157.07	8156.06	6133.05	6132.04	8106.67	8105.66	6095.59	6094.58	8106.67	8105.66	5783.7	5782.69	8293.14	8292.13	6359.3	6358.29
8186.94	8185.93	6220.48	6219.47	8157.07	8156.06	6133.77	6132.76	8157.07	8156.06	5823.22	5822.21	8496.24	8495.23	6407.54	6406.53
8293.14	8292.13	6263.09	6262.08	8186.94	8185.93	6203.48	6202.47	8186.94	8185.93	5838.24	5837.23	8682.93	8681.92	6534.09	6533.08
8496.24	8495.23	6276.92	6275.91	8204.76	8203.75	6221.09	6220.08	8204.76	8203.75	5864.28	5863.27	8732.81	8731.8	6660.89	6659.88
8534.62	8533.61	6328.47	6327.46	8233.87	8232.86	6276.38	6275.37	8233.87	8232.86	5878.98	5877.97	8749.46	8748.45	7045.12	7044.11
8574.04	8573.03	6387.42	6386.41	8293.14	8292.13	6328.86	6327.85	8293.14	8292.13	5950.52	5949.51	8872.91	8871.9	7130.71	7129.7
8682.93	8681.92	6405.02	6404.01	8496.24	8495.23	6373.55	6372.54	8310.33	8309.32	5966.12	5965.11	9144.23	9143.22	7188.54	7187.53
8732.81	8731.8	6463.54	6462.53	8534.62	8533.61	6391.28	6390.27	8496.24	8495.23	6093.95	6092.94	9172.63	9171.62	7302.14	7301.13
8749.46	8748.45	6478.35	6477.34	8574.04	8573.03	6405.1	6404.09	8534.62	8533.61	6135.27	6134.26	9677.47	9676.46	7590.86	7589.85
8872.91	8871.9	6504.51	6503.5	8682.93	8681.92	6476.89	6475.88	8574.04	8573.03	6207.38	6206.37	9750.85	9749.84	7646.42	7645.41
9144.23	9143.22	6518.36	6517.35	8732.81	8731.8	6503.97	6502.96	8682.93	8681.92	6221.72	6220.71	9780.69	9779.68	7842.36	7841.35
9172.63	9171.62	6533.02	6532.01	8749.46	8748.45	6518.3	6517.29	8732.81	8731.8	6262.84	6261.83	9923.44	9922.43	8093.56	8092.55
9677.47	9676.46	6661.05	6660.04	8763.58	8762.57	6533.98	6532.97	8749.46	8748.45	6329.4	6328.39	9962.09	9961.08	8193.77	8192.76
9750.85	9749.84	6918.22	6917.21	8872.91	8871.9	6567.66	6566.65	8763.58	8762.57	6390.96	6389.95	10314.93	10313.92	9759.77	9758.76
9923.44	9922.43	7043.67	7042.66	9144.23	9143.22	6606.46	6605.45	8872.91	8871.9	6406.91	6405.9	10564.63	10563.62	11133.15	11132.14
9962.09	9961.08	7301.31	7300.3	9172.63	9171.62	6660.78	6659.77	9010.72	9009.71	6463.58	6462.57	10735.99	10734.98	11492.4	11491.39
10314.93	10313.92	7500.99	7499.98	9677.47	9676.46	6860.68	6859.67	9144.23	9143.22	6479.11	6478.1	10955.46	10954.45	12149.05	12148.04
10564.63	10563.62	7552.57	7551.56	9750.85	9749.84	6918.42	6917.41	9172.63	9171.62	6503.44	6502.43	11476.39	11475.38	12175.75	12174.74
10735.99	10734.98	7815.64	7814.63	9780.69	9779.68	7044.87	7043.86	9677.47	9676.46	6520.09	6519.08	11495.84	11494.83	12193.63	12192.62
10763.38	10762.37	8091.52	8090.51	9792.04	9791.03	7139.73	7138.72	9750.85	9749.84	6534.9	6533.89	12303.08	12302.07	12223.18	12222.17
10955.46	10954.45	8296.58	8295.57	9923.44	9922.43	7162.63	7161.62	9780.69	9779.68	6606.16	6605.15	12413.95	12412.94		
11476.39	11475.38	8744.3	8743.29	9962.09	9961.08	7303.22	7302.21	9792.04	9791.03	6646.79	6645.78				
11495.84	11494.83	10713.18	10712.17	10314.93	10313.92	7436.54	7435.53	9923.44	9922.43	6662.88	6661.87				
12303.08	12302.07	10732.08	10731.07	10564.63	10563.62	7492.11	7491.1	9962.09	9961.08	6775.17	6774.16				
12413.95	12412.94	10767.3	10766.29	10735.99	10734.98	7501.91	7500.9	10314.93	10313.92	6919.43	6918.42				
				10763.38	10762.37	7552.26	7551.25	10564.63	10563.62	7047.22	7046.21				
				10955.46	10954.45	7573.22	7572.21	10735.99	10734.98	7304.22	7303.21				
				11476.39	11475.38	7587.43	7586.42	10955.46	10954.45	7489.84	7488.83				
				11495.84	11494.83	7649.72	7648.71	11476.39	11475.38	7501.91	7500.9				
				11511.28	11510.27	7748.03	7747.02	11495.84	11494.83	7685.97	7684.96				
				12207.67	12206.66	7805.64	7804.63	11511.28	11510.27	7815.64	7814.63				
				12303.08	12302.07	8194.44	8193.43	12207.67	12206.66	8708.36	8707.35				
				12413.95	12412.94	9210.77	9209.76	12303.08	12302.07	9735.95	9734.94				
								12413.95	12412.94						

Obr. 14 Obrázok tabuliek s rozdielnymi signálmi z prvého týždňa kultivácie s 1, 2, 5 a 10 μM DG (zľava). „CTRL“ (kontrola) obsahuje signály vyskytujúce sa len v kontrole a tabuľka vzorky (1, 2, 5 a 10 μM) signály vyskytujúce sa len vo vzorke a nie v kontrole.

4.4.1.1 Deoxyglukóza

2-Deoxyglukóza(DG) je organická zlúčenina odvodená od glukózy nahradením hydroxylovej skupiny druhého uhlíku atómom vodíka. Pôsobí kompetitívnu inhibíciu produkcie glukózy-6-fosfátu z glukózy na začiatku glykolýzy. Pre signály intaktných buniek kultivovaných s DG sa vo všetkých spektrách vrátane kontroly identifikovali hlavne tzv. necharakterizované proteíny („Uncharacterized protein“).

Po prvom týždni sa vo všetkých spektrách našli signály odkazujúce na 3 ribozomálne proteíny: „50S ribosomal protein L32“, „50S ribosomal protein L35“, „30S ribosomal protein S18“. Identifikovali sa prevažne proteíny súvisiace s fotosyntézou akými sú „Protein PsbN“, „Phycobilisome 7.8 kDa linker polypeptide, allophycocyanin-associated, core“, rôzne typy reakčného centra fotosystémov (napr. „Photosystem II reaction center protein K“, „Photosystem I reaction center subunit PsbK“,...). V každom spektre sa našiel minimálne jeden „Nif11 domain-containing protein“ priradený pre rozdielne píky. Tieto proteíny patria do rodiny Nif11, ktorá súvisí prevažne s funkciou fixácie dusíka.

V rozdielnych signáloch (Obr. 14) sa našiel aj proteín súvisiaci s bukovým cyklom a to „Cell division topological specificity factor“ pre 1 μM (m/z 10 713.18), ktorý sa podieľa na delení bunky. V spektre s 5 μM to bol „Cell division protein SepF“ pre m/z 10 776. Na rozdiel od kontroly, spektrám boli priradený „Putative transcriptional regulator“. „ORF 3“ bol u 2 a 5 μM , „Sigma factor SigF“ a „Thiamine_BP domain-containing protein“, u 10 μM . 1 μM sa priradil „Lhc-like protein Lhl4“ a „YCII domain-containing protein“.

Podľa tabuliek s podobnými signálmi ich najviac podobných s kontrolou má spektrum bunky s 10 μM DG. Väčšina týchto signálov bola priradená „Uncharacterized protein“, ale našlo sa aj pár súvisiacich s fotosyntézou, transkripciou („DNA-directed RNA polymerase subunit omega“ pre m/z 8763.58 a 8763.33) a väzbou nukleových kyselín („RNA-binding protein“ pre m/z 10 774.75 a 10 774.6).

Pre spektrá z druhého týždňa bolo priradených v priemere najmenej proteínov. V každom sa našlo po dva ribozomálne proteíny („50S ribosomal protein L34“, „50S ribosomal protein L35“). Priradilo sa niekoľko proteínov súvisiacich s fotosyntézou a s funkciou bunkovej zložky („CAB/ELIP/HLIP family protein“, „Salt-stress induced hydrophobic peptide“). Spektrám, narozdiel od kontroly (Obr. 15), 1 a 2 μM bol priradený „ORF3“ proteín, 5 a 10 μM „CsbD domain-containing protein“. Proteíny domény CsbD

sú známe ako všeobecné bakteriálne proteíny reagujúci na stres a ORF3 („Open Reading Frame 3“) je vírusový proteín, zvyčajne súvisiaci s apoptózou.

Ďalej boli všetkým spektrám priradené proteíny súvisiace s viazaním ATP. „10 kDa chaperonin“ chaperón, priradený pre 1 μM (m/z 10747.72). U ostatných išlo o „Carbohydrate uptake ABC transporter-2(CUT2) family, ATP-binding protein, truncation“. Tieto proteíny patrili rozdielnym signálom, čiže ich kontrola neobsahovala. Najviac podobných signálov s referenciou malo spektrum s koncentráciou 1 μM . Podobné signály patrili prevažne „Uncharacterized protein“.

Narozdiel od kontroly (Obr. 15), spektrum 1 μM obsahovalo napríklad proteín „Photosystem II reaction center protein K“ (m/z 5 783.36) a „Chlorophyll A-B binding protein“ (m/z 7557.23). „Bacterial nucleoid protein Hbs“ a „4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase“ sa priradili rozdielnym signálom zo spektra 2 μM . Pre 5 μM sa v rozdielnych signáloch priradil „Addiction module toxin, HicA family“, pre 10 μM „Molybdenum-pterin binding domain protein“, „GtrA-like protein“ a „Acyolphosphatase“.

CTRL		1 uM DG		CTRL		2 uM DG		CTRL		5 uM DG		CTRL		10 uM DG	
m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)
3571.58	3570.57	3033.85	3032.84	3571.58	3570.57	3812.3	3811.29	3571.58	3570.57	3812.96	3811.95	3571.58	3570.57	3208.57	3207.56
4765.27	4764.26	4477.67	4476.66	4765.27	4764.26	3871.75	3870.74	4765.27	4764.26	4796.52	4795.51	4765.27	4764.26	3354.6	3353.59
5034.03	5033.02	4698.86	4697.85	5034.03	5033.02	3999.87	3998.86	5034.03	5033.02	5109.07	5108.06	5034.03	5033.02	3367.49	3366.48
5274.88	5273.87	4723.27	4722.26	5274.88	5273.87	4367.92	4366.91	5274.88	5273.87	5294.95	5293.94	5274.88	5273.87	3763.89	3762.88
5284.95	5283.94	4827.19	4826.18	5284.95	5283.94	5124.45	5123.44	5284.95	5283.94	5374.27	5373.26	5284.95	5283.94	4824.05	4823.04
5375.28	5374.27	5064.98	5063.97	5375.28	5374.27	5253.23	5252.22	5375.28	5374.27	5389.89	5388.88	5375.28	5374.27	4867.32	4866.31
5389.89	5388.88	5112.35	5111.34	5389.89	5388.88	5324.86	5323.85	5389.89	5388.88	5389.89	5388.88	5389.89	5388.88	4974.62	4973.61
5735.81	5734.8	5125.07	5124.06	5735.81	5734.8	5368.34	5367.33	5735.81	5734.8	6124.35	6123.34	5735.81	5734.8	5015.39	5014.38
5883.17	5882.16	5240.49	5239.48	5883.17	5882.16	5380.77	5379.76	5883.17	5882.16	6353.9	6352.89	5883.17	5882.16	5054.39	5053.38
5986.31	5985.3	5254.59	5253.58	5986.31	5985.3	5397.72	5396.71	5986.31	5985.3	6500.44	6500.44	5986.31	5985.3	5108.8	5107.79
6353.9	6352.89	5369.27	5368.26	6353.9	6352.89	5436.83	5435.82	6353.9	6352.89	7073.4	7072.39	6353.9	6352.89	5125.38	5124.37
6560.44	6559.43	5444.05	5443.04	6560.44	6559.43	5454.05	5453.04	6560.44	6559.43	7338.01	7337.0	6560.44	6559.43	5145.49	5144.48
6788.41	6787.4	5457.52	5456.51	6788.41	6787.4	5492.62	5491.61	6788.41	6787.4	7461.09	7460.08	6788.41	6787.4	5183.43	5182.42
7338.01	7337.0	5510.34	5509.33	7338.01	7337.0	5509.54	5508.53	7338.01	7337.0	7479.92	7478.91	7338.01	7337.0	5236.92	5235.91
7461.09	7460.08	5621.47	5620.46	7461.09	7460.08	5653.07	5652.06	7461.09	7460.08	7499.52	7498.51	7461.09	7460.08	5252.23	5251.22
7479.92	7478.91	5709.58	5708.57	7479.92	7478.91	5694.65	5693.64	7479.92	7478.91	7686.99	7685.98	7479.92	7478.91	5370.25	5369.24
7499.52	7498.51	5768.55	5767.54	7499.52	7498.51	5708.35	5707.34	7499.52	7498.51	7729.83	7728.82	7499.52	7498.51	5392.23	5391.22
7729.83	7728.82	5783.36	5782.35	7729.83	7728.82	5765.99	5764.98	7729.83	7728.82	7791.96	7790.95	7729.83	7728.82	5400.43	5399.42
7791.96	7790.95	5803.1	5802.09	7791.96	7790.95	5782.18	5781.17	7791.96	7790.95	7812.66	7811.65	7791.96	7790.95	5420.38	5419.37
7813.67	7812.66	5846.26	5845.25	7813.67	7812.66	5838.29	5837.28	7813.67	7812.66	8091.27	8090.26	7813.67	7812.66	5453.57	5452.56
7830.15	7829.14	5890.34	5889.33	7830.15	7829.14	5894.88	5893.87	7830.15	7829.14	8208.25	8207.24	7830.15	7829.14	5493.88	5492.87
7964.61	7963.6	5947.49	5946.48	7964.61	7963.6	5908.5	5907.49	7964.61	7963.6	8309.9	8308.89	7964.61	7963.6	5509.54	5508.53
8091.27	8090.26	5966.18	5965.17	8091.27	8090.26	5966.07	5965.06	8091.27	8090.26	8327.4	8326.39	8091.27	8090.26	5616.59	5615.58
8208.25	8207.24	5981.23	5980.22	8208.25	8207.24	5981.15	5980.14	8208.25	8207.24	8576.52	8575.51	8208.25	8207.24	5656.97	5655.96
8309.9	8308.89	6092.41	6091.4	8309.9	8308.89	6093.32	6092.31	8309.9	8308.89	8683.79	8682.78	8309.9	8308.89	5676.25	5675.24
8683.79	8682.78	6111.79	6110.78	8683.79	8682.78	6107.84	6106.83	8683.79	8682.78	8687.19	8686.18	8683.79	8682.78	5709.98	5708.97
8687.19	8686.18	6135.82	6134.81	8687.19	8686.18	6191.53	6190.52	8687.19	8686.18	8701.26	8700.25	8687.19	8686.18	5746.44	5745.43
8701.26	8700.25	6207.76	6206.75	8701.26	8700.25	6206.29	6205.28	8701.26	8700.25	8709.9	8708.89	8701.26	8700.25	5782.46	5781.45
8709.9	8708.89	6222.2	6221.19	8709.9	8708.89	6223.65	6222.64	8709.9	8708.89	8744.0	8742.99	8709.9	8708.89	5803.39	5802.38
8744.0	8742.99	6328.37	6327.36	8744.0	8742.99	6250.58	6249.57	8744.0	8742.99	8763.68	8762.67	8744.0	8742.99	5839.2	5838.19
8763.68	8762.67	6367.83	6366.82	8763.68	8762.67	6308.08	6307.07	8763.68	8762.67	9007.57	9006.56	8763.68	8762.67	5878.98	5877.97
9007.57	9006.56	6390.1	6389.09	9007.57	9006.56	8744.0	8742.99	9007.57	9006.56	9109.53	9108.52	9007.57	9006.56	5894.75	5893.74
9109.53	9108.52	6406.82	6405.81	9109.53	9108.52	8763.68	8762.67	9109.53	9108.52	9125.0	9124.0	9109.53	9108.52	5912.2	5911.19
9130.38	9129.37	6424.84	6423.83	9130.38	9129.37	8792.3	8791.29	9130.38	9129.37	9132.5	9131.49	9130.38	9129.37	5981.29	5980.28
9132.5	9131.49	6482.33	6481.32	9132.5	9131.49	9109.53	9108.52	9132.5	9131.49	9145.94	9144.93	9132.5	9131.49	6133.51	6132.5
9145.94	9144.93	6539.41	6538.4	9145.94	9144.93	9130.38	9129.37	9145.94	9144.93	9161.77	9160.76	9145.94	9144.93	6191.88	6190.87
9161.77	9160.76	6552.8	6551.79	9161.77	9160.76	9132.5	9131.49	9161.77	9160.76	9175.03	9174.02	9161.77	9160.76	6266.85	6265.84
9175.03	9174.02	6609.16	6608.15	9175.03	9174.02	9145.94	9144.93	9175.03	9174.02	9242.39	9241.38	9175.03	9174.02	6320.78	6319.77
9242.39	9241.38	6666.27	6665.26	9242.39	9241.38	9161.77	9160.76	9242.39	9241.38	9258.72	9257.71	9242.39	9241.38	6370.24	6369.23
9258.72	9257.71	6791.81	6790.8	9258.72	9257.71	9175.03	9174.02	9258.72	9257.71	9279.38	9278.37	9258.72	9257.71	6407.39	6406.38
9279.38	9278.37	6810.94	6809.93	9279.38	9278.37	9181.06	9180.05	9279.38	9278.37	9312.5	9311.49	9279.38	9278.37	6425.36	6424.35
9312.5	9311.49	6885.89	6884.88	9312.5	9311.49	6607.04	6606.03	9312.5	9311.49	9336.31	9335.3	9312.5	9311.49	6447.63	6446.62
9336.31	9335.3	6918.04	6917.03	9336.31	9335.3	6664.24	6663.23	9336.31	9335.3	10252.57	10251.56	9336.31	9335.3	6521.53	6520.52
10252.57	10251.56	6939.31	6938.3	10252.57	10251.56	6733.49	6732.48	10252.57	10251.56	10268.79	10267.78	10252.57	10251.56	6535.72	6534.71
10268.79	10267.78	7049.31	7048.3	10268.79	10267.78	6809.49	6808.48	10268.79	10267.78	10272.0	10271.0	10268.79	10267.78	6554.0	6553.0
10272.0	10271.0	7145.21	7144.2	10272.0	10271.0	6863.59	6862.58	10272.0	10271.0	10373.64	10372.63	10272.0	10271.0	6664.34	6663.33
10373.64	10372.63	7438.07	7437.06	10373.64	10372.63	6917.48	6916.47	10373.64	10372.63	10755.29	10754.28	10373.64	10372.63	6810.9	6809.89
10755.29	10754.28	7557.23	7556.22	10755.29	10754.28	6936.73	6935.72	10755.29	10754.28	10765.76	10764.75	10755.29	10754.28	6937.2	6936.19
11019.56	11018.55	7833.89	7832.88	11019.56	11018.55	7047.14	7046.13	11019.56	11018.55	10778.9	10777.89	11019.56	11018.55	7051.0	7049.99
11493.62	11492.61	9015.57	9014.56	11493.62	11492.61	7122.89	7121.88	11493.62	11492.61	11019.56	11018.55	11493.62	11492.61	7175.33	7174.32
11736.72	11735.71	10274.64	10273.63	11736.72	11735.71	7176.41	7175.4	11736.72	11735.71	11493.62	11492.61	11736.72	11735.71	7306.07	7305.06
11823.67	11822.66	10288.86	10287.85	11823.67	11822.66	7303.86	7302.85	11823.67	11822.66	11736.72	11735.71	11823.67	11822.66	7391.01	7390.0
11844.24	11843.23	10309.67	10308.66	11844.24	11843.23	7319.71	7318.7	11844.24	11843.23	11823.67	11822.66	11844.24	11843.23	7979.3	7978.29
12179.55	12178.54	10319.87	10318.86	12179.55	12178.54	7683.42	7682.41	12179.55	12178.54	11844.24	11843.23	12179.55	12178.54	9012.75	9011.74
12212.61	12211.6	10747.72	10746.71	12212.61	12211.6	7834.65	7833.64	12212.61	12211.6	12179.55	12178.54	12212.61	12211.6	9104.94	9103.93
14978.64	14977.63			14978.64	14977.63	9011.99	9010.98	14978.64	14977.63	12212.61	12211.6	14978.64	14977.63	9797.3	9796.29
						9735.57	9734.56			12246.92	12245.91			10260.31	10259.3
						9813.95	9812.94			12246.92	12245.91			10774.07	10773.06
						10247.57	10246.56			13031.43	13030.42				
						10314.64	10313.63								
	</														

1 µM DG					CTRL				
m/z	M[Exp]	Rozdiel	m/z2	M[Exp]2	m/z	M[Exp]	Rozdiel	m/z2	M[Exp]2
4605.01	4604.0	-0.13	4605.14	4604.13	4604.23	4603.22	-0.91	4605.14	4604.13
4621.05	4620.04	0.96	4620.09	4619.08	4620.16	4619.15	0.07	4620.09	4619.08
4914.47	4913.46	1.96	4912.51	4911.5	4911.32	4910.31	-1.19	4912.51	4911.5
4928.59	4927.58	0.8	4927.79	4926.78	4927.15	4926.14	-0.64	4927.79	4926.78
5372.92	5371.91	-1.81	5374.73	5373.72	4998.76	4997.75	1.89	4998.87	4998.86
5385.96	5384.95	-2.93	5388.89	5387.88	5561.98	5560.97	-2.15	5564.13	5563.12
5473.8	5472.79	1.29	5472.51	5471.5	5577.43	5576.42	-1.34	5578.77	5577.76
5541.03	5540.02	0.08	5540.95	5539.94	5593.91	5592.9	-0.04	5593.95	5592.94
5564.95	5563.94	0.82	5564.13	5563.12	5752.39	5751.38	-0.98	5755.37	5754.36
5578.17	5577.16	-0.6	5578.77	5577.76	5783.16	5782.15	-0.14	5783.3	5782.29
5595.69	5594.68	1.74	5593.95	5592.94	5981.83	5980.82	-1.81	5983.64	5982.63
5754.04	5753.03	-1.33	5755.37	5754.36	5997.85	5996.84	0.17	5997.68	5996.67
5784.63	5783.62	1.33	5783.37	5782.36	6024.2	6023.19	-0.73	6024.93	6023.92
5986.56	5985.55	2.92	5983.64	5982.63	6038.72	6037.71	2.64	6036.08	6035.07
5998.99	5997.98	1.31	5997.68	5996.67	6069.74	6068.73	-0.98	6070.72	6069.71
6026.27	6025.26	1.34	6024.93	6023.92	6166.85	6165.84	-1.21	6168.06	6167.05
6070.83	6069.82	0.11	6070.72	6069.71	6295.97	6294.96	-0.99	6296.96	6295.95
6188.02	6187.01	-0.04	6188.06	6187.05	6350.4	6349.39	-0.77	6351.17	6350.16
6297.02	6296.01	0.06	6296.96	6295.95	6680.93	6679.92	-2.57	6683.5	6682.49
6561.43	6560.42	-0.66	6562.09	6561.08	6787.85	6786.84	-0.57	6788.42	6787.41
6685.24	6684.23	1.74	6683.5	6682.49	6900.39	6899.38	0.7	6899.69	6898.68
6791.12	6790.11	2.7	6788.42	6787.41	7047.84	7046.83	-1.18	7050.02	7049.01
6899.7	6898.69	0.01	6899.69	6898.68	7067.51	7066.5	-2.46	7069.97	7068.96
7052.03	7051.02	2.01	7050.02	7049.01	7087.27	7086.26	-0.14	7087.41	7086.4
7068.06	7067.05	-1.91	7069.97	7068.96	7176.95	7175.94	2.43	7174.52	7173.51
7089.12	7088.11	1.71	7087.41	7086.4	7496.57	7495.56	-0.66	7497.23	7496.22
7196.66	7195.65	0.79	7195.87	7194.86	7519.46	7518.45	2.1	7517.36	7516.35
7533.4	7532.39	2.71	7530.69	7529.68	7532.41	7531.4	1.72	7530.69	7529.68
7631.16	7630.15	-1.57	7632.73	7631.72	7631.19	7630.18	-1.54	7632.73	7631.72
7664.1	7663.09	-1.13	7665.23	7664.22	7663.75	7662.74	-1.48	7665.23	7664.22
7952.47	7951.46	0.4	7952.07	7951.06	7827.96	7826.95	-0.89	7828.85	7827.84
8206.83	8205.82	1.82	8205.01	8204.0	8313.9	8312.89	2.15	8311.75	8310.74
8329.81	8328.8	0.85	8328.96	8327.95	8328.89	8327.88	-0.07	8328.96	8327.95
8768.66	8767.65	-0.72	8769.38	8768.37	8708.64	8707.63	-0.45	8709.09	8708.08
9108.7	9107.66	1.94	9123.93	9122.92	9145.12	9144.11	0.57	9144.55	9143.54
10038.02	10037.01	-2.73	10040.75	10039.74	9723.17	9722.16	-0.76	9723.93	9722.92
11516.98	11515.97	1.53	11515.45	11514.44	10763.12	10762.11	-2.11	10765.23	10764.22
12210.56	12209.55	0.81	12209.75	12208.74	11515.73	11514.72	0.28	11515.45	11514.44

2 µM DG					CTRL				
m/z	M[Exp]	Rozdiel	m/z2	M[Exp]2	m/z	M[Exp]	Rozdiel	m/z2	M[Exp]2
4605.97	4604.96	0.83	4605.14	4604.13	4620.82	4619.81	0.73	4620.09	4619.08
4915.05	4914.04	2.54	4912.51	4911.5	4928.31	4927.3	0.52	4927.79	4926.78
5372.64	5371.63	-2.09	5374.73	5373.72	5472.88	5471.87	0.37	5472.51	5471.5
5541.19	5540.18	0.24	5540.95	5539.94	5593.95	5592.94	-0.18	5593.95	5592.94
5578.34	5577.33	-0.43	5578.77	5577.76	5752.39	5751.38	-0.98	5755.37	5754.36
5596.08	5595.07	2.13	5593.95	5592.94	5783.16	5782.15	-0.14	5783.3	5782.29
5753.43	5752.42	-1.94	5755.37	5754.36	5981.83	5980.82	-1.81	5983.64	5982.63
5784.84	5783.83	1.54	5783.3	5782.29	5997.85	5996.84	0.17	5997.68	5996.67
5984.22	5983.21	0.58	5983.64	5982.63	6024.2	6023.19	-0.73	6024.93	6023.92
5998.39	5997.38	0.71	5997.68	5996.67	6038.72	6037.71	2.64	6036.08	6035.07
6025.84	6024.83	0.91	6024.93	6023.92	6069.74	6068.73	-0.98	6070.72	6069.71
6070.97	6069.96	0.25	6070.72	6069.71	6166.85	6165.84	-1.21	6168.06	6167.05
6167.59	6166.58	-0.47	6168.06	6167.05	6295.97	6294.96	-0.99	6296.96	6295.95
6297.71	6296.7	0.75	6296.96	6295.95	6350.4	6349.39	-0.77	6351.17	6350.16
6683.88	6682.87	0.38	6683.5	6682.49	6787.85	6786.84	-0.57	6788.42	6787.41
6790.39	6789.38	1.97	6788.42	6787.41	6900.39	6899.38	0.7	6899.69	6898.68
6899.79	6898.78	0.1	6899.69	6898.68	7047.84	7046.83	-1.18	7050.02	7049.01
7071.71	7070.7	1.74	7069.97	7068.96	7067.51	7066.5	-2.46	7069.97	7068.96
7089.24	7088.23	1.83	7087.41	7086.4	7087.27	7086.26	-0.14	7087.41	7086.4
7142.81	7141.8	0.67	7142.14	7141.13	7176.95	7175.94	2.43	7174.52	7173.51
7197.79	7196.78	1.92	7195.87	7194.86	7496.57	7495.56	-0.66	7497.23	7496.22
7532.96	7531.95	2.27	7530.69	7529.68	7519.46	7518.45	2.1	7517.36	7516.35
7631.09	7630.08	-1.64	7632.73	7631.72	7532.41	7531.4	1.72	7530.69	7529.68
7650.96	7649.95	2.66	7648.3	7647.29	7631.19	7630.18	-1.54	7632.73	7631.72
7797.76	7796.75	1.83	7795.93	7794.92	7664.97	7663.96	-0.26	7665.23	7664.22
7813.96	7812.95	-2.97	7816.93	7815.92	7663.75	7662.74	-1.48	7665.23	7664.22
8330.99	8329.98	2.03	8328.96	8327.95	7827.96	7826.95	-0.89	7828.85	7827.84
9108.94	9107.93	1.13	9107.81	9106.8	8313.9	8312.89	2.15	8311.75	8310.74
9725.48	9724.47	1.55	9723.93	9722.92	8328.89	8327.88	-0.07	8328.96	8327.95
					8708.64	8707.63	-0.45	8709.09	8708.08
					9145.12	9144.11	0.57	9144.55	9143.54
					9723.17	9722.16	-0.76	9723.93	9722.92
					10763.12	10762.11	-2.11	10765.23	10764.22
					11515.73	11514.72	0.28	11515.45	11514.44

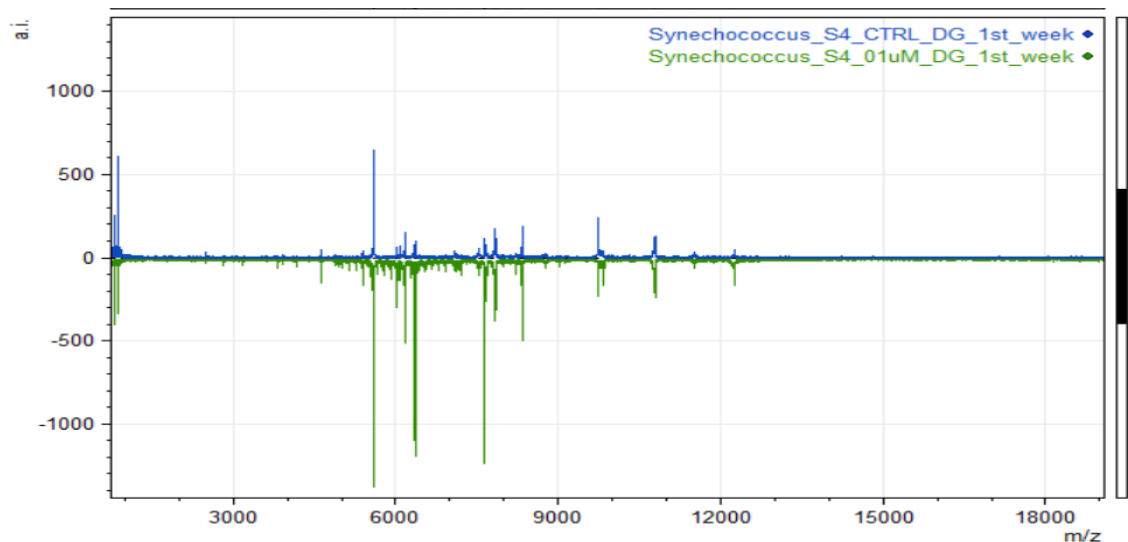
10 µM DG					CTRL				
m/z	M[Exp]	Rozdiel	m/z2	M[Exp]2	m/z	M[Exp]	Rozdiel	m/z2	M[Exp]2
4621.15	4620.14	1.06	4620.09	4619.08	4928.52	4927.51	0.73	4927.79	4926.78
5374.08	5373.07	-0.65	5374.73	5373.72	5391.87	5390.86	2.98	5388.89	5387.88
5473.9	5472.89	1.39	5472.51	5471.5	5473.9	5472.89	1.39	5472.51	5471.5
5541.58	5540.57	0.63	5540.95	5539.94	5563.98	5562.97	-0.15	5564.13	5563.12
5578.86	5577.85	0.09	5578.77	5577.76	5595.79	5594.78	1.84	5593.95	5592.94
5758.11	5757.1	2.74	5755.37	5754.36	5785.47	5784.46	2.17	5783.3	5782.29
5984.48	5983.47	0.84	5983.64	5982.63	5984.48	5983.47	0.84	5983.64	5982.63
5999.03	5998.02	1.35	5997.68	5996.67	6071.95	6070.94	1.23	6070.72	6069.71
6167.74	6166.73	-0.32	6168.06	6167.05	6287.66	6286.65	2.29	6285.37	6284.36
6357.18	6356.17	-1.74	6358.92	6357.91	6561.17	6560.16	-0.92	6562.09	6561.08
6683.92	6682.91	0.42	6683.5	6682.49	6789.27	6788.26	0.85	6788.42	6787.41
6890.3	6889.29	0.61	6899.69	6898.68	6900.3	6899.29	0.61	6899.69	6898.68
7089.47	7088.46	2.06	7087.41	7086.4	7126.1	7125.09	-2.29	7128.39	7127.38
7177.39	7176.38	1.87	7174.52	7173.51	7333.57	7332.56	2.88	7330.69	7329.68
7651.79	7650.78	-0.94	7652.73	7651.72	7650.96	7649.95	2.66	7648.3	7647.29
7797.76	7796.75	1.83	7795.93	7794.92	7813.96	7812.95	-2.97	7816.93	7815.92
7846.59	7845.58	1.7	7844.89	7843.88	8329.59	8328.58	0.63	8328.96	8327.95
8329.59	8328.58	0.63	8328.96	8327.95	8768.66	8767.65	-0.72	8769.38	8768.37
9108.7	9107.69	0.89	9107.81	9106.8	9108.7	9107.69	0.89	9107.81	9106.8
9763.54	9762.53	-0.48	9764.02	9763.01	10243.3	10242.29	1.59	10241.71	10240.7
11517.43	11516.42	1.98	11515.45	11514.44					

Obr. 16 Obrázok tabuliek s podobnými signálmi z tretieho týždňa kultivácie s 1 (38), 2 (38), 5 (33) a 10 (37) µM DG (zl'ava)

Vzorkám z tretieho týždňa sa síce priradilo viac proteínov ako z druhého, ale mali menej podobných signálov s referenciou (Obr. 16). Bolo priradených menej proteínov súvisiacich s fotosyntézou ako v ostatných týždňoch. V rozdielnych signáloch sa našlo viac súvisiacich s transláciou a väzbou DNA, napríklad „Translation initiation factor IF-1“, „Helix-turn-helix motif protein“ a „DNA-directed RNA polymerase subunit omega“. Ďalšou skupinou priradených proteínov boli transportné: „NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit L“ a „Proton-translocating NAD(P)(+) transhydrogenase“. V spektre s 10 µM bol aj proteín „Carbon dioxide concentrating mechanism/carboxysome shell protein“ fixujúci oxid uhličitý. Všetkým spektrám boli priradené proteíny „YcfA-like protein“ – s funkciou väzby mRNA, „Conserved hypothetical membrane protein“ – membránový komponent a „DUF2191 domain-containing protein“.

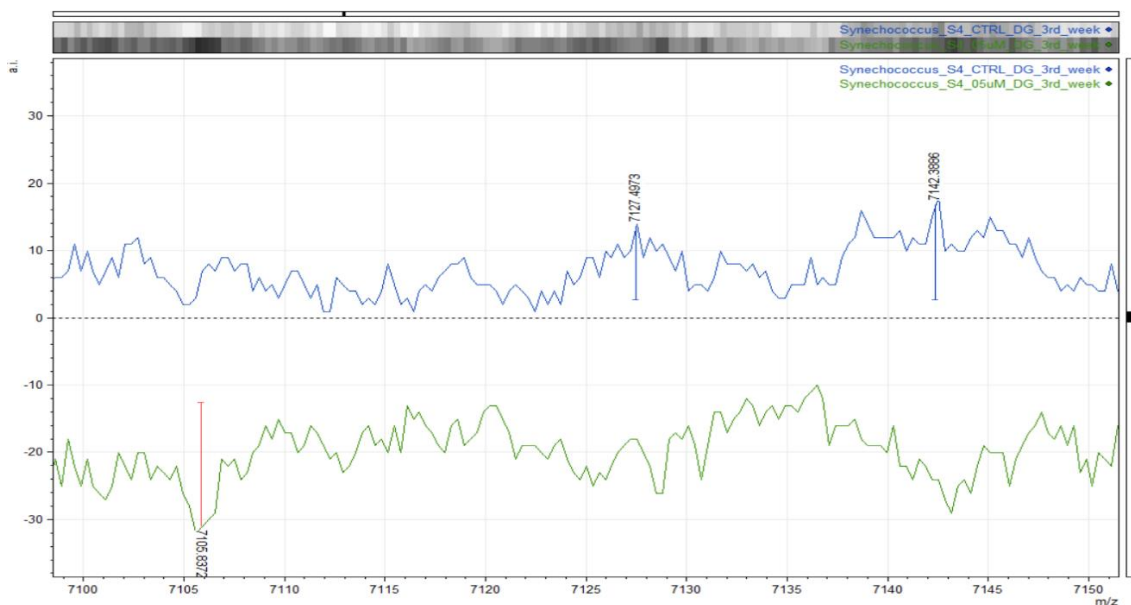
4.4.1.2 Porovnanie spektier a rozdielnych signálov pre DG

U spektier, ktoré vznikli z buniek kultivovaných s deoxyglukózou, prebehlo porovnanie tabuliek pre podobné a rozdielne signály v programe mMass. Vždy sa otvorili dve spektra naraz- referenčné a spektrum kultivované s nejakou koncentráciou DG počas troch týždňov. Každé bolo zobrazené inou farbou a jedno sa pomocou funkcie flip prevrátilo (Obr. 17).



Obr. 17 Zobrazenie dvoch spektier v programe mMass. Modrou farbou je referenčné spektrum pre prvý týždeň. Zelenou farbou je spektrum vzorky kultivovanej s 1 μM jeden týždeň.

Pomocou myšky je možné v mMass si spektrum približovať a posúvať podľa potreby. Hodnoty signálov, ktoré sa hľadali, boli z tabuliek s rozdielnymi signálmi (Tab. 6, Príloha *priradene_1-3w_DG_mMass.xlsx*). Pomocou nástroja „Label peak“ sa označuje pík vo vybranom spektre približne v čísle, ktoré sa hľadá (Obr. 18). Väčšina vybratých píkov sedela s tabuľkami a nenachádzala sa ďalej ako v rozmedzí $\pm 1,5$. Ak sa pík nachádzal až v intervale $\langle \pm 3, \pm 1,5 \rangle$, pridal sa do tabuľka za hodnotu znak „*“. V ojedinelých prípadoch sa stalo, že pík sa nevyskytoval v oblasti, kde sa hľadal. Išlo teda o šum a za hľadané číslo sa dal znak „+“.



Obr. 18 Porovnanie referenčného spektra so spektrom pre vzorku s 5 μM z tretieho týždňa. Modrou farbou je zobrazené referenčné spektrum, zelenou spektrum vzorky. Pomocou nástroja „Peak label“ sú označené píky pre rozdielne signály.

Tab. 6 Tabuľka rozdielnych signálov medzi kontrolou (CTRL) a spektrom 5 μM DG z tretieho týždňa. Znak „+“ značí šum, „*“ značí, že signál sa našiel v intervale $\langle \pm 3, \pm 1,5 \rangle$ od uvedeného čísla.

5 μM DG		CTRL	
m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)
3766.14	3765.13	3124.7	3123.69
4003.62	4002.61	4969.77	4968.76
4767.61	4766.6	4984.5	4983.49
4799.54	4798.53	4996.87	4995.86
5000.02	4999.01	5388.89	5387.88
5124.61	5123.6	6036.08 +	6035.07
5199.41	5198.4	6285.37	6284.36
5256.13	5255.12	6351.17 +	6350.16
5327.35	5326.34	6358.92 +	6357.91
5384.17	5383.16	6433.17 +	6432.16
5438.71	5437.7	6562.09	6561.08
5456.61	5455.6	6801.05	6800.04
5511.78	5510.77	6870.96	6869.95
5527.71 +	5526.7	7001.73	7000.72
5640.6	5639.59	7050.02	7049.01
5655.76	5654.75	7128.39	7127.38
5681.03	5680.02	7174.52	7173.51
5712.33	5711.32	7234.78	7233.77
5769.3	5768.29	7481.58 +	7480.57
5809.21	5808.2	7497.23	7496.22
5841.69	5840.68	7517.36	7516.35
5897.25	5896.24	7555.89 +	7554.88
5914.01	5913.0	7611.59 +	7610.58
5969.13 +	5968.12	7795.93 *	7794.92
6040.0	6038.99	7828.85*	7827.84
6059.8 +	6058.79	7844.89	7843.88
6098.05 +	6097.04	7952.07	7951.06
6137.38	6136.37	8017.22 *	8016.21
6152.9 *	6151.89	8179.22 *	8178.21
6207.45	6206.44	8205.01	8204.0
6225.49	6224.48	8311.75	8310.74
6281.37	6280.36	8320.0	8318.99
6346.31	6345.3	8677.01	8676.0
6374.97 +	6373.96	8709.09	8708.08
6410.13	6409.12	8769.38	8768.37
6426.4	6425.39	8828.71	8827.7
6554.82	6553.81	9085.52	9084.51
6566.54	6565.53	9130.0 *	9128.99
6739.76	6738.75	9144.55	9143.54
6812.49	6811.48	9171.11	9170.1

Tab. 6 Tabuľka rozdielnych signálov medzi kontrolou (CTRL) a spektrom 5 μM DG z tretieho týždňa. Znak „+“ značí šum, „*“ značí, že signál sa našiel v intervale $\langle \pm 3, \pm 1,5 \rangle$ od uvedeného čísla. (pokračovanie)

5 μM DG		CTRL	
m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)
6865.89 +	6864.88	9685.35*	9684.34
6884.96 *	6883.95	9734.04 +	9733.03
6923.78*	6922.77	9764.02	9763.01
6940.82	6939.81	9788.95 *	9787.94
7104.2	7103.19	9928.87	9927.86
7180.08	7179.07	9981.31	9980.3
7311.07	7310.06	10006.21	10005.2
7493.3 +	7492.29	10040.75	10039.74
7509.65 +	7508.64	10126.34	10125.33
7520.81	7519.8	10170.72	10169.71
7614.68 +	7613.67	10241.71	10240.7
7707.55	7706.54	10399.44	10398.43
7832.1	7831.09	10706.82 *	10705.81
7964.87	7963.86	10726.36 *	10725.35
9072.32	9071.31	10739.35	10738.34
9147.99	9146.98	10742.0 +	10740.99
9326.76 +	9325.75	10765.23 +	10764.22
9745.22 +	9744.21	10773.32 +	10772.31
9832.28	9831.27	10984.59	10983.58
10280.71	10279.7	11138.15	11137.14
10319.82 *	10318.81	11515.45	11514.44
10752.22 *	10751.21	12161.86	12160.85
10769.4*	10768.39	12180.29	12179.28
10781.63	10780.62	12209.75	12208.74
11518.48	11517.47	12227.28	12226.27
12023.83 *	12022.82	12245.54	12244.53
12670.78	12669.77	12284.22 *	12283.21

4.4.1.3 Kyselina fluóroctová (FAA)

Kyselina fluóroctová je chemická zlúčenina, o ktorej je známe, že vedie k inhibícii enzýmu akonitáza, a blokuje tak Krebsov a glyoxylátový cyklus. Spektrá vznikli taktiež referenčné a z buniek kultivovaných s koncentráciami 1, 2, 5 a 10 μM FAA počas troch týždňov.

Spektrám z prvého týždňa boli priradené hlavne proteíny súvisiacim s transkripciou: „Translation initiation factor IF-1“, „Predicted transcriptional regulator“, „IS3 family transposase“. Identifikovali sa aj „Molybdenum-pterin binding domain protein“, proteín pre transport iónov molybdenánu. Narozdiel od kontroly spektrá obsahovali aj „Nif11 domain-containing protein“. Prejavili sa proteíny so schopnosťou väzby kov-ión –

„Copper-binding metallochaperone“, „Ferredoxin“ a „Prokaryotic metallothionein-related protein“.

U spektra 10 µM FAA, ktoré malo najmenej podobných signálov, sa rozdielnym signálom (Obr. 19) priradil proteín „Ferrochelataze“ a redoxný enzým „Glutaredoxin domain family protein“. V rozdielných signáloch 1 µM FAA sa našli proteíny „HicB family“, „Cell division protein SepF“ (*m/z* 10775,65) a „Proton-translocating NAD(P)(+) transhydrogenase“ (proteín súvisjúci s translokázou). 2 µM sa priradil „Nitrogen regulatory protein P-II“ a „Copper chaperone“. 5 µM sa tiež priradil proteín „Cell division protein SepF“ pre *m/z* 10776,55 a „Proton-translocating NAD(P)(+) transhydrogenase“.

CTRL		1 µM FAA		CTRL		2 µM FAA		CTRL		5 µM FAA		CTRL		10 µM FAA	
<i>m/z</i>	M[Exp]	<i>m/z</i>	M[Exp]	<i>m/z</i>	M[Exp]	<i>m/z</i>	M[Exp]	<i>m/z</i>	M[Exp]	<i>m/z</i>	M[Exp]	<i>m/z</i>	M[Exp]	<i>m/z</i>	M[Exp]
3043.34	3042.33	4871.31	4870.3	3043.34	3042.33	3170.06	3169.05	3043.34	3042.33	3170.94	3169.93	3043.34	3042.33	4604.35	4603.34
3081.36	3080.35	4980.7	4979.69	3081.36	3080.35	3764.32	3763.31	3323.65	3322.64	3764.24	3763.23	3081.36	3080.35	4869.19	4868.18
3323.65	3322.64	4999.17	4998.16	3323.65	3322.64	3831.32	3830.31	3410.28	3409.27	4997.63	4996.62	3323.65	3322.64	4998.21	4997.2
3410.28	3409.27	5113.69	5112.68	3410.28	3409.27	4827.94	4826.93	3428.23	3427.22	5253.66	5252.65	3410.28	3409.27	5110.83	5109.82
3428.23	3427.22	5146.51	5145.5	3428.23	3427.22	4997.4	4996.39	3495.35	3494.34	5269.73	5268.72	3428.23	3427.22	5145.81	5144.8
3495.35	3494.34	5241.6	5240.59	3495.35	3494.34	5252.61	5251.6	3592.91	3591.9	5453.14	5452.13	3495.35	3494.34	5237.86	5236.85
3592.91	3591.9	5256.14	5255.13	3592.91	3591.9	5372.49	5371.48	3688.58	3687.57	5494.65	5493.64	3592.91	3591.9	5254.82	5253.81
3688.58	3687.57	5295.28	5294.27	3688.58	3687.57	5402.97	5401.96	3796.36	3795.35	5526.02	5525.01	3688.58	3687.57	5271.68	5270.67
3796.36	3795.35	5498.33	5497.32	3796.36	3795.35	5525.34	5524.33	3912.72	3911.71	5618.79	5617.78	3796.36	3795.35	5399.0	5397.99
3815.06	3814.05	5533.54	5532.53	3912.72	3911.71	5620.82	5619.81	4161.3	4160.29	5655.08	5654.07	3815.06	3814.05	5497.04	5496.03
3912.72	3911.71	5624.68	5623.67	4161.3	4160.29	5694.43	5693.42	4367.44	4366.43	5693.87	5692.86	3912.72	3911.71	5526.59	5525.58
4161.3	4160.29	5658.66	5657.65	4367.44	4366.43	5709.69	5708.68	4379.55	4378.54	5709.64	5708.63	4161.3	4160.29	5623.33	5622.32
4367.44	4366.43	5681.35	5680.34	4379.55	4378.54	5737.61	5736.6	4660.23	4659.22	5782.83	5781.82	4367.44	4366.43	5655.45	5654.44
4379.55	4378.54	5768.6	5767.59	4660.23	4659.22	5766.98	5765.97	4879.73	4878.72	5879.67	5878.66	4379.55	4378.54	5695.09	5694.08
4660.23	4659.22	5788.97	5787.96	4879.73	4878.72	5782.01	5781.0	4901.55	4900.54	5911.09	5910.08	4660.23	4659.22	5711.76	5710.75
4879.73	4878.72	5809.48	5808.47	4901.55	4900.54	5821.44	5820.43	4945.52	4944.51	5966.02	5965.01	4879.73	4878.72	5737.58	5736.57
4901.55	4900.54	5881.57	5880.56	4945.52	4944.51	5879.24	5878.23	5477.9	5476.89	5983.81	5982.8	4879.73	4878.72	5767.2	5766.19
4945.52	4944.51	5915.79	5914.78	5125.65	5124.64	5965.23	5964.22	6228.8	6227.79	6039.46	6038.45	4901.55	4900.54	5784.5	5783.49
5477.9	5476.89	5938.24	5937.23	5369.28	5368.27	6008.14	6007.13	6386.06	6385.05	6052.94	6051.93	4913.35	4912.34	5865.7	5864.69
5763.96	5762.95	6102.46	6101.45	5477.9	5476.89	6095.29	6094.28	6685.72	6684.71	6094.07	6093.06	4945.52	4944.51	5880.63	5879.62
5841.03	5840.02	6192.62	6191.61	5763.96	5762.95	6134.48	6133.47	7084.33	7083.32	6205.1	6204.09	5477.9	5476.89	5911.97	5910.96
6228.8	6227.79	6211.96	6210.95	6138.45	6137.44	6223.75	6222.74	7499.54	7498.53	6223.31	6222.3	5763.96	5762.95	5968.34	5967.33
6386.06	6385.05	6264.64	6263.63	6228.8	6227.79	6277.89	6276.88	7516.12	7515.11	6263.94	6262.93	5841.03	5840.02	6039.73	6038.72
6536.49	6535.48	6282.21	6281.2	6386.06	6385.05	6295.18	6294.17	7647.31	7646.3	6278.61	6277.6	6228.8	6227.79	6094.18	6093.17
6788.32	6787.31	6295.52	6294.51	6685.72	6684.71	6330.32	6329.31	7746.35	7745.34	6295.23	6294.22	6386.06	6385.05	6206.38	6205.37
7516.12	7515.11	6378.7	6377.69	7746.35	7745.34	6368.43	6367.42	7813.88	7812.87	6329.92	6328.91	7084.33	7083.32	6223.45	6222.44
7647.31	7646.3	6393.15	6392.14	7813.88	7812.87	6423.53	6422.52	8208.72	8207.71	6390.19	6389.18	7141.24	7140.23	6265.76	6264.75
7746.35	7745.34	6448.17	6447.16	8208.72	8207.71	6466.37	6465.36	8312.07	8311.06	6424.2	6423.19	7499.54	7498.53	6280.25	6279.24
7803.87	7802.86	6483.46	6482.45	8312.07	8311.06	6479.93	6478.92	8765.59	8764.58	6464.37	6463.36	7516.12	7515.11	6297.41	6296.4
8765.59	8764.58	6521.92	6520.91	8765.59	8764.58	6497.16	6496.15	8990.76	8989.75	6478.66	6477.65	7746.35	7745.34	6333.32	6332.31
8990.76	8989.75	6540.24	6539.23	8990.76	8989.75	6507.49	6506.48	9011.04	9010.03	6521.08	6520.07	7803.87	7802.86	6391.63	6390.62
9435.55	9434.54	6580.72	6579.71	9011.04	9010.03	6551.24	6550.23	9435.55	9434.54	6551.89	6550.88	7813.88	7812.87	6481.65	6480.64
9508.25	9507.24	6665.3	6664.29	9435.55	9434.54	6665.99	6664.98	9508.25	9507.24	6607.33	6606.32	7829.04	7828.03	6511.8	6510.79
9762.55	9761.54	6784.76	6783.75	9508.25	9507.24	6680.41	6679.4	9762.55	9761.54	6647.7	6646.69	8312.07	8311.06	6521.24	6520.23
9816.56	9815.55	6793.25	6792.24	9762.55	9761.54	6779.5	6778.49	9816.56	9815.55	6663.61	6662.6	8765.59	8764.58	6553.25	6552.24
9852.53	9851.52	6898.76	6897.75	9816.56	9815.55	6861.19	6860.18	9852.53	9851.52	6681.87	6680.86	8990.76	8989.75	6594.02	6593.01
9890.94	9889.93	6922.87	6921.86	9852.53	9851.52	6896.98	6895.97	9890.94	9889.93	6691.44	6690.43	9011.04	9010.03	6648.48	6647.47
9950.54	9949.53	7039.27	7038.26	9890.94	9889.93	6922.57	6921.56	9950.54	9949.53	6807.69	6806.68	9435.55	9434.54	6664.45	6663.44
10049.02	10048.01	7099.18	7098.17	9950.54	9949.53	6993.19	6992.18	10049.02	10048.01	6897.57	6896.56	9508.25	9507.24	6809.81	6808.8
10219.57	10218.56	7120.8	7119.79	10049.02	10048.01	7065.57	7064.56	10219.57	10218.56	6919.78	6918.77	9762.55	9761.54	6921.66	6920.65
10318.99	10317.98	7176.82	7175.81	10219.57	10218.56	7177.37	7176.36	10318.99	10317.98	6938.94	6937.93	9816.56	9815.55	6921.3	6920.29
10780.1	10779.09	7306.04	7305.03	10318.99	10317.98	7192.29	7191.28	10780.1	10779.09	7048.76	7047.75	9852.53	9851.52	7046.89	7045.88
11104.73	11103.72	7519.71	7518.7	10780.1	10779.09	7305.25	7304.24	11104.73	11103.72	7087.52	7086.51	9890.94	9889.93	7070.28	7069.27
11426.86	11425.85	7755.6	7754.59	11104.73	11103.72	7443.93	7442.92	11426.86	11425.85	7177.3	7176.29	9950.54	9949.53	7087.83	7086.82
11641.83	11640.82	7779.32	7778.31	11426.86	11425.85	7482.71	7481.7	11641.83	11640.82	7194.14	7193.13	10049.02	10048.01	7144.27	7143.26
11713.99	11712.98	7796.76	7795.75	11514.97	11513.96	7519.73	7518.72	11713.99	11712.98	7303.88	7302.87	10219.57	10218.56	7176.76	7175.75
11760.03	11759.02	8576.96	8575.95	11641.83	11640.82	7554.77	7553.76	11760.03	11759.02	7431.61	7430.6	10318.99	10317.98	7193.32	7192.31
11850.47	11849.46	8762.46	8761.45	11713.99	11712.98	7597.63	7596.62	11850.47	11849.46	7506.64	7505.63	10745.84	10744.83	7291.52	7290.51
12074.49	12073.48	9706.63	9705.62	11760.03	11759.02	7613.7	7612.69	12074.49	12073.48	7519.73	7518.72	10763.88	10762.87	7305.32	7304.31
12101.39	12100.38	9736.4	9735.39	11850.47	11849.46	7704.15	7703.14	12101.39	12100.38	7614.35	7613.34	10780.1	10779.09	7434.28	7433.27
12177.21	12176.2	9759.24	9758.23	12074.49	12073.48	7817.21	7816.2	12177.21	12176.2	7688.95	7687.94	11104.73	11103.72	7504.33	7503.32
12842.52	12841.51	9776.22	9775.21	12101.39	12100.38	8710.87	8709.86	12842.52	12841.51	7820.55	7819.54	11426.86	11425.85	7506.64	7505.63
13301.33	13300.32	9793.26	9792.25	12177.21	12176.2	9015.62	9014.61	13301.33	13300.32	7948.45	7947.44	11641.83	11640.82	7521.0	7520.0
13416.05	13415.04	10775.65	10774.64	12242.22	12241.21	10197.92	10196.91	13416.05	13415.04	7963.88	7962.87	11713.99	11712.98	7613.48	7612.47
13761.72	13760.71	12181.35	12180.34	12842.52	12841.51	10508.52	10507.51	13761.72	13760.71	8575.67	8574.66	11760.03	11759.02	7820.55	7819.54
14405.88	14404.87	12206.49	12205.48	13301.33	13300.32	10730.91	10729.9	14405.88	14404.87	8713.04	8712.03	11850.47	11849.46	7832.29	7831.28
14774.44	14773.43			13416.05	13415.04	10754.22	10753.21	14774.44	14773.43	9014.81	9013.8	12074.49	12073.48	7965.62	7964.61
				13761.72	13760.71	11447.73	11446.72	14405.88	14404.87	10776.55	10775.54	12101.39	12100.38	8315.51	8314.5
				14405.88	14404.87	12208.24	12207.23	14774.44	14773.43	12246.27	12245.26	12177.21	12176.2	8711.24	8710.23
				14774.44	14773.43	12247.59	12246.58					12242.22	12241.21</		

Druhý týždeň sa kontrole priradil „Antitoxin“ a „Cell division protein SepF“, ktoré sa však neobjavili vo vzorkách inkubovaných s inhibítormi. Tie obsahovali okrem „Uncharacterized protein“ hlavne proteíny s molekulárnou funkciou väzby DNA („Nucleoid-associated protein MITS9508_00776“, „Phage_integrase-like“) a nukleových kyselín a RNA („RNA-binding protein“, „YcfA-like protein“, „Ribosome-associated protein“).

Kontrole sa priradili dva ribozomálne proteíny „50S ribosomal protein L34“, ktorý sa priradil aj v podobných signáloch (Obr. 20) 2 μM a „50S ribosomal protein L32“, ktorý sa priradil aj spektru pre 5 μM FAA. Ostatným spektrám sa priradili 1 až 2 iné ribozomálne proteíny (rozdielne signály). Rozdielnym signálom pre 1 μM FAA sa priradil proteín pôsobiaci počas „de novo“ UMP procese biosyntézy – „Orotidine 5'-phosphate decarboxylase“ a spektru pre 10 μM FAA „10 kDa chaperonin“. Spektrá obsahovali aj proteíny súvisiace s väzbou ión-kov. U kontroly sa nenašli, ale rozdielnym signálom vzoriek boli priradené napríklad „Ferredoxin“, „Prokaryotic metallothionein-related protein“ a „Copper chaperone“. Najviac podobných signálov s kontrolou malo spektrum 5 μM FAA (Obr. 20), ale išlo hlavne o m/z s priradenými „Uncharacterized protein“.

1 μM FAA					CTRL				
m/z	MI[Exp]	Rozdiel	m/z	MI[Exp]	m/z	MI[Exp]	Rozdiel	m/z	MI[Exp]
4606.07	4605.06	0.97	4605.1	4604.09	4604.48	4603.47	-0.62	4605.1	4604.09
4620.16	4619.15	-1.59	4621.75	4620.74	4620.17	4619.16	-1.58	4621.75	4620.74
4860.6	4859.59	-2.77	4863.37	4862.36	4827.52	4826.51	-0.88	4828.4	4827.39
4927.66	4926.65	-0.74	4928.4	4927.39	4998.21	4997.7	-0.2	4997.41	4996.4
4979.97	4978.96	-2.74	4977.23	4976.22	5125.67	5124.66	-2.83	5128.5	5127.48
4997.92	4996.91	-2.49	5000.41	4999.4	5254.91	5253.9	-0.73	5254.18	5253.17
5387.92	5386.91	-2.49	5385.43	5384.42	5383.04	5382.03	-2.39	5385.43	5384.42
5471.81	5470.8	-0.25	5472.06	5471.05	5471.71	5470.7	-0.35	5472.06	5471.05
5508.26	5507.25	-2.01	5510.27	5509.26	5511.36	5510.35	-1.09	5510.27	5509.26
5539.2	5538.19	-1.84	5541.04	5540.03	5527.65	5526.64	-0.38	5528.03	5527.02
5562.34	5561.33	-1.59	5563.93	5562.92	5539.85	5538.84	-1.19	5541.04	5540.03
5577.43	5576.42	-1.21	5578.64	5577.63	5550.35	5549.34	-0.44	5550.79	5549.78
5594.1	5593.09	-2.07	5596.17	5595.16	5562.61	5561.6	-1.32	5563.93	5562.92
5754.64	5753.63	-2.56	5752.08	5751.07	5577.87	5576.86	-0.77	5578.64	5577.63
5768.15	5767.14	-1.84	5766.31	5765.3	5595.27	5594.26	-0.9	5596.17	5595.16
5896.76	5895.75	-0.73	5896.03	5895.02	5623.89	5622.88	-1.79	5622.1	5621.09
5897.81	5896.8	-1.7	5896.51	5895.5	5639.19	5638.18	-1.16	5638.03	5637.02
6024.55	6023.54	-2.2	6026.75	6025.74	5738.36	5737.35	-1.82	5736.54	5735.53
6041.23	6040.22	-0.08	6041.31	6040.3	5753.57	5752.56	-1.49	5752.08	5751.07
6070.04	6069.03	-2.49	6072.53	6071.52	5767.14	5766.13	-0.83	5766.31	5765.3
6151.12	6150.11	-0.51	6151.63	6150.62	5783.75	5782.74	-2.91	5786.66	5785.65
6165.71	6164.7	-1.48	6167.19	6166.18	5895.7	5894.69	-0.33	5896.03	5895.02
6347.79	6346.78	-2.67	6345.12	6344.11	5911.8	5910.79	-2.25	5914.05	5913.04
6897.43	6896.42	-2.79	6900.22	6899.21	5936.88	5935.87	-1.83	5935.05	5934.04
7072.88	7071.88	-2.85	7073.04	7072.03	5966.45	5965.44	-0.64	5967.09	5966.08
7086.87	7085.86	-0.41	7087.28	7086.27	5987.64	5986.63	-1.87	5989.51	5988.5
7176.52	7175.51	-2.53	7179.05	7178.04	6025.13	6024.12	-1.62	6026.75	6025.74
7195.15	7194.14	-0.21	7195.36	7194.35	6038.33	6037.32	-2.98	6041.31	6040.3
7531.86	7530.85	-2.04	7533.9	7532.89	6069.99	6068.98	-2.54	6072.53	6071.52
7631.22	7630.21	-1.19	7632.41	7631.4	6135.73	6134.72	-2.89	6138.62	6137.61
7663.26	7662.25	-1.47	7664.73	7663.72	6151.68	6150.67	-0.05	6151.63	6150.62
7829.26	7828.25	-2.12	7831.38	7830.37	6166.83	6165.82	-0.56	6167.19	6166.18
8327.92	8326.91	-3.25	8326.67	8325.66	6280.26	6279.25	-2.05	6278.21	6277.2
8766.02	8765.01	-0.39	8765.63	8764.62	6296.42	6295.41	-0.97	6297.39	6296.38
9011.73	9010.72	-0.81	9012.54	9011.53	6321.23	6320.22	-1.99	6319.24	6318.23
9135.3	9134.29	-1.04	9134.26	9133.25	6345.93	6344.92	-0.81	6345.12	6344.11
9723.26	9722.25	-0.02	9723.24	9722.23	6465.19	6464.18	-2.6	6462.79	6461.78
9736.45	9735.44	0.0	9736.45	9735.44	6481.47	6480.46	-2.46	6483.93	6482.92
9830.32	9829.31	0.0	9830.32	9829.31	6536.14	6535.13	-0.82	6535.32	6534.31
10763.97	10762.96	0.0	10763.97	10762.96	6553.57	6552.56	-1.73	6551.84	6550.83
10774.48	10773.47	-1.24	10775.71	10774.7	6791.18	6790.17	-1.89	6793.07	6792.06

2 μM FAA					CTRL				
m/z	MI[Exp]	Rozdiel	m/z	MI[Exp]	m/z	MI[Exp]	Rozdiel	m/z	MI[Exp]
4604.48	4603.47	-0.62	4605.1	4604.09	4605.31	4604.3	-0.21	4605.1	4604.09
4619.89	4618.88	-1.86	4621.75	4620.74	4619.89	4618.88	-1.86	4621.75	4620.74
4927.52	4926.51	-0.88	4928.4	4927.39	4927.6	4926.59	-0.2	4928.4	4927.39
4978.21	4977.7	-0.17	4978.41	4977.4	4978.21	4977.7	-0.17	4978.41	4977.4
4999.88	4998.87	-0.53	5000.41	4999.4	4999.88	4998.87	-0.53	5000.41	4999.4
5113.35	5112.34	-2.95	5110.4	5109.39	5113.35	5112.34	-2.95	5110.4	5109.39
5127.28	5126.27	-1.22	5128.5	5127.48	5127.28	5126.27	-1.22	5128.5	5127.48
5255.85	5254.84	-1.67	5254.18	5253.17	5255.85	5254.84	-1.67	5254.18	5253.17
5385.21	5384.2	-0.22	5385.43	5384.42	5385.21	5384.2	-0.22	5385.43	5384.42
5471.06	5470.05	-0.98	5472.06	5471.05	5471.06	5470.05	-0.98	5472.06	5471.05
5511.65	5510.64	-1.38	5510.27	5509.26	5511.65	5510.64	-1.38	5510.27	5509.26
5527.1	5526.09	-0.93	5528.03	5527.02	5527.1	5526.09	-0.93	5528.03	5527.02
5539.19	5538.18	-1.85	5541.04	5540.03	5539.19	5538.18	-1.85	5541.04	5540.03
5550.16	5549.15	-0.63	5550.79	5549.78	5550.16	5549.15	-0.63	5550.79	5549.78
5572.79	5571.78	-1.14	5573.64	5572.63	5572.79	5571.78	-1.14	5573.64	5572.63
5577.45	5576.44	-1.19	5578.64	5577.63	5577.45	5576.44	-1.19	5578.64	5577.63
5595.03	5594.02	-1.14	5596.17	5595.16	5595.03	5594.02	-1.14	5596.17	5595.16
5622.73	5621.72	-0.63	5622.1	5621.09	5622.73	5621.72	-0.63	5622.1	5621.09
5639.56	5638.55	-2.57	5638.03	5637.02	5639.56	5638.55	-2.57	5638.03	5637.02
5658.08	5657.07	-1.06	5659.14	5658.13	5658.08	5657.07	-1.06	5659.14	5658.13
5752.66	5751.65	-0.58	5752.08	5751.07	5752.66	5751.65	-0.58	5752.08	5751.07
5767.75	5766.74	-2.44	5766.31	5765.3	5767.75	5766.74	-2.44	5766.31	5765.3
5895.53	5894.52	-1.13	5896.66	5895.65	5895.53	5894.52	-1.13	5896.66	5895.65
5898.12	5897.11	-2.09	5896.03	5895.02	5898.12	5897.11	-2.09	5896.03	5895.02
5911.14	5910.13	-2.91	5914.05	5913.04	5911.14	5910.13	-2.91	5914.05	5913.04
5969.91	5968.89	-2.82	5967.09	5966.08	5969.91	5968.89	-2.82	5967.09	5966.08
5995.99	5994.98	-2.52	5999.51	5998.5	5995.99	5994.98	-2.52	5999.51	5998.5
6026.13	6025.12	-0.62	6026.75	6025.74	6026.13	6025.12	-0.62	6026.75	6025.74
6038.33	6037.32	-2.68	6041.31	6040.3	6038.33	6037.32	-2.68	6041.31	6040.3
6066.78	6065.77	-2.75	6072.53	6071.52	6066.78	6065.77	-2.75	6072.53	6071.52
6136.95	6135.94	-1.67	6138.62	6137.61	6136.95	6135.94	-1.67	6138.62	6137.61
6153.55	6152.54	-1.92	6151.63	6150.62	6153.55	6152.54	-1.92	6151.63	6150.62
6165.43	6164.42	-1.76	6167.19	6166.18	6165.43	6164.42	-1.76	6167.19	6166.18
6279.49	6278.48	-1.28	6278.21	6277.2	6279.49	6278.48	-1.28	6278.21	6277.2
6298.56	6297.55	-1.17	6297.39	6296.38	6298.56	6297.55	-1.17	6297.39	6296.38
6345.79	6344.78	-0.67	6345.12	6344.11	6345.79	6344.78	-0.67	6345.12	6344.11
6425.73	6424.72	-0.99	6426.72	6425.71	6425.73	6424.72	-0.99	6426.72	6425.71
6483.25	6482.24	-0.68	6483.93	6482.92	6483.25	6482.24	-0.68	6483.93	6482.92
6537.94	6536.93	-2.62	6535.32	6534.31	6537.94	6536.93	-2.62	6535.32	6534.31
6553.57	6552.56	-1.73	6551.84	6550.83	6553.57	6552.56	-1.73	6551.84	6550.83
6791.18	6790.17	-1.89	6793.07	6792.06	6791.18	6790.17	-1.89	6793.07	6792.06
6898.06	6897.05	-2.16	6900.22	6899.21	6898.06	6897.05	-2.16	6900.22	6899.21
6923.47	6922.46	-1.82	6925.29	6924.28	6923.47	6922.46	-1.82	6925.29	6924.28
7070.65	7069.64	-0.61	7070.04	7069.03	7070.65	7069.64	-0.61	7070.04	7069.03
7086.86	7085.85	-0.42	7087.28	7086.27	7086.86	7085.85	-0.42	7087.28	7086.27
7177.88	7176.87	-1.17	7179.05	7178.04	7177.88	7176.87	-1.17	7179.05	7178.04
7532.12	7531.11	-1.78	7533.9	7532.89	7532.12	7531.11	-1.78	7533.9	7532.89
7629.76	7628.75	-2.65	7632.41	7631.4	7629.76	7628.75	-2.65	7632.41	7631.4
7662.8	7661.79	-1.93	7664.73	7663.72	7662.8	7661.79	-1.93	7664.73	7663.72
7829.87	7828.86	-1.51	7831.38	7830.37	7829.87	7828.86	-1.51	7831.38	7830.37
8015.06	8014.05	-0.52	8015.63	8014.62	8015.06	8014.05	-0.52	8015.63	8014.62
9723.55	9722.54	-0.31	9723.24	9722.23	9723.55	9722.54	-0.31	9723.24	9722.23
9829.96	9828.95	-0.36	9830.32	9829.31	9829.96	9828.95	-0.36	9830.32	9829.31
10763.97	10762.96	0.0	10763.97	10762.96	10763.97	10762.96	0.0	10763.97	10762.96
10775.49	10774.48	-0.23	10775.71	10774.7	10775.49	10774.48	-0.23	10775.71	10774.7
11514.43	11513.42	-2.69	11517.12	11516.11	11514.43	11513.42	-2.69	11517.	

Spektrá z tretieho týždňa inkubácie s inhibítorom mali so svojou kontrolou spoločný aspoň jeden ribozomálny proteín. Nebol im priradený však ani jeden z proteínov podieľajúcich sa na rozdelení jednej bunky do dvoch dcérskych, ktoré sa objavili v kontrole („Cell division protein SepF“, „Cell division topological specificity factor“). Tak ako stúpala koncentrácia, pribúdali v spektrách vzoriek rozdielne signály (Obr. 21), v ktorých sa identifikovali fotosyntetické proteíny. Patria sem proteíny „Protein PsbN“, „Photosystem II reaction center protein Z“ a „Photosystem II q(B) protein (Fragment)“.

Počet podobných signálov s referenciou bol približne rovnaký, aj keď jemne klesal so zväčšujúcou sa koncentráciou FAA. Rozdielnym signálom pre spektrum s 1 μM FAA sa priradil napríklad proteín „Antitoxin“, pre 5 μM FAA „Ferrochelataz“ a pre 10 μM FAA „CsbD domain-containing protein“.

CTRL		1 μM FAA		CTRL		2 μM FAA		CTRL		5 μM FAA		CTRL		10 μM FAA	
m/z	M[Exp]	m/z	M[Exp]	m/z	M[Exp]	m/z	M[Exp]	m/z	M[Exp]	m/z	M[Exp]	m/z	M[Exp]	m/z	M[Exp]
4382.35	4381.34	3123.49	3122.48	4041.98	4040.97	3480.29	3479.28	3764.4	3763.39	3812.2	3811.19	4041.98	4040.97	4041.98	4040.97
5156.81	5155.8	3211.46	3210.45	4382.35	4381.34	3874.73	3873.72	4041.98	4040.97	3872.13	3871.12	4382.35	4381.34	3466.65	3465.64
5438.25	5437.24	3815.04	3814.03	5156.81	5155.8	4001.42	4000.41	4382.35	4381.34	4000.44	3999.43	5156.81	5155.8	3871.89	3870.88
5513.74	5512.73	3873.32	3872.31	5258.28	5257.27	4311.29	4310.28	5156.81	5155.8	4797.96	4796.95	5258.28	5257.27	4242.28	4241.27
5525.3	5524.29	4001.99	4000.98	5381.66	5380.65	4419.98	4418.97	5258.28	5257.27	4913.3	4912.29	5372.54	5371.53	4606.97	4605.96
5547.83	5546.82	4020.79	4019.78	5438.25	5437.24	4452.7	4451.69	5372.54	5371.53	4996.57	4995.56	5438.25	5437.24	4766.39	4765.38
5755.43	5754.42	4585.18	4584.17	5513.74	5512.73	4605.65	4604.64	5513.74	5512.73	5125.35	5124.34	5547.83	5546.82	4893.88	4892.87
5948.86	5947.85	4604.24	4604.23	5547.83	5546.82	4759.96	4758.95	5547.83	5546.82	5143.63	5142.62	5948.86	5947.85	4914.24	4913.23
6010.4	6009.39	4640.43	4639.42	5755.43	5754.42	4796.96	4795.95	5755.43	5754.42	5198.06	5197.05	6027.24	6026.23	4977.66	4976.65
6110.1	6109.09	4765.89	4764.88	5948.86	5947.85	4912.83	4911.82	5948.86	5947.85	5254.0	5252.99	6110.1	6109.09	4997.18	4996.17
6119.15	6118.14	4913.21	4912.2	6010.4	6009.39	4998.06	4997.05	6119.15	6118.14	5270.25	5269.24	6119.15	6118.14	5069.21	5068.2
6324.68	6323.67	4913.21	4912.2	6027.24	6026.23	5121.12	5120.11	6149.52	6148.51	5326.56	5325.55	6324.68	6323.67	5127.6	5126.59
6368.0	6366.99	4999.42	4998.41	6324.68	6323.67	5196.68	5195.67	6324.68	6323.67	5342.27	5341.26	6368.0	6366.99	5199.7	5198.69
6404.26	6403.25	5041.19	5040.18	6368.0	6366.99	5253.9	5252.89	6404.26	6403.25	5397.55	5396.54	6404.26	6403.25	5224.37	5223.36
6423.6	6422.59	5098.35	5097.34	6503.72	6502.71	5312.39	5311.38	6503.72	6502.71	5421.32	5420.31	6423.6	6422.59	5255.13	5254.12
6479.98	6478.97	5127.69	5126.68	6562.92	6561.91	5327.68	5326.67	6562.92	6561.91	5453.95	5452.94	6503.72	6502.71	5270.35	5269.34
6503.72	6502.71	5153.27	5152.26	6607.87	6606.86	5342.65	5341.64	6721.69	6720.68	5470.66	5469.65	6551.37	6550.36	5327.29	5326.28
6551.37	6550.36	5163.95	5162.94	6721.69	6720.68	5359.25	5358.24	7068.61	7067.6	5509.51	5508.5	6562.92	6561.91	5365.47	5364.46
6562.92	6561.91	5169.26	5168.25	6938.33	6937.32	5455.56	5454.55	7177.03	7176.02	5620.43	5619.42	6607.87	6606.86	5465.4	5464.39
6607.87	6606.86	5325.72	5324.71	7068.61	7067.6	5471.38	5470.37	7305.72	7304.71	5655.33	5654.32	6721.69	6720.68	5496.85	5495.84
6721.69	6720.68	5453.81	5452.8	7305.72	7304.71	5509.69	5508.68	7465.62	7464.61	5711.26	5710.25	6938.33	6937.32	5619.21	5618.2
7465.62	7464.61	5470.47	5469.46	7465.62	7464.61	5653.36	5652.35	7483.91	7482.9	5727.78	5726.77	7068.61	7067.6	5710.29	5709.28
7483.91	7482.9	5510.7	5509.69	7483.91	7482.9	5710.79	5709.78	7502.67	7501.66	5752.14	5751.13	7177.03	7176.02	5738.99	5737.98
7568.31	7567.3	5842.76	5841.75	7568.31	7567.3	5751.13	5750.12	7568.31	7567.3	5806.37	5805.36	7305.72	7304.71	5837.32	5836.31
7738.96	7737.95	5983.74	5982.73	7650.5	7649.49	5821.88	5820.87	7650.5	7649.49	5822.7	5821.69	7465.62	7464.61	5911.29	5910.28
7819.79	7818.78	6205.42	6204.41	7706.43	7705.42	5840.15	5839.14	7706.43	7705.42	5838.8	5837.79	7483.91	7482.9	5966.69	5965.68
7961.8	7960.79	6330.45	6329.44	7738.96	7737.95	5909.97	5908.96	7738.96	7737.95	5854.33	5853.32	7568.31	7567.3	5984.11	5983.1
8314.67	8313.66	6522.36	6521.35	7819.79	7818.78	5966.58	5965.57	7819.79	7818.78	5911.91	5910.9	7611.61	7611.6	6021.93	6020.92
8326.61	8325.6	6537.04	6536.03	7828.06	7827.05	5982.34	5981.33	7828.06	7827.05	5953.33	5952.32	7706.43	7705.42	6095.32	6094.31
8576.68	8575.67	6555.04	6554.03	8314.67	8313.66	5983.93	5982.92	8314.67	8313.66	5967.69	5966.68	7738.96	7737.95	6116.06	6115.05
8706.06	8705.05	6683.09	6682.08	8326.61	8325.6	6007.32	6006.31	8326.61	8325.6	5981.34	5980.33	7961.8	7960.79	6123.08	6122.07
9013.85	9012.84	6864.99	6863.98	8576.68	8575.67	6024.15	6023.14	8576.68	8575.67	5983.93	5982.92	8314.67	8313.66	6156.9	6155.89
9144.39	9143.38	6919.62	6918.61	9056.68	9055.67	6095.72	6094.71	9056.68	9055.67	6095.26	6094.25	8326.61	8325.6	6221.88	6220.87
9179.36	9178.35	7358.06	7357.05	9144.39	9143.38	6207.55	6206.54	9056.68	9055.67	6152.59	6151.58	8706.06	8705.05	6335.46	6334.45
9197.47	9196.46	7575.47	7574.46	9197.47	9196.46	6224.15	6223.14	9144.39	9143.38	6154.49	6153.48	9013.85	9012.84	6408.56	6407.55
9761.78	9760.77	7592.56	7591.55	9761.78	9760.77	6328.66	6327.65	9179.36	9178.35	6189.24	6188.23	9056.68	9055.67	6465.26	6464.25
9786.47	9785.46	7945.83	7944.82	9786.47	9785.46	6360.52	6359.51	9197.47	9196.46	6208.37	6207.36	9144.39	9143.38	6523.93	6522.92
9811.71	9810.7	7965.28	7964.27	9811.71	9810.7	6382.35	6381.34	9726.43	9725.42	6222.76	6221.75	9179.36	9178.35	6538.2	6537.19
10303.74	10302.73	8207.04	8206.03	10303.74	10302.73	6356.93	6355.92	9761.78	9760.77	6238.23	6237.22	9197.47	9196.46	6554.43	6553.42
10316.8	10315.79	8329.98	8328.97	10316.8	10315.79	6663.0	6661.99	9786.47	9785.46	6328.71	6327.7	9761.78	9760.77	6638.01	6637.0
10499.67	10498.66	8681.77	8680.76	10499.67	10498.66	6682.0	6680.99	9811.71	9810.7	6408.55	6407.54	9786.47	9785.46	6665.46	6664.45
10732.88	10731.87	8714.28	8713.27	10732.88	10731.87	6934.29	6933.28	10303.74	10302.73	6496.01	6495.0	9811.71	9810.7	6685.01	6684.0
10777.31	10776.3	9072.51	9071.5	10777.31	10776.3	7475.05	7474.04	10316.8	10315.79	6520.14	6519.13	9830.9	9829.89	6705.21	6704.2
10876.87	10875.86	9109.79	9108.78	10876.87	10875.86	7477.41	7476.4	10499.67	10498.66	6535.43	6534.42	10303.74	10302.73	6922.24	6921.23
10960.42	10959.41	9132.92	9131.91	10960.42	10959.41	7490.47	7489.46	10732.88	10731.87	6567.25	6566.24	10316.8	10315.79	6993.79	6992.78
11130.63	11129.62	9147.78	9146.77	11130.63	11129.62	7645.26	7644.25	10777.31	10776.3	6593.11	6592.1	10499.67	10498.66	7046.95	7045.94
11477.24	11476.23	9345.85	9344.84	11477.24	11476.23	7710.68	7709.67	10876.87	10875.86	6628.84	6627.83	10732.88	10731.87	7143.18	7142.17
11537.38	11536.37	9665.51	9664.5	11537.38	11536.37	8319.91	8318.9	10960.42	10959.41	6664.04	6663.03	10777.31	10776.3	7269.66	7268.65
11653.08	11652.07	10042.17	10041.16	11653.08	11652.07	8680.94	8679.93	11130.63	11129.62	6681.17	6680.16	10876.87	10875.86	7577.77	7576.76
11877.6	11876.59	10749.86	10748.85	11877.6	11876.59	8982.49	8981.48	11537.38	11536.37	6735.81	6734.8	10960.42	10959.41	9738.43	9737.42
12244.15	12243.14	10786.9	10785.89	11877.6	11876.59	9129.89	9128.88	11514.38	11513.37	6753.15	6752.14	11130.63	11129.62	9827.63	9826.62
12496.39	12495.38	10786.9	10779.96	12244.15	12243.14	9637.62	9636.61	11537.38	11536.37	6808.46	6807.45	11477.24	11476.23	9990.05	9989.04
13063.95	13062.94	12010.54	12009.53	12496.39	12495.38	11845.72	11844.71	11653.08	11652.07	6864.32	6863.31	11514.38	11513.37	10252.36	10251.35
		12027.23	12026.22	13063.95	13062.94	12058.01	12057.0	11877.6	11876.59	6919.17	6918.16	11537.38	11536.37	10743.29	10742.28
						12588.04	12587.03	12244.15	12243.14	6991.74	6990.73	11653.08	11652.07	10767.25	10766.24
								12496.39	12495.38	7361.17	7360.16	11877.6	11876.59	10783.04	10782.03
										7647.17	7646.16	12496.39	12495.38	12211.81	12210.8
										9017.44	9016.43	13063.95	13062.94	14272.68	14271.67

Obr. 21 Obrázok tabuliek s rozdielnymi signálmi z tretieho týždňa kultivácie s FAA v koncentráciach 1, 2, 5 a 10 μM (zľava). „CTRL“ (kontrola) obsahuje signály vyskytujúce sa len v kontrole a tabuľka vzorky (1, 2, 5 a 10 μM FAA) signály vyskytujúce sa len vo vzorke a nie v kontrole.

4.4.1.4 Malonát (MA)

Malonát je aniont kyseliny malónovej, systematicky kyseliny propandiovej. Funguje ako kompetitívny inhibítor enzýmu sukcinátdehydrogenáza, čím blokuje pre bunku nezbytné energetické procesy – Krebsov (citrátový) cyklus a dýchací reťazec.

Spektrá z prvého týždňa kultivácie s MA mali najviac podobných signálov s ich kontrolou. Skoro každé spektrum obsahovalo proteíny: „CsbD domain-containing protein“, „50S ribosomal protein L34“, „YcfA-like protein“, „Putative transcriptional regulator“. Píky chýbajúce v kontrole (Obr. 22) boli priradené proteínom súvisiacim s hydrolyzou („ATP-dependent Clp protease adapter protein ClpS“), delením bunky („Cell division protein SepF“), translokázou („Proton-translocating NAD(P)(+) transhydrogenase“) a karboxyzómom („Ribulose biphosphate carboxylase, small subunit“).

CTRL		1 μ M MA		CTRL		2 μ M MA		CTRL		5 μ M MA		CTRL		10 μ M MA	
m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)
4584.14	4583.13	4798.85	4797.84	4584.14	4583.13	3813.72	3812.71	4584.14	4583.13	3812.57	3811.56	4584.14	4583.13	3034.37	3033.36
4860.73	4859.72	4913.57	4912.56	4860.73	4859.72	4799.26	4798.25	4860.73	4859.72	3913.65	3912.64	5238.66	5237.65	3764.37	3763.36
5015.81	5014.8	5326.56	5325.55	4870.05	4869.04	4866.62	4865.61	5015.81	5014.8	4915.8	4914.79	5375.08	5374.07	3814.22	3813.21
5375.08	5374.07	5370.15	5369.14	5015.81	5014.8	4914.2	4913.19	5452.28	5451.27	5147.76	5146.75	5383.24	5382.23	3831.63	3830.62
5472.53	5471.52	5656.51	5655.5	5238.66	5237.65	5326.62	5325.61	5472.53	5471.52	5327.94	5326.93	5452.28	5451.27	4505.13	4504.12
6559.17	6558.16	5711.06	5710.05	5472.53	5471.52	5438.82	5437.81	5624.54	5623.53	5388.92	5387.91	5472.53	5471.52	4799.14	4798.13
7077.67	7076.66	5839.09	5838.08	6042.12	6041.11	5656.34	5655.33	6042.12	6041.11	5618.9	5617.89	5526.24	5525.23	4844.2	4843.19
7199.18	7198.17	5966.57	5965.56	6559.17	6558.16	5711.43	5710.42	6522.05	6521.04	5656.37	5655.36	5624.54	5623.53	4914.01	4913.0
7337.65	7336.64	6094.66	6093.65	7077.67	7076.66	5823.77	5822.76	6559.17	6558.16	5839.42	5838.41	5881.06	5880.05	5157.47	5156.46
7486.7	7485.69	6135.63	6134.62	7199.18	7198.17	5839.31	5838.3	6665.5	6664.49	5913.82	5912.81	5983.59	5982.58	5370.9	5369.89
7499.92	7498.91	6222.68	6221.67	7337.65	7336.64	5967.04	5966.03	7077.67	7076.66	5952.08	5951.07	6042.12	6041.11	5387.73	5386.72
7617.9	7616.89	6263.75	6262.74	7486.7	7485.69	6095.45	6094.44	7199.18	7198.17	5967.83	5966.82	6522.05	6521.04	5400.13	5399.12
7806.84	7805.83	6330.07	6329.06	7499.92	7498.91	6136.8	6135.79	7337.65	7336.64	6056.09	6055.08	7077.67	7076.66	5618.9	5617.89
7846.91	7845.9	6424.18	6423.17	7520.05	7519.04	6139.33	6138.32	7499.92	7498.91	6263.79	6262.78	7337.65	7336.64	5657.59	5656.58
7965.55	7964.54	6478.97	6477.96	7617.9	7616.89	6207.68	6206.67	7617.9	7616.89	6330.07	6329.06	7486.7	7485.69	5713.2	5712.19
8161.94	8160.93	6551.43	6550.42	7806.84	7805.83	6224.09	6223.08	7806.84	7805.83	6390.71	6389.7	7499.92	7498.91	6096.49	6095.48
8201.92	8200.91	6563.16	6562.15	7846.91	7845.9	6264.84	6263.83	7846.91	7845.9	6465.49	6464.48	7617.9	7616.89	6112.74	6111.73
8318.55	8317.54	6608.68	6607.67	8161.94	8160.93	6333.07	6332.06	8161.94	8160.93	6563.38	6562.37	7806.84	7805.83	6140.01	6139.0
8501.82	8500.81	6920.21	6919.2	8201.92	8200.91	6466.4	6465.39	8201.92	8200.91	7071.39	7070.38	7846.91	7845.9	6208.96	6207.95
8578.47	8577.46	7048.75	7047.74	8210.66	8209.65	6481.13	6480.12	8210.66	8209.65	7106.89	7105.88	8161.94	8160.93	6227.89	6226.88
8679.83	8678.82	7195.96	7194.95	8318.55	8317.54	6505.3	6504.29	8318.55	8317.54	7196.16	7195.15	8201.92	8200.91	6264.48	6263.47
8698.03	8697.02	7503.69	7502.68	8501.82	8500.81	6554.21	6553.2	8501.82	8500.81	7503.38	7502.37	8210.66	8209.65	6333.07	6332.06
8711.94	8710.93	7614.61	7613.6	8578.47	8577.46	6609.07	6608.06	8679.83	8678.82	7650.67	7649.66	8501.82	8500.81	6922.69	6921.68
8722.68	8721.67	7650.88	7649.87	8679.83	8678.82	6650.36	6649.35	8698.03	8697.02	7791.75	7790.74	8679.83	8678.82	6996.36	6995.35
8749.74	8748.73	7687.92	7686.91	8698.03	8697.02	6736.93	6735.92	8722.68	8721.67	7813.17	7812.16	8698.03	8697.02	7506.1	7505.09
9107.25	9106.24	7792.49	7791.48	8711.94	8710.93	6779.22	6778.21	8749.74	8748.73	8113.65	8112.64	8711.94	8710.93	7815.15	7814.14
9763.76	9762.75	7800.28	7799.27	8722.68	8721.67	6922.45	6921.44	8765.35	8764.34	8207.45	8206.44	8722.68	8721.67	7816.85	7815.84
9932.78	9931.77	7816.85	7815.84	8749.74	8748.73	6939.52	6938.51	9107.25	9106.24	8768.57	8767.56	8749.74	8748.73	8768.57	8767.56
10315.98	10314.97	9012.88	9011.87	9107.25	9106.24	7048.85	7047.84	9799.49	9798.48	9014.15	9013.14	8765.35	8764.34	9016.23	9015.22
10610.65	10609.64	9136.4	9135.39	9763.76	9762.75	7195.72	7194.71	9932.78	9931.77	9136.4	9135.39	9799.49	9798.48	9132.8	9131.79
10718.44	10717.43	9737.67	9736.66	9799.49	9798.48	7306.42	7305.41	10315.98	10314.97	9158.43	9157.42	9932.78	9931.77	9741.39	9740.38
10737.98	10736.97	9756.3	9755.29	9932.78	9931.77	7509.58	7508.57	10610.65	10609.64	9741.39	9740.38	10610.65	10609.64	9785.34	9784.33
10753.63	10752.62	9831.96	9830.95	10315.98	10314.97	7561.79	7560.78	10718.44	10717.43	9829.93	9828.92	10718.44	10717.43	9803.35	9802.34
11859.72	11858.71	10741.89	10740.88	10610.65	10609.64	7614.61	7613.6	10737.98	10736.97	10708.79	10707.78	10737.98	10736.97	9834.75	9833.74
12205.53	12204.52	12213.07	12212.06	10718.44	10717.43	7689.72	7688.71	10766.06	10765.05	10730.16	10729.15	10753.63	10752.62	10282.87	10281.86
12208.89	12207.88			10737.98	10736.97	7820.19	7819.18	11517.06	11516.05	11511.01	11510.0	10766.06	10765.05	10741.89	10740.88
12226.11	12225.1			10766.06	10765.05	9014.15	9013.14	11859.72	11858.71	12233.93	12232.92	11859.72	11858.71	10757.55	10756.54
				11859.72	11858.71	9707.89	9706.88	12205.53	12204.52			12205.53	12204.52	11988.34	11987.33
				12205.53	12204.52	9831.05	9830.04	12226.11	12225.1			12208.89	12207.88	12233.93	12232.92
				12208.89	12207.88	12213.15	12212.14					12226.11	12225.1		
				12226.11	12225.1										

Obr. 22 Obrázok tabuliek s rozdielnymi signálmi z prvého týždňa kultivácie s MA v koncentráciach 1, 2, 5 a 10 μ M (zľava). „CTRL“ (kontrola) obsahuje signály vyskytujúce sa len v kontrole a tabuľka vzorky (1, 2, 5 a 10 μ M MA) signály vyskytujúce sa len vo vzorke a nie v kontrole.

Pre spektrá z druhého týždňa inkubácie s inhibitorom sa počet podobným signálom mierne zmenšil. Išlo hlavne o signály priradené pre „Uncharacterized protein“, ale aj pre „ATPase“, „DDE_Tnp_IS240 domain-containing protein“. Signálom pre 2, 5 μM MA a kontrolu bol priradený signál pre „Possible high light inducible protein-related protein“. Pre kontrolu bolo identifikovaných viac proteínov súvisiacich s fotosyntézou, tých bolo pre ostatné spektrá priradených menej.

Rozdielne signály (Obr. 23) pre vzorku inkubovanú s 1 μM MA boli priradené napr. proteínu „Sec-independent protein translocase protein TatA“ a „LapA_dom domain-containing protein“. Spoločne s 2 a 5 μM MA obsahovali „CsbD domain-containing protein“. 2 μM MA sa priradil proteín súvisajúci s väzbou kovových iónov „Copper-binding metallochaperone“. Rozdielnym signálom vzorky 5 μM MA sa identifikovali „Putative multidrug efflux ABC transporter (Fragment)“, „Endoribonuclease L-PSP“ a „Carbon dioxide concentrating mechanism/carboxysome shell protein“. „CRISPR-associated endoribonuclease Cas2“ má súvis s obrannou reakciou na vírus a bol priradený rozdielnemu signálu vzorky s 10 μM MA. Tej sa priradil aj „HMA domain-containing protein“ a „HEPN domain-containing protein“.

CTRL		1 μM MA		CTRL		2 μM MA		CTRL		5 μM MA		CTRL		10 μM MA	
m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)
4605.69	4604.68	4976.98	4975.97	4859.99	4858.98	4799.11	4798.1	4859.99	4858.98	3209.24	3208.23	4859.99	4858.98	4977.92	4976.91
5383.8	5382.79	5114.62	5113.61	5615.13	5614.12	4866.86	4865.85	5125.84	5124.83	3812.79	3811.78	5471.56	5470.55	5112.25	5111.24
5524.83	5523.82	5386.86	5385.85	5983.37	5982.36	5066.96	5065.95	5253.45	5252.44	4003.56	4002.55	5524.83	5523.82	5240.53	5239.52
5615.13	5614.12	5454.67	5453.66	6354.0	6352.99	5154.76	5153.75	5372.35	5371.34	5093.79	5092.78	5615.13	5614.12	5454.69	5453.68
5983.37	5982.36	5493.85	5492.84	6468.62	6467.61	5183.79	5182.78	5654.94	5653.93	5377.61	5376.6	5654.94	5653.93	5528.23	5527.22
6037.76	6036.75	5531.04	5530.03	6560.0	6558.99	5196.97	5195.96	5710.14	5709.13	5405.31	5404.3	5710.14	5709.13	5657.95	5656.94
6354.0	6352.99	5621.42	5620.41	7027.34	7026.33	5239.62	5238.61	6037.76	6036.75	5658.36	5657.35	6354.0	6352.99	5738.36	5737.35
6405.8	6404.79	5824.92	5823.91	7072.21	7071.2	5325.87	5324.86	6120.76	6119.75	5840.5	5839.49	6405.8	6404.79	5912.72	5911.71
6468.62	6467.61	5839.56	5838.55	7124.39	7123.38	5398.5	5397.49	6296.16	6295.15	5860.31	5859.3	6468.62	6467.61	5922.31	5921.3
6560.0	6558.99	5882.02	5881.01	7143.5	7142.49	5438.12	5437.11	6354.0	6352.99	5879.12	5878.11	6560.0	6558.99	5953.19	5952.18
6920.59	6919.58	5913.1	5912.09	7195.91	7194.9	5453.67	5452.66	6468.62	6467.61	6190.86	6189.85	6920.59	6919.58	5986.38	5985.37
6938.52	6937.51	5967.39	5966.38	7444.65	7443.64	5477.83	5476.82	6560.0	6558.99	6261.33	6260.32	7027.34	7026.33	6212.85	6211.84
7027.34	7026.33	5986.38	5985.37	7489.85	7488.84	5496.69	5495.68	7020.59	7019.58	6332.95	6331.94	7027.34	7026.33	6323.94	6322.93
7048.5	7047.49	6041.37	6040.36	7500.21	7499.2	5619.93	5618.92	6927.34	6926.33	6379.99	6378.98	7124.39	7123.38	6335.96	6334.95
7072.21	7071.2	6097.77	6096.76	7650.77	7649.76	5695.26	5694.25	7072.21	7071.2	6424.81	6423.8	7430.72	7429.71	6410.71	6409.7
7124.39	7123.38	6137.27	6136.26	7686.81	7685.8	5823.4	5822.39	7124.39	7123.38	6450.65	6449.64	7444.65	7443.64	6426.64	6425.63
7430.72	7429.71	6194.59	6193.58	7703.7	7702.69	5838.88	5837.87	7143.5	7142.49	6522.42	6521.41	7489.85	7488.84	6538.58	6537.57
7444.65	7443.64	6210.75	6209.74	7803.4	7802.39	5879.92	5878.91	7195.91	7194.9	6537.25	6536.24	7500.21	7499.2	6554.2	6553.19
7489.85	7488.84	6224.91	6223.9	7814.63	7813.62	5911.27	5910.26	7430.72	7429.71	6554.51	6553.5	7519.17	7518.16	6668.05	6667.04
7500.21	7499.2	6331.13	6330.12	7948.11	7947.1	5950.75	5949.74	7444.65	7443.64	6664.9	6663.89	7650.77	7649.76	6779.1	6778.09
7650.77	7649.76	6410.48	6409.47	8211.93	8210.92	5966.32	5965.31	7500.21	7499.2	6704.95	6703.94	7686.81	7685.8	7134.83	7133.82
7686.81	7685.8	6426.41	6425.4	8315.0	8313.99	6006.84	6005.83	7686.81	7685.8	6719.82	6718.81	7703.7	7702.69	7164.23	7163.22
7703.7	7702.69	6481.46	6480.45	8327.87	8326.86	6094.58	6093.57	7703.7	7702.69	6741.81	6740.8	7814.63	7813.62	7497.98	7496.97
7803.4	7802.39	6505.85	6504.84	8577.67	8576.66	6135.17	6134.16	7948.11	7947.1	6850.16	6849.15	7948.11	7947.1	7503.81	7502.8
7948.11	7947.1	6523.67	6522.66	8677.7	8676.69	6207.43	6206.42	8211.93	8210.92	7139.88	7138.87	7963.19	7962.18	7617.79	7616.78
8211.93	8210.92	6536.99	6535.98	8711.58	8710.57	6222.65	6221.64	8315.0	8313.99	7190.42	7189.41	8211.93	8210.92	7820.08	7819.07
8677.7	8676.69	6553.8	6552.79	8726.16	8725.15	6263.89	6262.88	8577.67	8576.66	7298.02	7297.01	8677.7	8676.69	8208.23	8207.22
8711.58	8710.57	6610.93	6609.92	8764.94	8763.93	6370.92	6369.91	8726.16	8725.15	7742.47	7741.46	8726.16	8725.15	8501.54	8500.53
8726.16	8725.15	6650.36	6649.35	9106.97	9105.96	6391.65	6390.64	8764.94	8763.93	8571.02	8570.01	9010.47	9009.46	9014.12	9013.11
9106.97	9105.96	6665.22	6664.21	9132.7	9131.69	6423.52	6422.51	9010.47	9009.46	8697.01	8696.0	9106.97	9105.96	9774.86	9773.85
9132.7	9131.69	6866.58	6865.57	9146.8	9145.79	6465.53	6464.52	9106.97	9105.96	8730.67	8729.66	9782.51	9781.5	9802.04	9801.03
9146.8	9145.79	6923.95	6922.94	9174.27	9173.26	6479.47	6478.46	9174.27	9173.26	9112.25	9111.24	10236.83	10235.82	10317.0	10315.99
9174.27	9173.26	6990.71	6989.7	9737.58	9736.57	6520.9	6519.89	9737.58	9736.57	9169.21	9168.2	10263.75	10262.74	10718.36	10717.35
9737.58	9736.57	7067.36	7066.35	9763.67	9762.66	6536.13	6535.12	9782.51	9781.5	9504.09	9503.08	10292.3	10291.29	10741.81	10740.8
9782.51	9781.5	7504.38	7503.37	9782.51	9781.5	6551.74	6550.73	10236.83	10235.82	9741.3	9740.29	10312.49	10311.48	10757.47	10756.46
10236.83	10235.82	7614.5	7613.49	10236.83	10235.82	6607.19	6606.18	10263.75	10262.74	10754.87	10753.86	10724.58	10723.57	10814.51	10813.5
10263.75	10262.74	7810.07	7809.06	10263.75	10262.74	6649.1	6648.09	10292.3	10291.29	10769.94	10768.93	10766.61	10765.6	11502.01	11501.0
10292.3	10291.29	8018.58	8017.57	10292.3	10291.29	6663.28	6662.27	10312.49	10311.48	11502.01	11501.0	11477.95	11476.94	11542.53	11541.52
10312.49	10311.48	9707.8	9706.79	10312.49	10311.48	6737.81	6736.8	10724.58	10723.57	11866.68	11865.67	11889.53	11888.52	12183.88	12182.87
10724.58	10723.57	10318.18	10317.17	10724.58	10723.57	6807.83	6806.82	10766.61	10765.6	11873.34	11872.33	12634.63	12633.62	12288.7	12287.69
11477.95	11476.94	10709.43	10708.42	10766.61	10765.6	6864.22	6863.21	10777.05	10776.04	11898.6	11897.59				
11514.01	11513.0	10730.08	10729.07	11477.95	11476.94	6993.73	6992.72	11477.95	11476.94	11917.98	11916.97				
11889.53	11888.52	11517.14	11516.13	11889.53	11888.52	7192.37	7191.36	11889.53	11888.52	12113.0	12111.99				
12634.63	12633.62	11775.67	11774.66	12207.91	12206.9	7493.95	7492.94	12207.91	12206.9	12213.3	12212.29				
				12244.67	12243.66	7556.01	7555.0	12634.63	12633.62						
				12634.63	12633.62	7614.5	7613.49								

Obr. 23 Obrázok tabuliek s rozdielnymi signálmi z druhého týždňa kultivácie s MA v koncentráciach 1, 2, 5 a 10 μM (zľava). „CTRL“ (kontrola) obsahuje signály vyskytujúce sa len v kontrole a tabuľka vzorky (1, 2, 5 a 10 μM MA) signály vyskytujúce sa len vo vzorke a nie v kontrole.

CTRL		1 μM MA		CTRL		2 μM MA		CTRL		5 μM MA		CTRL		10 μM MA	
m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)	m/z	M(Exp)
5147.61	5146.6	3171.43	3170.42	5147.61	5146.6	3316.39	3315.38	5147.61	5146.6	3765.14	3764.13	5147.61	5146.6	4002.3	4001.25
5371.61	5370.6	5153.64	5152.63	5548.95	5547.94	3764.39	3763.38	5494.3	5493.29	3873.17	3872.16	5548.95	5547.94	4606.99	4605.98
5456.82	5455.81	5327.19	5326.18	5622.8	5621.79	3873.09	3872.08	5548.95	5547.94	4002.28	4001.27	5679.02	5678.01	4799.0	4797.95
5473.22	5472.21	5397.1	5396.09	5679.02	5678.01	3892.1	3891.09	5679.02	5678.01	4607.52	4606.51	5696.62	5695.61	5326.65	5325.64
5494.3	5493.29	5452.37	5451.36	5693.19	5692.18	4001.52	4000.51	5752.85	5751.84	4798.42	4797.41	5863.19	5862.18	5397.27	5396.26
5548.95	5547.94	5615.39	5614.38	5934.89	5933.88	4605.01	4604.0	5863.19	5862.18	4871.25	4870.24	5934.89	5933.88	5729.25	5728.24
5622.8	5621.79	5618.39	5617.38	6057.47	6056.46	4797.96	4796.95	5879.15	5878.14	5071.59	5070.58	6107.25	6106.24	5824.29	5823.28
5679.02	5678.01	5653.51	5652.5	6107.25	6106.24	5069.8	5068.79	5934.89	5933.88	5112.43	5111.42	6194.72	6193.71	6209.65	6208.64
5696.62	5695.61	5735.63	5734.62	6120.72	6119.71	5141.19	5140.18	6107.25	6106.24	5142.16	5141.15	6500.13	6499.12	6333.28	6332.27
5784.55	5783.54	5780.95	5779.94	6194.72	6193.71	5198.13	5197.12	6120.72	6119.71	5199.17	5198.16	6735.98	6734.97	6366.36	6365.35
5863.19	5862.18	5800.25	5799.24	6500.13	6499.12	5239.18	5238.17	6194.72	6193.71	5271.26	5270.25	6772.71	6771.7	6482.06	6481.05
5913.82	5912.81	6036.12	6035.11	6521.36	6520.35	5270.46	5269.45	6500.13	6499.12	5312.69	5311.68	7321.16	7320.15	6560.58	6559.57
5934.89	5933.88	6115.37	6114.36	6556.85	6555.84	5310.42	5309.41	6521.36	6520.35	5327.82	5326.81	7497.12	7496.11	6610.13	6609.12
5951.48	5950.47	6131.08	6130.07	6920.47	6919.46	5327.03	5326.02	6772.71	6771.7	5399.33	5398.32	7612.44	7611.43	6666.77	6665.76
6039.21	6038.2	6252.07	6251.06	7066.62	7065.61	5399.22	5398.21	6920.47	6919.46	5439.53	5438.52	7807.31	7806.3	6739.74	6738.73
6057.47	6056.46	6293.0	6291.99	7107.07	7106.06	5437.69	5436.68	7066.62	7065.61	5656.78	5655.77	7823.39	7822.38	6866.83	6865.82
6107.25	6106.24	6330.79	6329.78	7321.16	7320.15	5655.59	5654.58	7107.07	7106.06	5700.74	5699.73	7963.32	7962.31	6996.71	6995.7
6120.72	6119.71	6364.76	6363.75	7497.12	7496.11	5738.27	5737.26	7321.16	7320.15	5727.17	5726.16	8313.43	8312.42	7051.86	7050.85
6194.72	6193.71	6465.69	6464.68	7614.48	7613.47	5824.16	5823.15	7612.44	7611.43	5825.44	5824.43	8329.81	8328.8	7123.58	7122.57
6265.04	6264.03	6481.22	6480.21	7807.31	7806.3	6111.34	6110.33	7614.48	7613.47	5882.2	5881.19	9111.03	9110.02	7448.2	7447.15
6297.97	6296.96	6553.06	6552.05	7823.39	7822.38	6209.37	6208.36	7807.31	7806.3	6185.81	6184.8	9136.27	9135.26	7489.04	7488.03
6426.67	6425.66	6560.22	6559.21	7831.36	7830.35	6332.94	6331.93	7823.39	7822.38	6208.79	6207.78	9175.03	9174.02	7506.62	7505.61
6500.13	6499.12	6652.21	6651.2	8313.43	8312.42	6363.01	6362.0	7831.36	7830.35	6320.49	6319.48	9737.54	9736.53	7519.8	7518.75
6556.85	6555.84	6663.78	6662.77	8329.81	8328.8	6392.4	6391.39	7963.32	7962.31	6371.61	6370.6	9831.23	9830.22	7560.45	7559.44
6735.98	6734.97	6739.35	6738.34	9111.03	9110.02	6463.86	6462.85	8313.43	8312.42	6483.65	6482.64	10164.11	10163.1	8706.92	8705.91
6772.71	6771.7	6779.08	6778.07	9136.27	9135.26	6481.46	6480.45	8329.81	8328.8	6525.27	6524.26	10757.42	10756.41	8716.08	8715.07
6810.42	6809.41	6883.17	6882.16	9175.03	9174.02	6508.68	6507.67	9111.03	9110.02	6574.11	6573.1	11526.27	11525.26	9017.47	9016.46
6938.14	6937.13	6885.16	6884.15	9725.38	9724.37	6551.9	6550.89	9136.27	9135.26	6610.26	6609.25	12226.78	12225.77	9820.34	9819.33
7066.62	7065.61	6944.91	6943.9	9737.54	9736.53	6563.28	6562.27	9175.03	9174.02	6665.05	6664.04	12250.37	12249.36	9834.45	9833.44
7107.07	7106.06	6991.38	6990.37	10164.11	10163.1	6606.93	6605.92	9725.38	9724.37	6723.31	6722.3				
7321.16	7320.15	7381.02	7380.01	10757.42	10756.41	6663.98	6662.97	9737.54	9736.53	6754.24	6753.23				
7497.12	7496.11	7451.32	7450.31	10779.03	10778.02	6866.04	6865.03	10164.11	10163.1	7122.46	7121.45				
7612.44	7611.43	7502.6	7501.59	10779.03	10778.02	6892.1	6891.09	10757.42	10756.41	7067.45	7066.44				
7614.48	7613.47	7554.52	7553.51	11514.34	11513.33	7519.26	7518.25	10767.45	10766.44	7506.17	7505.16				
7807.31	7806.3	7575.54	7574.53	11526.27	11525.26	8712.44	8711.43	10779.03	10778.02	7519.27	7518.26				
7823.39	7822.38	7594.64	7593.63	12226.78	12225.77	9010.06	9009.05	11514.34	11513.33	7557.35	7556.34				
7831.36	7830.35	7617.77	7616.76	12250.37	12249.36			11526.27	11525.26	8714.49	8713.48				
7963.32	7962.31	7686.92	7685.91					12226.78	12225.77	10785.67	10784.66				
8313.43	8312.42	7782.43	7781.42					12250.37	12249.36	12023.32	12022.31				
8329.81	8328.8	7813.85	7812.84												
9111.03	9110.02	7838.85	7837.84												
9136.27	9135.26	7967.98	7966.97												
9175.03	9174.02	8017.86	8016.85												
9737.54	9736.53	9183.23	9182.22												
9831.23	9830.22	9744.99	9743.98												
10164.11	10163.1	9834.42	9833.41												
10757.42	10756.41	10260.01	10259.0												
11514.34	11513.33	10269.84	10268.83												
11526.27	11525.26	10299.66	10298.65												
12226.78	12225.77	10296.6	10295.59												
12250.37	12249.36	10318.77	10317.76												

Obr. 24 Obrázok tabuliek s rozdielnymi signálmi z tretieho týždňa kultivácie s MA v koncentráciach 1, 2, 5 a 10 μM (zľava). „CTRL“ (kontrola) obsahuje signály vyskytujúce sa len v kontrole a tabuľka vzorky (1, 2, 5 a 10 μM MA) signály vyskytujúce sa len vo vzorke a nie v kontrole.

Tretí týždeň sa počet podobných signálov znova zväčšil. Išlo hlavne o proteíny ako je „Conserved hypothetical membrane protein“ a „Chlorophyll A-B binding protein“. V kontrole chýbali niektoré proteíny súvisiace s väzbou DNA, ktoré sa našli v ostatných spektrách („IS3 family transposase“, „5'-phosphoribosylglycinamide transformylase“). Referencia so spektrom pre 10 μM MA mali najviac podobných pík. Podobným píkom boli priradené hlavne „Uncharacterized protein“ a proteíny pre väzbu kovových iónov (napr. „Prokaryotic metallothionein-related protein“).

Rozdielnym signálom (Obr. 24) pre 10 μM MA sa identifikovali proteíny pre väzbu mRNA „Addiction module toxin, HicA family“ a väzbu ATP „Carbohydrate uptake ABC transporter-2 (CUT2) family, ATP-binding protein, truncation“. 5 μM MA sa priradili „MazG nucleotide pyrophosphohydrolase domain protein“ a „Cytochrome B6-F complex subunit 5“. U 2 μM MA sa našiel proteín súvisiaci s aminotransferázou „Aspartate aminotransferase“ a lyázou „Delta-aminolevulinic acid dehydratase,“. Pre rozdielne píky 1 μM MA sa priradili „NifT/FixU family protein“ (súvisiaci s fixáciou nitrogénu), „5'-phosphoribosylglycinamide transformylase“, „Bacterial translation initiation factor 1 (BIF-1)“ a „ATP synthase subunit c“.

4.4.2 Kultivácia buniek v beztiažovom stave

Ďalšie spektrá sa získali z buniek *Synechococcus* kultivovanej v stave beztiaže v rôznych časových obdobiach. Z každého spektra bolo vybraných 100 diagnostických píkov. Vzniklo celkovo osem spektier s rôznym časovým rozmedzím a osem kontrol, pre každé jedna.

Prvou porovnávanou dvojicou spektier je referenčné spektrum z 17.9. a spektrum vzniknuté kultiváciou vzorky v beztiažovom stave počas dvoch hodín. Tieto spektrá mali najviac podobných signálov (67) zo všetkých dvojíc. Väčšine signálov boli priradené „Uncharacterized protein“. Priradili sa im ale aj proteíny súvisiace s transláciou „Translation initiation factor IF-1“ a fotosyntézou „Photosystem I reaction center subunit VIII“. Podobným signálom sa priradili aj proteíny: „Uncharacterized ycii family conserved protein“, „Transposase“, „NADH-ubiquinone/plastoquinone oxidoreductase

S4 CTRL 17.9.		S4 CTRL 17.9. 2h		S4 CTRL 18.9.		S4 CTRL 18.9. 24h		S4 CTRL 19.9.		S4 CTRL 19.9. 48h		S4 CTRL 23.9.		S4 CTRL 23.9. 6d	
m/z	M(exp)	m/z	M(exp)	m/z	M(exp)	m/z	M(exp)	m/z	M(exp)	m/z	M(exp)	m/z	M(exp)	m/z	M(exp)
4991.28	4990.27	3080.19	3079.18	3034.7	3033.69	3060.86	3059.85	3052.62	3051.61	3070.32	3069.31	3172.31	3171.3	3053.84	3052.83
5145.66	5144.65	3171.58	3170.57	3078.71	3077.7	3112.22	3111.21	3075.88	3074.87	3489.28	3488.27	3177.91	3176.9	3104.55	3103.54
5387.74	5386.73	3742.79	3741.78	3098.92	3097.91	3122.29	3121.28	3080.31	3079.3	3540.12	3539.11	3445.75	3444.74	3125.01	3124.0
5463.15	5462.14	3814.19	3813.18	3281.89	3280.88	3145.89	3144.88	3099.36	3098.35	3632.37	3631.36	3693.31	3692.3	3141.28	3140.27
5492.54	5491.53	3903.65	3902.64	3302.96	3301.95	3239.73	3238.72	3185.08	3184.07	3656.61	3655.6	4431.55	4430.54	3145.54	3144.53
5693.19	5692.18	3974.7	3973.69	3445.88	3444.87	3309.66	3308.65	3266.54	3265.53	3872.45	3871.44	3839.5	3838.49	3349.61	3348.6
5799.5	5798.49	4432.04	4431.03	3458.04	3457.03	3356.38	3355.37	3293.59	3292.58	4359.55	4358.54	4859.16	4858.15	3393.38	3392.37
7072.14	7071.13	4761.85	4760.84	3484.11	3483.1	3388.8	3387.79	3311.88	3310.87	4431.5	4430.49	4978.22	4977.21	3413.43	3412.42
7516.6	7515.59	4798.52	4797.51	3544.9	3543.89	3411.0	3409.99	3448.3	3447.29	4453.0	4451.99	5257.24	5256.23	3611.6	3610.59
7649.3	7648.29	5126.2	5125.19	3624.57	3623.56	3430.19	3429.18	3840.34	3839.33	4751.17	4750.16	5371.82	5370.81	3625.12	3624.11
7829.35	7828.34	5316.33	5315.32	4121.92	4120.91	3449.33	3448.32	3943.74	3942.73	5041.27	5040.26	5388.0	5386.99	3643.15	3642.14
7838.58	7837.57	5384.65	5383.64	4150.27	4149.26	3464.24	3463.23	4675.5	4674.49	5382.84	5381.83	5473.91	5472.9	3763.52	3762.51
7927.05	7926.04	5396.19	5395.18	4173.96	4172.95	3534.5	3533.49	4798.35	4797.34	5473.1	5472.09	5512.5	5511.49	3875.49	3874.48
8091.58	8090.57	5802.98	5801.97	4552.76	4551.75	3551.92	3550.91	4937.82	4936.81	5636.28	5635.27	5527.51	5526.5	3928.44	3927.43
8230.71	8229.7	6107.79	6106.78	4622.87	4621.86	3580.01	3579.0	5234.66	5233.65	5654.53	5653.52	5636.41	5635.4	4005.77	4004.76
8327.19	8326.18	6182.69	6181.68	4638.16	4637.15	3592.33	3591.32	5469.84	5468.83	5737.41	5736.4	5696.8	5695.79	4252.39	4251.37
8575.53	8574.52	6221.95	6220.94	4723.05	4722.04	3670.77	3669.76	5510.86	5509.85	5908.79	5907.78	5673.51	5672.5	4429.87	4428.86
8709.94	8708.93	6252.83	6251.82	4858.11	4857.1	3772.74	3771.73	5631.36	5630.35	5936.04	5935.03	5785.56	5784.55	4497.0	4495.99
8765.23	8764.22	6277.9	6276.89	5174.21	5173.2	3874.94	3873.93	5640.33	5639.32	6111.68	6110.67	5762.81	5761.8	4531.6	4530.59
9107.32	9106.31	6301.95	6300.94	5437.74	5436.73	4034.41	4033.4	5733.22	5732.21	6192.4	6191.39	5916.19	5915.18	4748.72	4747.71
9738.85	9737.84	6378.24	6377.23	5527.49	5526.48	4113.89	4112.88	6149.98	6148.97	6221.32	6220.31	5940.61	5939.6	4762.09	4761.08
9757.37	9756.36	6665.65	6664.64	5637.58	5636.57	4169.71	4168.7	6179.72	6178.71	6300.63	6299.62	5957.68	5956.67	4803.84	4802.83
9783.8	9782.79	6699.94	6698.93	5674.46	5673.45	4234.63	4233.62	6240.59	6239.58	6572.11	6571.1	6147.59	6146.58	4829.04	4828.03
9795.95	9794.94	7066.9	7065.89	5736.46	5735.45	4258.01	4257.0	6314.93	6313.92	6664.38	6663.37	6250.38	6249.37	4877.75	4876.74
9813.31	9812.3	7193.87	7192.86	5773.99	5772.98	4312.31	4311.3	6526.18	6525.17	6787.36	6786.35	6278.93	6277.92	4929.59	4928.58
10238.62	10237.61	7420.25	7419.24	5785.39	5784.38	4429.99	4428.98	6549.96	6548.95	6815.23	6814.22	6296.59	6295.58	5479.92	5478.91
10271.22	10270.21	7832.8	7831.79	5800.67	5799.66	4764.44	4763.43	6988.01	6987.0	6915.08	6914.07	6407.04	6406.03	5727.38	5726.37
10607.5	10606.49	7923.82	7922.81	5824.2	5823.19	4914.27	4913.26	7573.51	7572.5	7078.93	7077.92	6425.83	6424.82	5771.06	5770.05
10731.37	10730.36	9012.78	9011.77	5882.42	5881.41	5001.95	5000.94	7573.51	7572.5	7616.26	7615.25	6465.28	6464.27	5832.75	5831.74
10765.86	10764.85	9735.34	9734.33	6149.29	6148.28	5117.37	5116.36	7678.93	7677.92	7793.31	7792.3	6645.28	6644.27	5832.75	5831.74
11499.09	11498.08	9829.93	9828.92	6355.99	6354.98	5228.33	5227.32	7793.31	7792.3	7933.13	7932.12	6921.37	6920.36	5863.82	5862.81
11673.75	11672.74	10771.45	10770.44	6422.71	6421.7	5249.2	5248.19	7835.13	7834.12	7933.13	7932.12	6940.16	6939.15	5903.23	5902.22
12247.36	12246.35	10846.25	10845.24	6528.88	6527.87	5302.78	5301.77	7852.62	7851.61	7933.86	7932.85	7073.06	7072.05	6176.37	6175.36
14158.27	14157.26	12988.88	12987.87	6864.16	6863.15	5322.92	5321.91	7907.78	7906.77	7613.1	7612.09	7104.83	7103.82	6212.06	6211.05
				6883.15	6882.14	5355.59	5354.58	7927.0	7926.99	7613.1	7612.09	7355.04	7354.03	6371.02	6370.01
				6938.63	6937.62	5402.55	5401.54	7927.0	7926.99	7613.1	7612.09	7585.82	7584.81	6694.28	6693.27
				7071.05	7070.04	5498.2	5497.19	7927.0	7926.99	7613.1	7612.09	7648.77	7647.76	7101.65	7100.64
				7073.11	7072.1	5634.26	5633.25	7927.0	7926.99	7613.1	7612.09	7697.54	7696.53	7145.46	7144.45
				7808.54	7807.53	5797.23	5796.22	8232.19	8231.18	7695.47	7694.46	7831.66	7830.65	7188.88	7187.87
				7835.24	7834.23	5900.86	5899.85	8586.01	8585.0	7830.35	7829.34	7918.88	7917.87	7688.88	7687.87
				7872.02	7871.01	6112.82	6111.81	9019.48	9018.47	7867.4	7866.39	7948.13	7947.12	7712.66	7711.65
				7948.62	7947.61	6134.96	6133.95	9492.23	9491.22	7936.37	7935.36	8125.03	8124.02	8548.16	8547.15
				9015.6	9014.59	6181.18	6180.17	9830.54	9829.53	9834.82	9833.81	8212.15	8211.14	8847.9	8846.89
				9830.98	9829.97	6289.1	6288.09	10015.27	10014.26	10255.83	10254.82	8577.64	8576.63	9278.39	9277.38
				10247.66	10246.65	6316.01	6315.0	10141.52	10140.51	10271.38	10270.37	9012.51	9011.5	10260.68	10259.67
				10271.22	10270.21	6331.94	6330.93	10271.38	10270.37	10290.14	10289.13	9735.15	9734.14	10301.62	10300.61
				10286.35	10285.34	6383.53	6382.52	10284.14	10283.13	10305.45	10304.44	9756.55	9755.54	10324.62	10323.61
				10305.67	10304.66	6414.42	6413.41	10302.12	10301.11	10777.97	10776.96	10263.36	10262.35	10596.14	10595.13
				10318.52	10317.51	6465.18	6464.17	10763.3	10762.29	10788.02	10787.01	10274.83	10273.82	10897.03	10896.02
				10340.18	10339.17	6583.63	6582.62	11177.71	11176.7	10918.94	10917.93	10286.31	10285.3	11190.37	11189.36
				10759.77	10758.76	7600.5	7599.49	11745.86	11744.85	11677.54	11676.53	10309.29	10308.28	11510.26	11509.25
				10780.24	10779.23	7700.01	7699.0	11965.11	11964.1	11948.62	11947.61	10786.63	10785.62	11582.1	11581.09
				11495.53	11494.52	7952.58	7951.57	14044.17	14043.16	14175.0	14173.99	10790.37	10789.36	14510.2	14509.19
				11686.92	11685.91	8230.92	8229.91	14181.49	14180.48			11515.0	11513.99		
				11694.15	11693.14	8332.19	8331.18	14458.36	14457.35			14179.15	14178.14		
				14172.51	14171.5	10313.34	10312.33								

Obr. 25 Rozdielne signály pre spektrá a vzorky inkubované 2 hodiny (17.9), 24 (18.9), 48 (19.9) hodín a 6 (23.9) dní (zľava). „S4 CTRL“ (kontrola) obsahuje signály vyskytujúce sa len v kontrole a tabuľka vzorky (17.9 2h, 18.9 24h, 19.9 48h a 23.9 6d μ M) signály vyskytujúce sa len vo vzorke a nie v kontrole.

chain 4L superfamily“, „Thiamine biosynthesis protein ThiS“. Signály sa líšili v priradených ribozomálnych proteínoch. Rozdielnym signálom (Obr. 25) vzorky sa priradili aj proteíny „Bacterial nucleoid protein Hbs“, „10 kDa chaperonin“ a „Putative carboxysome peptide A“. Referencia a vzorka kultivovaná 18.9. počas 24 hodín v stave beztiaže mali spoločný proteín súvisiaci s fotosyntézou „Photosystem II reaction center protein T“, „CAB/ELIP/HLIP family protein“, „ATPase“ a „Toxin HipA (Fragment)“. Vzorka nebol priradený žiadny ribozomálny proteín, ale obsahovala „Antitoxin“, „Glutamate 5-kinase, ProB-related “ a „DDE_Tnp_IS240 domain-containing protein“, ktoré sa priradili jej rozdielnym signálom (Obr. 25).

S kontrolou z 19.9. sa porovnávala vzorka kultivovaná 48 hodín. Počet podobných signálov (50) bol väčší ako u predchádzajúcej dvojice. Medzi rovnaké priradené proteíny patria napríklad „Ferredoxin“, „NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit O“, „ATPase“ a membránový proteín „Conserved hypothetical membrane protein“. Rozdielnym signálom (Obr. 25) vzorky sa priradili proteíny „Type II toxin-antitoxin system RelE/ParE family toxin“, „Quaternary ammonium compound-resistance protein QacC“ a „Ribbon-helix-helix protein, copG family“. Chýbali jej „Small mechanosensitive ion channel, MscS family protein“, „Nif11 domain-containing protein (Fragment) „ a „Pirin_C_2 domain-containing protein“. Vzorka kultivovaná 6 dní so svojou referenciou z 23.9. mali podobné signály (40) priradené napríklad proteínom „Conserved hypothetical membrane protein“ a „ATPase“ ako tomu bolo aj v dvojiciach predtým. Rozdielnym signálom (Obr. 25) vzorky sa priradili „Quinolinate synthetase“ ale aj „ThiS family domain protein“ a „Ethanolamine utilization protein EutN/carboxysome structural protein CcmI“.

Nasledujúca dvojica mala najmenej podobných signálov (Obr. 26) (22 píkov) a aj tie mali väčšinou rozdiely väčšie ako 1. Vzorka bola kultivovaná 9 dní. Oproti referencii sa jej priradilo viac fotosyntetických proteínov a „Recombinase A“, „Thiamine biosynthesis protein ThiC“ a „Adenylosuccinate lyase“. Nepriradila sa jej „ATPase“ ani „Conserved hypothetical membrane protein“, ktoré sa priradili ostatným dvojiciam. Ďalšia referencia bola získaná 1.10. a porovnávané spektrum bolo z bunky kultivovanej od 26.9. do 1.10. (6 dní). Podobné signály (Obr. 26) (27 píkov) mali mnohé rozdiel väčší ako 1. Rozdielnym signálom sa priradili „Putative enzyme involved in biosynthesis of extracellular polysaccharides“, „Anti-sigma factor antagonist“, „Histidine triad family

S4 CTRL 26.9.					S4 CTRL 26.9. 9d					S4 CTRL 1.10.					S4 CTRL 26.9.-1.10					S4 CTRL 4.10.					S4 CTRL 26.9.-4.10.					S4 CTRL 8.10.					S4 CTRL 26.9.-8.10.				
m/z	M(exp)	Rozdiel	m/z2	M(exp)3	m/z	M(exp)	Rozdiel	m/z2	M(exp)3	m/z	M(exp)	Rozdiel	m/z2	M(exp)3	m/z	M(exp)	Rozdiel	m/z2	M(exp)3	m/z	M(exp)	Rozdiel	m/z2	M(exp)3	m/z	M(exp)	Rozdiel	m/z2	M(exp)3	m/z	M(exp)	Rozdiel	m/z2	M(exp)3	m/z	M(exp)	Rozdiel	m/z2	M(exp)3
3224.77	3223.76	0.64	3224.13	3223.12	3252.03	3251.02	0.24	3251.79	3250.78	3034.31	3033.3	-2.26	3036.57	3035.56	3081.54	3080.53	1.68	3079.86	3078.85																				
3245.57	3244.56	-1.79	3247.36	3246.35	3276.7	3275.69	-0.37	3277.07	3276.06	3122.95	3121.94	0.78	3122.17	3121.16	3122.95	3121.94	0.78	3122.17	3121.16																				
3814.54	3813.53	2.13	3812.41	3811.4	3486.7	3485.69	-2.65	3489.35	3488.34	3544.17	3543.16	2.74	3541.43	3540.42	3209.01	3208.0	-0.87	3209.88	3208.87																				
3979.7	3978.69	-0.1	3979.8	3978.79	3503.48	3502.47	1.33	3502.15	3501.14	3757.06	3756.05	0.41	3756.65	3755.64	3315.73	3314.72	-2.26	3317.99	3316.98																				
4618.29	4617.28	-1.3	4619.59	4618.58	3626.34	3625.33	2.39	3623.95	3622.94	3889.16	3888.15	0.97	3888.19	3887.18	3540.73	3539.72	1.59	3539.14	3538.13																				
4977.44	4976.43	1.54	4975.9	4974.89	3765.09	3764.08	-0.78	3765.87	3764.86	3889.16	3888.15	-2.84	3892.0	3890.99	3671.77	3670.76	1.02	3670.75	3669.74																				
5473.63	5472.62	-0.47	5474.1	5473.09	3833.23	3832.22	1.08	3832.15	3831.14	3982.13	3981.12	0.16	3981.97	3980.96	3766.61	3765.6	1.01	3765.6	3764.59																				
5540.09	5539.08	1.34	5538.75	5537.74	3870.34	3869.33	-2.71	3873.05	3872.04	4116.44	4115.43	-1.22	4117.66	4116.65	3981.08	3980.07	-0.31	3981.39	3980.38																				
5563.04	5562.03	-0.98	5564.02	5563.01	3980.67	3979.66	-1.48	3982.15	3981.14	4583.9	4582.89	-1.31	4585.21	4584.2	4925.27	4924.26	-2.0	4927.27	4926.26																				
5578.49	5577.48	0.7	5577.79	5576.78	4977.06	4976.05	1.21	4975.85	4974.84	4619.15	4618.14	-0.83	4619.98	4618.97	4927.67	4926.66	0.4	4927.27	4926.26																				
5594.64	5593.63	1.38	5593.26	5592.25	5561.98	5560.97	1.45	5560.53	5559.52	4689.56	4688.55	-0.05	4689.61	4688.6	4975.63	4974.62	1.83	4973.8	4972.79																				
5768.34	5767.33	-0.23	5768.57	5767.56	5578.3	5577.29	-0.03	5578.33	5577.32	4798.16	4797.15	-0.09	4798.25	4797.24	5014.98	5013.97	2.36	5012.62	5011.61																				
5984.14	5983.13	1.58	5982.56	5981.55	5594.69	5593.68	-0.81	5595.5	5594.49	4927.01	4926.0	-0.15	4927.16	4926.15	5388.29	5387.28	-2.04	5390.33	5389.32																				
5997.94	5996.93	1.32	5996.62	5995.61	5997.92	5996.91	0.58	5997.34	5996.33	4998.57	4997.56	1.24	4997.33	4996.32	5472.1	5471.09	0.86	5471.24	5470.23																				
6027.76	6026.75	1.36	6026.4	6025.39	6014.17	6013.16	2.91	6011.26	6010.25	5044.91	5043.9	2.76	5042.15	5041.14	5577.58	5576.57	-0.02	5577.6	5576.59																				
6070.75	6069.74	0.98	6069.77	6068.76	6027.77	6026.76	0.71	6027.06	6026.05	5123.59	5122.58	2.57	5121.02	5120.01	5593.53	5592.52	-0.66	5594.19	5593.18																				
6358.95	6357.94	0.0	6358.95	6357.94	6070.88	6069.87	-0.81	6071.69	6070.68	5471.89	5470.88	0.76	5471.13	5470.12	5996.98	5995.97	-0.83	5997.81	5996.8																				
6469.64	6468.63	0.92	6468.72	6467.71	6297.8	6296.79	0.09	6297.71	6296.7	5577.88	5576.87	0.23	5577.65	5576.64	6012.73	6011.72	2.21	6010.52	6009.51																				
6899.5	6898.49	2.2	6897.3	6896.29	6683.77	6682.76	1.6	6682.17	6681.16	5594.02	5593.01	0.57	5593.45	5592.44	6069.96	6068.95	0.02	6069.94	6068.93																				
7533.32	7532.31	1.75	7531.57	7530.56	6898.78	6897.77	-0.8	6899.58	6898.57	5611.57	5610.56	2.13	5609.44	5608.43	6683.32	6682.31	-2.41	6685.73	6684.72																				
7664.69	7663.68	0.85	7663.84	7662.83	7518.14	7517.13	0.43	7517.71	7516.7	5997.45	5996.44	-0.54	5997.99	5996.98	6787.91	6786.9	-1.09	6789.0	6787.99																				
7963.83	7962.82	-2.14	7965.97	7964.96	7533.3	7532.29	0.4	7532.9	7531.89	6012.86	6011.85	0.38	6012.48	6011.47	7195.74	7194.73	0.33	7195.41	7194.4																				
					7664.51	7663.5	1.44	7663.07	7662.06	6070.31	6069.3	-1.51	6071.82	6070.81	7531.25	7530.24	-1.33	7532.58	7531.57																				
					7681.04	7680.03	-0.43	7681.47	7680.46	6087.39	6086.38	-1.16	6088.55	6087.54	7663.4	7662.39	0.09	7663.31	7662.3																				
					8112.1	8111.09	-1.86	8113.96	8112.95	6373.7	6372.69	1.69	6372.01	6371.0	7963.47	7962.46	-0.6	7964.07	7963.06																				
					9724.37	9723.36	0.12	9724.25	9723.24	6558.31	6557.3	1.24	6557.07	6556.06																									
					11515.11	11514.1	-0.8	11515.9	11514.9	7663.95	7662.94	0.01	7663.94	7662.93																									
										7680.28	7679.27	-0.73	7681.01	7680.0																									

Obr. 26 Podobné signály pre spektrá kontroly a vzorkov inkubovaných 9 (26.9), 6 (od 26.9 do 1.10), 9 (od 26.9 do 4.10) a 13 (od 26.9 do 8.10) dní

protein“ a aj proteín použitý počas bunkového cyklu „Cell division topological specificity factor“.

U vzorky kultivovanej od 26.9. do 4.10. (9 dní) sa pre rozdielne píky identifikovali proteíny „Prevent-host-death protein“, „Anti-sigma factor antagonist“, „Protein-export membrane protein SecG“. Spoločný proteín s referenciou mala „Toxin HipA“, ktorý sa v predchádzajúcich referenciách nenašiel. Počet podobných signálov (Obr. 26) bol 27. Posledná vzorka sa kultivovala od 26.9 do 8.10 (13 dní). S referenciou mala len o dva podobné signály (Obr. 26) (24 píkov) viac ako vzorka kultivovaná 9 dní. Podobným signálom sa priradili proteíny „ATPase“, „NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit O“ a ako aj u iných dvojíc „Uncharacterized protein“. Rozdielnym signálom vzorky sa priradili hlavne fotosyntetické proteíny ale aj „Pirin_C_2 domain-containing protein“, „MazG nucleotide pyrophosphohydrolase domain protein“ a „DDE_Tnp_IS240 domain-containing protein“.

4.5 GUI aplikácia

Pre používateľov, ktorí nemajú nainštalovaný interpretér pythonu bola vytvorená aj GUI (grafické užívateľské rozhranie) verzia programu pre výpočet hmotností proteínov proteómu s nasledujúcim priradením proteínov a pre porovnávanie signálov. Na to bol založený nový súbor *priradenie_app.py* a *porovnanie_app.py*, ktoré boli uložené do zložiek s rovnakým názvom.

Python poskytuje rôzne možnosti pre vývoj grafických užívateľských rozhraní. Medzi štandardné balíky patrí často používaný Tkinter, ktorý bol použitý v tomto kóde. Tkinter obsahuje rôzne bežné prvky pre grafické rozhranie ako sú tlačidlá, menu a rôzne druhy vstupných polí a výstupných oblastí. Tieto prvky nazývame widgety.

Pre prehľadnosť kódu sú všetky funkcie umiestnené do triedy (*class*) *Demo_app(tk.Frame)* na ktorej zavolanie je potrebné vytvoriť základný rám. Prvou funkciou v triede je `__init__`. V skutočnosti nejde tak úplne o funkciu aj keď funguje rovnako, ale o metódu, ktorá vždy funguje. Inít je skrátene inicializácia a všetko v nej zadané sa vždy spustí pokiaľ je volaná trieda. Vnútri je volaná nasledujúca funkcia *create_widgets(self)*, obsahujúca tvorbu všetkých tlačidiel a štruktúr zobrazených v aplikácii.

S widgetom `ttk.Notebook` boli vytvorené dve okná v ráme. Používateľ môže zvoliť jednu kartu po druhej, pričom sú navzájom prepojené. Prvé okno nesie názov „Protein Mass“ a druhé „Assigning proteins“. Pre obe okná sú vytvorené tri tlačidlá.

4.5.1 Tlačidlá pre otvorenie súborov

Prvé tlačidlá na oboch oknách sú si podobné. Ide o jednoduché funkcie otvárajúce súbor, ktorý bude podrobený analýze. Pomocou príkazu *filedialog.askopenfilename* sa zobrazí okno pre otvorenie súboru vo FASTA formáte, v druhej karte v textovom (Obr. 27).

```
def select_file(self):
    filename = filedialog.askopenfilename(filetypes = [('Fasta Files', '*.fasta')], initialdir=".")
    self.infile = open(filename, 'r')

def select_file_tab2(self):
    filename2 = filedialog.askopenfilename(filetypes = [('Text Files', '*.txt')], initialdir=".")
    self.infile2 = open(filename2, 'r')
```

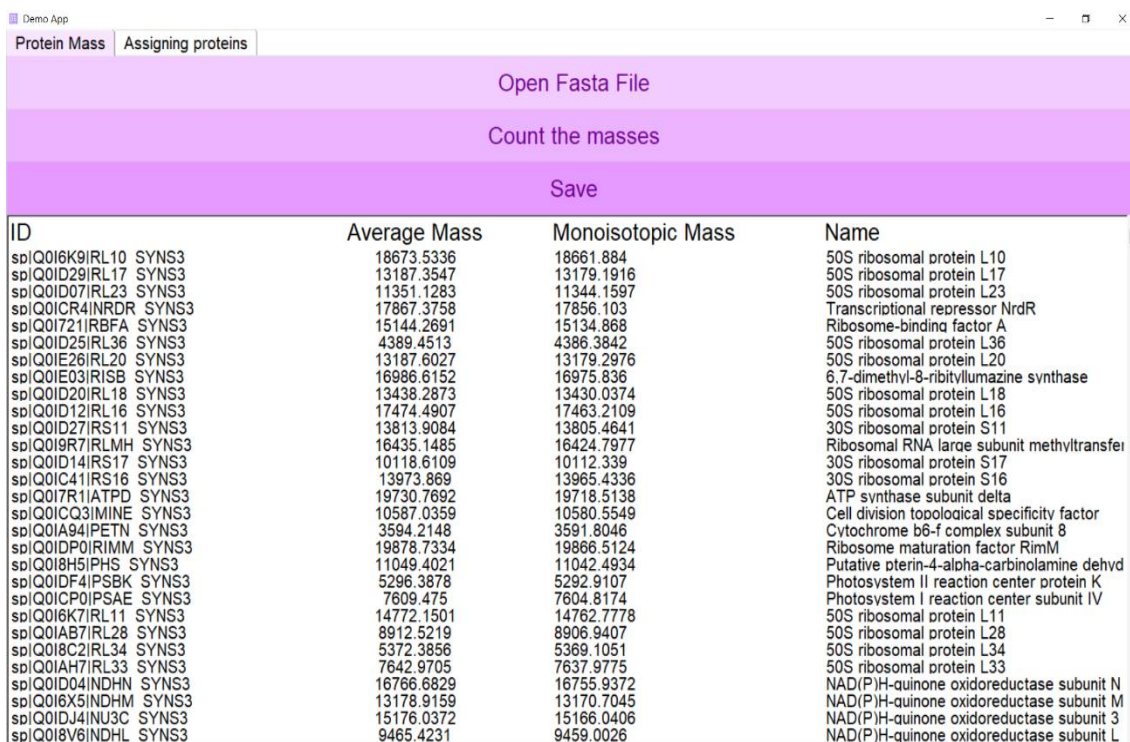
Obr. 27 Funkcie pre otvorenie súborov

Vracia meno súboru, ktoré korešponduje s vybraným, a v nasledujúcom riadku je otvorený pre čítanie s funkciou *open*.

4.5.2 Výpočet proteómu a priradenie proteínov

Druhé tlačidlo sa líši v oboch oknách. Keďže v prvom okne ide čisto o vyrátanie hmotností proteínov z proteómu, funkcia je poupravenou verziou *vypocet_proteomu(file_in, file_out)*. Výstupom tlačidla je tabuľka, vytvorená s widgetom *TreeView*, ktorý je užitočný pre zobrazenie hierarchie položiek so všetkými atribútmi uvedenými vedľa seba. Hodnoty boli ukladané do tabuľky s cyklom *for* a pomocou funkcie *tree.insert*. Výsledok sa zobrazuje na spodok okna aplikácie a dá sa celý prejsť pomocou posuvníka (Obr. 28).

V druhom okne sa s tlačidlom „Open file“ otvára textový súbor obsahujúci *m/z*, ktorým chceme priradiť proteíny. Tlačidlo „Assign“ nám to vyráta pomocou funkcie *priradenie_proteinov (proteom, signals)* prispôsobenej pre túto konkrétnu aplikáciu. Výstup je zobrazený taktiež pomocou *Treeview* (Obr. 29).



ID	Average Mass	Monoisotopic Mass	Name
sp Q0I6K9 RL10 SYNS3	18673.5336	18661.884	50S ribosomal protein L10
sp Q0ID29 RL17 SYNS3	13187.3547	13179.1916	50S ribosomal protein L17
sp Q0ID07 RL23 SYNS3	11351.1283	11344.1597	50S ribosomal protein L23
sp Q0ICR4 INRDR SYNS3	17867.3758	17856.103	Transcriptional repressor NrdR
sp Q0I721 IRBFA SYNS3	15144.2691	15134.868	Ribosome-binding factor A
sp Q0ID25 RL36 SYNS3	4389.4513	4386.3842	50S ribosomal protein L36
sp Q0IE26 RL20 SYNS3	13187.6027	13179.2976	50S ribosomal protein L20
sp Q0IE03 RISB SYNS3	16986.6152	16975.836	6,7-dimethyl-8-ribitylumazine synthase
sp Q0ID20 RL18 SYNS3	13438.2873	13430.0374	50S ribosomal protein L18
sp Q0ID12 RL16 SYNS3	17474.4907	17463.2109	50S ribosomal protein L16
sp Q0ID27 RS11 SYNS3	13813.9084	13805.4641	30S ribosomal protein S11
sp Q0I9R7 RLMH SYNS3	16435.1485	16424.7977	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase
sp Q0ID14 RS17 SYNS3	10118.6109	10112.339	30S ribosomal protein S17
sp Q0IC41 RS16 SYNS3	13973.869	13965.4336	30S ribosomal protein S16
sp Q0I7R1 IATPD SYNS3	19730.7692	19718.5138	ATP synthase subunit delta
sp Q0ICQ3 IMINE SYNS3	10587.0359	10580.5549	Cell division topological specificity factor
sp Q0IA94 PETN SYNS3	3594.2148	3591.8046	Cytochrome b6-f complex subunit 8
sp Q0IDP0 RIMM SYNS3	19878.7334	19866.5124	Ribosome maturation factor RimM
sp Q0I8H5 PHS SYNS3	11049.4021	11042.4934	Putative pterin-4-alpha-carbinolamine dehydrogenase
sp Q0IDF4 PSBK SYNS3	5296.3878	5292.9107	Photosystem II reaction center protein K
sp Q0ICP0 PSAE SYNS3	7609.475	7604.8174	Photosystem II reaction center subunit IV
sp Q0I6K7 RL11 SYNS3	14772.1501	14762.7778	50S ribosomal protein L11
sp Q0IAB7 RL28 SYNS3	8912.5219	8906.9407	50S ribosomal protein L28
sp Q0I8C2 RL34 SYNS3	5372.3856	5369.1051	50S ribosomal protein L34
sp Q0IAH7 RL33 SYNS3	7642.9705	7637.9775	50S ribosomal protein L33
sp Q0ID04 INDHN SYNS3	16766.6829	16755.9372	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit N
sp Q0I8X5 INDHM SYNS3	13178.9159	13170.7045	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M
sp Q0IDJ4 INU3C SYNS3	15176.0372	15166.0406	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 3
sp Q0I8V6 INDHL SYNS3	9465.4231	9459.0026	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit L

Obr. 28 Výstup po stlačení tlačidla „Count the masses“ pre *Synechococcus sp. (strain CC9311)*

m/z	M(exp)	Difference	Average mass	Theoretical m/z	Monoisotopic ID	Názov
7610.82	7609.81	0.33	7609.48	7610.49	7604.82	sp Q0ICP0 PSAE SYN33 Photosystem I reaction center su
12241.36	12240.35	-0.31	12240.66	12241.67	12233.0	sp Q0IE57 Y026 SYN33 Nucleoid-associated protein svnc
6895.17	6894.16	-0.13	6894.29	6895.3	6889.63	tr Q0IA36 Q0IA36 SYN33 Uncharacterized protein
10955.46	10954.45	0.06	10954.39	10955.4	10947.39	tr Q0IA43 Q0IA43 SYN33 Uncharacterized protein
10751.64	10750.63	0.71	10749.92	10750.93	10743.3	tr Q0I747 Q0I747 SYN33 Exodeoxyribonuclease 7 small su
5593.59	5592.58	-0.98	5593.56	5594.57	5589.99	tr Q0ICL6 Q0ICL6 SYN33 Uncharacterized protein
8496.24	8495.23	-0.14	8495.37	8496.38	8490.07	tr Q0ID89 Q0ID89 SYN33 Uncharacterized protein
4975.85	4974.84	0.79	4974.05	4975.06	4970.68	tr Q0I6E9 Q0I6E9 SYN33 Uncharacterized protein
7610.82	7609.81	-0.53	7610.34	7611.35	7605.82	tr Q0I940 Q0I940 SYN33 Uncharacterized protein
5385.21	5384.2	0.99	5383.21	5384.22	5379.92	tr Q0IC30 Q0IC30 SYN33 Uncharacterized protein
7628.52	7627.51	0.96	7626.55	7627.56	7621.76	tr Q0I8X7 Q0I8X7 SYN33 Nif1 domain-containing protein
7962.15	7961.14	0.87	7960.27	7961.28	7955.13	tr Q0IA75 Q0IA75 SYN33 Uncharacterized protein
8293.14	8292.13	-0.27	8292.4	8293.41	8287.29	tr Q0I758 Q0I758 SYN33 Uncharacterized protein
6290.95	6289.94	0.74	6289.2	6290.21	6285.24	tr Q0IDN9 Q0IDN9 SYN33 Uncharacterized protein
5982.84	5981.83	0.55	5981.28	5982.29	5977.29	tr Q0I9D5 Q0I9D5 SYN33 Uncharacterized protein
8534.62	8533.61	-0.68	8534.29	8535.3	8528.71	tr Q0I7Y9 Q0I7Y9 SYN33 Uncharacterized protein
7942.74	7941.73	0.28	7941.45	7942.46	7936.15	tr Q0I7D2 Q0I7D2 SYN33 Uncharacterized protein
5754.25	5753.24	0.58	5752.66	5753.67	5748.99	tr Q0IC96 Q0IC96 SYN33 Uncharacterized protein
5593.59	5592.58	0.16	5592.42	5593.43	5588.83	tr Q0IBS0 Q0IBS0 SYN33 Uncharacterized protein
5561.29	5560.28	0.86	5559.42	5560.43	5555.81	tr Q0IDR8 Q0IDR8 SYN33 Uncharacterized protein

Obr. 29 Výstup po stlačení tlačidla „Assign“

4.5.3 Tlačidlo pre uloženie výsledkov

Tretie tlačidlo je rovnaké pre obe okná, líši sa len výstupom. V prvom okne ide o uloženie tabuľky s proteínmi a ich hmotnosťami. V druhom okne sa ukladajú priradené proteíny, pre konkrétne signály. S týmto zámerom boli vytvorené funkcie *save_assign(self)* (Obr. 30) a *save_proteom(self)*.

S funkciou *asksaveasfilename* sa otvorí dialógové okno pre vytvorenie nového súboru v textovom formáte. Po zvolení mena sa načíta v móde „write“ a pomocou knižnice *csv* sa umožní zapísanie tabuľky do tohto súboru. Pri zadávaní názvu je potreba zadať aj koncovku, čiže formát v akom to chceme uložiť (.TXT)

```
def save_assign(self):
    self.file_p = filedialog.asksaveasfilename(filetypes = [('Text Files', '*.txt')])
    with open(self.file_p, "w", newline="") as fp:
        csvwriter = csv.writer(fp, delimiter='\t')
        if fp:
            for row_p in self.assign_tree.get_children():
                rowp = self.assign_tree.item(row_p)["values"]
                csvwriter.writerow(rowp)
```

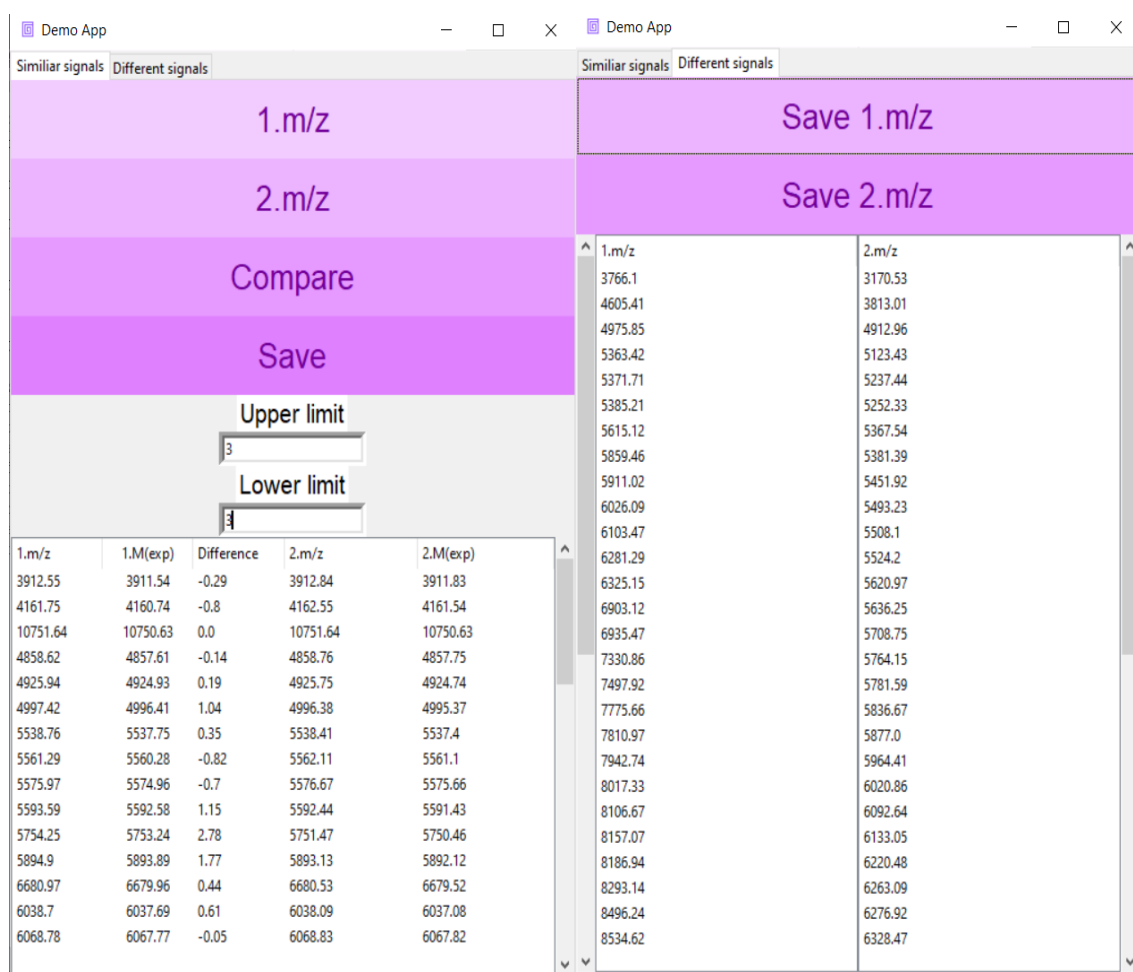
Obr. 30 Funkcia pre ukladanie tabuľky s priradenými proteínmi

4.5.4 GUI pre porovnanie signálov

Podobne ako pre priradenie proteínov bola naprogramovaná aj verzia s grafickým užívateľským rozhraním pre porovnanie signálov – zložka *porovnanie_app*. Výhodou tohto programu oproti funkcii *porovnanie_podobne* je jednoduchosť používania a hlavne možnosť nastavenia si dolnej a hornej hranice rozdielu pre hocikoho (Obr. 31). Hranice je potreba zadať bez znamienok, čiže bez „+“ a „-“. Aj v tomto prípade bola použitá knižnica Tkinter a jej nástroje.

4.5.4 .EXE file

Zámerom, kvôli ktorému bolo vytvorené grafické rozhranie, bola možnosť spustenia aplikácie jednoducho z pracovnej plochy počítača. Nie je potreba nainštalovaného kompilátora pre jazyk Python a tým pádom ho môže použiť aj človek bez znalostí v oblasti programovania.



Obr. 31 GUI pre porovnanie signálov s nastavenou hornou a dolnou hranicou na číslo 3

Pre túto úlohu bola najskôr nainštalovaná knižnica „pyinstaller“ pomocou príkazového riadka. V tom je následne zadaný príkaz,

```
pyinstaller --onefile -w 'filename.py'
```

ktorý vytvorí zložku so súborom s príponou .exe. Tým sa spustí program pripravený na následnú prácu.

5 DISKUSIA

Hodnotám píkov z hmotnostného spektra, ak sú namerané s dostatočnou presnosťou, je možné priradiť konkrétne proteíny, pokiaľ máme zistené ich teoretické hmotnosti. Tieto hmotnosti sa dajú pomerne rýchlo vypočítať z proteómových sekvencií, čo bolo dosiahnuté vo funkcii *vypocet_proteomu*. Tá sa dá ľahko upravovať podľa požiadavok používateľa. Vďaka jednoduchosti kódu a využitiu nástrojov z knižníc sa k výsledku dostaneme do niekoľkých sekúnd.

Proteíny sa priradzujú podľa hodnoty experimentálnej hmotnosti, ktorá sa získava z čísla m/z . Ako sa toto číslo vypočíta, závisí od techniky, ktorá sa použije pre získanie spektra. Spektrá, ktoré sa použili v tejto práci, boli namerané v pozitívnom ionizačnom móde, a platilo teda, že sa tvorili ióny $[M+H]^+$, čiže sa od m/z odčítala hmotnosť protónu. Tieto hodnoty sa už nakoniec porovnávali s vypočítanými hmotnosťami z proteómu, pričom ide veľmi jednoducho nastaviť tolerancia rozdielu. Priemerne sa jednému spektru so 100-mi diagnostickými signálmi priradilo okolo 130 možných proteínov z vybraných kmeňov jedného druhu. Upresnenie priradenia proteíny by sa dalo ešte viac upraviť, pre lepšie výsledky alebo pre iný mód. Priradzovanie konkrétnych proteínov nám môže ukázať ako ovplyvňuje spôsob kultivácie vzorky jej biologický obsah. Ukazuje, že určité látky a ich rôzne koncentrácie, môžu ovplyvniť výskyt určitého proteínu v bunke ako reakciu na jej prítomnosť.

Ako píše Haroun a Saheer (2010), identifikácia mikroorganizmov za pomoci hmotnostnej spektrometrie je založená na porovnávaní spektra vzorky, ktorú chceme identifikovať, s kontrolným spektrom. Pomocou algoritmu pre výber podobných píkov, ktoré sa vyberajú v určitom intervale na základe píkov referencie, boli získané údaje, vďaka ktorým môžeme určiť, či sa vzorka dá identifikovať. S kódom pre rozdielne píky sa ešte získali potencióálne rozdiely. Pre kultiváciu s látkou deoxyglukóza prebehla aj kontrola, či sú tieto údaje validné. Týmto porovnávaním spektrier sa preukázalo, že tento algoritmus je použiteľný a dajú sa s ním získať užitočné informácie pre identifikáciu.

Kedže počet píkov získaných zo spektrier bol 100, môžeme na základe vzniknutých tabuliek získať podobnosť charakteristických píkov v percentách. Píkom spektrier vzorky kultivovanej s DG podobnosť klesala z týždňa na týždeň, z približne 50% na 37%. Vzorky kultivované s FAA mali najviac podobných signálov s kontrolou druhý týždeň, ale aj tak sa držala nad 45%. MA malo najviac podobných signálov. Počas tretieho týždňa

podobnosť stúpala až na 71%. Kultivácia v stave beztiaže ukázala, že s pribúdajúcim časom sa podobnosť spektrier znižuje. Z prvej 2 hodinovej kultivácie s podobnosťou 67% až k nízkej, 22% podobnosti. Získ dát by sa v budúcnosti určite dal ešte vylepšiť a prísť s konkrétnejšími poznatkami.

Z kultivácie s inhibítormi sa dá usúdiť, že deoxyglukóza, fluoroacetát a malonát majú mierne účinky na vzhľad hmotnostných spektier, čo veľmi neovplyvňuje identifikáciu. Deoxyglukóza sa z týchto troch ukázala ako najsilnejšia, jej rozdiely patrili hlavne píkom s nižšou intenzitou. Prítomnosť malonátu, podobne ako fluoroacetátu, až tak nezmenila hmotnostné spektrá. Stúpajúca koncentrácia látok zapríčiňovala znižovanie podobnosti, takisto aj pribúdajúci čas. V spektrách buniek inkubovaných v stave beztiaže dochádza k postupným zmenám, pričom po 9 dňoch inkubácie došlo k zjavným rozdielom pri porovnávaní signálov vzorky s kontrolou. Dlhšia inkubácia znemožňuje vyhľadanie podobných signálov. Dá sa teda predpokladať, že dlhá inkubácia s vyššími koncentraciami toxických látok alebo v stave beztiaže sťažuje identifikáciu s MALDI-TOF intaktných buniek. Priradenie proteínov viedlo hlavne k necharakterizovaným proteínom, proteínom súvisiacim s fotosyntézou a regulátorom transkripcie. Adaptačné mechanizmy reagujúce na abiotický stres siníc zahŕňajú resyntézu práve proteínov spojených s fotosyntézou, redoxných proteínov, chaperónov, transportérov a regulátorov.

6 ZÁVER

Teoretickým základom tejto práce, bolo vypracovať literárnu rešerš pojednávajúcu o hmotnostnej spektrometrii so zameraním na techniku MALDI-TOF a jej využitie v mikrobiológii. Boli naštudované základy MS a princíp MALDI techniky, ktorá umožňuje identifikovať mikroorganizmy na základe ich hmotnostných spektier.

Bol vytvorený program, ktorý umožňuje vypočítať priemernú a monoizotopickú hmotnosť proteínov z proteómov, ktoré boli stiahnuté vo FASTA formáte. Naprogramovala sa funkcia, ktorá je podľa zadanej odchylky a vypočítaných proteínových hmotností, schopná priradiť proteíny pre píklist s hodnotami m/z .

Vytvoril sa aj kód, ktorý umožňuje porovnávať dva píklisty a nájsť ich podobné a rozdielne signály. To má význam pre identifikáciu mikroorganizmov, ktorá sa zakladá na porovnávaní referenčného spektra so spektrom vzorky. Kód umožňuje zmeniť interval, v ktorom sú akceptované podobné signály a vznikla aj GUI verzia, ktorá umožňuje používanie aj obyčajnému užívateľovi.

Všetky vytvorené kódy boli aplikované na konkrétnych laboratórnych výsledkoch. Vďaka tomu vznikli tabuľky, ktoré umožňujú analýzu. Na spektrách vzniknutých s kultiváciou s DG a ich tabuľkách s podobnými a rozdielnymi signálmi s referenčnými spektrami, bola odkontrolovaná chybovosť kódu. V podstate išlo o analýzu spektier v mMass a zistenie, či získané signály odpovedajú zmysluplným píkom, ktoré boli rozdelené v tabuľkách.

Ukázalo sa, že kódy sú funkčné, rýchle a jednoduché. Majú potenciál sa zlepšiť, napríklad ich spresnením a pridaním ďalších funkcií pre zisk presnejších výsledkov či použitie iných pravidiel.

7 LITERATÚRA

Alexander M., Kusleika R., Walkenbach J. (2018): *Excel Bible 2019*. 1st ed., Wiley, Indianapolis, U.S.A., 1074 strán.

Apweiler R. (2008): The Universal Protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* **vol. 36**, 190–195, https://academic.oup.com/nar/article/36/suppl_1/D190/2507561.

Apweiler R., Bairoch A., Wu C.H., Barker W.C., Boeckmann B., Ferro S., Gasteiger E., Huang H., Lopez R., Magrane M., Martin M.J., Natale D.A., O'Donovan C., Redaschi N., Yeh L.-S. L. (2004): Uniprot: the Universal Protein Knowledgebase. *Nucleic Acids Research* **vol. 32**, 115-119, https://academic.oup.com/nar/article/32/suppl_1/D115/2505378.

Bateman A. (2019): UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research* **47**, 506–515. <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D506/5160987?login=true>.

Bhasin H. (2018): *Python Basics: A Self-Teaching Introduction*. 1st ed., Mercury Learning & Information, Dulles, U.S.A., 450 strán.

Bille E., Dauphin B., Bougnoux M.-E., Beretti J.-L., Lotz A., Suarez S., Meyer J., Join-Lambert O., Descamps P., Grall N., Mory F., Dubreuil L., Berche P., Nassif X., Ferroni A. (2011): MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus spp.* and positive blood cultures. *Clinical microbiology and infection* **vol. 18**, 1117-1125. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22044600/>.

Binz P.-A., Shofstahl J., Vizcaíno J.A., Barsnes H., Chalkley R.J., Menschaert G., Alpi E., Clauser K., Eng J.K., Lane L., Seymour S.L., Hernández Sánchez L.F., Mayer G., Eisenacher M., Perez-Riverol Y., Kapp E.A., Mendoza L., Baker P.R., Collins A., Van Den Bossche T., Deutsch E.W. (2019): Proteomics Standards Initiative Extended FASTA Format. *Journal of Proteome Research* **vol. 18**, 2686-2692. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.9b00064>.

Chan J. (2014): *Learn Python in one day and learn it well: Python for beginners with hands-on project*. 1st ed., 125 strán.

Cole R. B. (2010): *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*. 2nd ed., Wiley, Hoboken, U.S.A., 880 strán.

Cotter R.J. (1992): Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Structural Analysis of Biological Molecules. *Analytical chemistry* **vol. 64**, 1027-1039.

de Hoffmann E., Stroobant V. (2007): *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed., Wiley, Chichester, United Kingdom, 502 strán.

Franco-Duarte R., Černáková L., Kadam S., Kaushik K.S., Salehi B., Bevilacqua A., Rosaria Corbo M., Antolak H., Dybka-Stepien K., Leszczewicz M., Tintino S.R., Alexandrino de Souza V., Sharifi-Rad J., Countinho H.D.M., Martins N., Rodrigues C.F. (2019): Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms* **7(5)**, 130. <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/5/130#cite>.

Friedecký D., Lemr K. (2012): Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **3**, 152-157.

Frye C. (2015): *Microsoft Excel 2016: Step by Step*. 1st ed., Microsoft Press, Redmond, U.S.A., 544 strán.

Gross J.H. (2004): *Mass Spectrometry a Textbook*. 1st ed., Springer, Berlin, Germany, 518 strán.

Gross J.H. (2017): *Mass Spectrometry a Textbook*. 3rd ed., Springer, Cham, Switzerland, 968 strán.

Guerrero H. (2019) *Excel data analysis: Modeling and simulation*. 2nd ed., Springer, Cham, Switzerland, 346 strán.

Haroun N.S., Gharbia S.E. (2010): *Mass Spectrometry for Microbial Proteomics*. 1st ed., Wiley, Chichester, United Kingdom, 534 strán.

Hillenkamp F., Peter-Katalinic J. (2014): *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods, and Applications*. 2nd ed., Wiley- Blackwell, Weinheim, Germany, 480 strán.

Hiraoka K. (2013): *Fundamentals of Mass Spectrometry*. 1st ed., Springer, New York, U.S.A., 246 strán.

Hosseini S., Martinez-Chapa S.O. (2017): *Fundamentals of MALDI- ToF- MS Analysis: Applications in Bio-diagnosis, Tissue Engineering and Drug Delivery*. 1st ed., Springer, Singapore, 79 strán.

Karger A., Stock R., Ziller M., Elschner M.C., Barbara B., Melzer F., Maier T., Kostrzewa M., Scholz H.C., Neubauer H., Tomaso H. (2012): Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. *BMC Microbiology* **12**:229
<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-12-229>

Kostrzewa M., Schubert S. (2016): *MALDI-TOF Mass Spectrometry in Microbiology Edited*. 1st ed., Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom, 170 strán.

mMass- Open Source Mass Spectrometry Tool home page: <http://www.mmass.org/> (5.4.2021)

Mueller J.P. (2018): *Beginning Programming with Python For Dummies*. 2nd ed., Wiley, Hoboken, U.S.A., 416 strán.

Müller A. C., Guido S. (2016): *Introduction to Machine Learning with Python: A Guide for Data Scientist*. 1st ed., O'Reilly, Sebastopol, U.S.A., 400 strán.

Papoušková B., Džubák P. (2014): Hmotnostní spektrometrie. In: *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. 1. vydání, (Cibiček N., Vacek J.), Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká Republika, 34-43.

Python home page: <https://www.python.org/> (3.3.2021)

Sauget M., Valor B., Bertrand X., Hocquet D. (2017): Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria? *Trends in Microbiology* **vol. 25**, 447-455.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.006>.

Smith R.M. (2004): *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach*. 2nd ed., Wiley, Hoboken, U.S.A , 392 strán.

Strohalm M., Hassman M., Košata B., Koldíček M. (2008): mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**, 905-908.
<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rcm.3444>

Uniprot home page: <https://www.uniprot.org/> (20.9.2020)

Watson J.O., Sparkman O.D. (2007): *Introduction to mass spectrometry*. 4th ed., Wiley, Chichester, United Kingdom, 862 strán.

Welker M. (2011): Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics 2011* **vol. 11**, 3143-3153. <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.201100049>

[pmic.201100049](https://doi.org/10.1002/pmic.201100049)

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

DG deoxyglukóza

FAA fluoroacetát

GUI grafické používateľské rozhranie

MA malonát

MALDI matricou asistovaná laserová desorpcia/ionizácia

MALDI-TOF matricou asistovaná laserová desorpcia/ionizácia s detektorom času letu

MS hmotnostná spektrometria

9 PRÍLOHY

Elektronické prílohy:

- Martikanova_priloha_01.zip – zazipovaný súbor so zložkou:
 - *Priradenie_app* – zložka s .EXE pre GUI aplikáciu pre výpočet proteínov a priradenie proteínov
- Martikanova_priloha_02.zip – zazipovaný súbor so zložkou:
 - *Kódy* – zložka so súborami v jazyku Python:
 - *vypocet_proteomu.py* – kód s funkciou na výpočet hmotností proteínov v proteóme
 - *priradenie.py* – kód s funkciou pre priradenie proteínov píkom
 - *porovnanie_signálov.py* – kód funkciami pre vyhľadávanie podobných a rozdielných signálov dvoch spektier
 - *porovnanie_app.py* – kód GUI aplikácie pre porovnanie signálov
 - *Porovnanie_app* – zložka s .EXE pre GUI aplikáciu pre porovnanie píklistov dvoch spektier
- Martikanova_priloha_03.zip – zazipovaný súbor so zložkami:
 - *Proteómy* – zložka obsahujúca FASTA súbory použitých proteómov s .TXT súbormi s vypočítanými hmotnosťami
 - *Tabuľky* – súbory .XLSX s Excel tabuľkami pre výsledky získané pomocou kódov
 - *priradene_1-3w_DG.xlsx* tabuľka priradených proteínov pre píklisty získané z buniek kultivovaných s 1, 2, 5 a 10 μM DG
 - *priradene_1-3w_FAA.xlsx* tabuľka priradených proteínov pre píklisty získané z buniek kultivovaných s 1, 2, 5 a 10 μM FAA
 - *priradene_1-3w_MA.xlsx* tabuľka priradených proteínov pre píklisty získané z buniek kultivovaných s 1, 2, 5 a 10 μM MA
 - *priradenie_S4CTRL.xlsx* tabuľka priradených proteínov pre píklisty získané z buniek kultivovaných v stave bez tiaže
 - *porovnanie_3jednotky_DG.xlsx* porovnanie píklistov referenčného a spektra vzorky kultivovanej s 1, 2, 5 a 10 μM DG

- *porovnanie_3jednotky_DG_mMass.xlsx* porovnanie píklistov referenčného a spektra vzorky kultivovanej s 1, 2, 5 a 10 μM DG skontrolované v programe mMass
- *porovnanie_3jednotky_FAA.xlsx* porovnanie píklistov referenčného a spektra vzorky kultivovanej s 1, 2, 5 a 10 μM FAA
- *porovnanie_3jednotky_MA.xlsx* porovnanie píklistov referenčného a spektra vzorky kultivovanej s 1, 2, 5 a 10 μM MA
- *S4CTRL_porovnanie_3jednotky.xlsx* porovnanie píklistov referenčného a spektra vzorky kultivovanej v stave bez tiaže
- *Signály* – súbory .TXT s hodnotami m/z signálov analyzovaných v práci, .FASTA súborom pre 11 proteómov a *synecho.txt* použitým v kóde *priradenie.py*